ว กรมวิทย พ 2568; 67 (4): 557-566

การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์โปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT โดยเทคนิค Flow Cytometry เพื่อระบุเอกลักษณ์ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA

พุธิตา โชคเหรียญสุขชัย อชิระ นามจันทร์ และ วิภาวี วงศ์ชนะ
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA โดยมีสมมติฐานว่าวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ผลิตโปรตีนหนามของไวรัส SARS-CoV-2 ที่สามารถตรวจติดตามได้ด้วยการใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะโดยเทคนิค Flow cytometry ผลการศึกษาพบว่าวัคซีนสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงผลิตโปรตีนหนามได้ โดยปริมาณ mRNA แปรผันกับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดโปรตีนหนาม และแอนติบอดีที่ใช้มีความจำเพาะต่อโปรตีนหนามเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติบอดีควบคุม โดยเมื่อทดสอบวัคซีน mRNA ที่มีปริมาณ 30 ไมโครกรัม สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของโปรตีนหนามที่มีค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 47 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการเติมวัคซีนหรือกลุ่มควบคุมที่มีร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีโปรตีนหนามน้อยกว่าร้อยละ 1 ทั้งนี้ผู้วิจัยมีเป้าหมายที่จะพัฒนาวิธีดังกล่าวให้เป็นวิธีมาตรฐานที่สามารถใช้ได้กับทุกผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปแบบวัคซีน mRNA ในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนโควิด 19, วัคซีน mRNA, โปรตีนหนาม, Flow cytometry, 293FT cells

Corresponding author E-mail: puthita.c@dmsc.mail.go.th

Received: 26 December 2024 *Revised: 21 May 2025* *Accepted: 19 August 2025*

บทนำ

โรคโควิด 19 (COVID-19) เกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2; SARS-CoV-2) แพร่ระบาดครั้งแรกเมื่อปลายปี ค.ศ. 2019 ที่เมืองอู่ฮั่น สาธารณรัฐประชาชนจีน จากนั้นจึงได้มีการแพร่ระบาดไปทั่วโลก[1] เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 มีส่วนประกอบสำคัญ คือ โปรตีนหนาม (Spike protein) ที่อยู่บนผิวของไวรัส มีบทบาทสำคัญในการจับกับโปรตีน Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) บนผิวของเซลล์เจ้าบ้านและทำให้ไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ นอกจากนี้โปรตีนหนามยังเป็นโปรตีนหลักที่ใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนาวัคซีน เนื่องจากสามารถกระตุ้นให้ร่างกายผลิต Neutralizing antibodies เพื่อยับยั้งการติดเชื้อไวรัสได้[1,2]

การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ที่ผ่านมามีการพัฒนาในหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นวัคซีนรูปแบบเดิม ได้แก่ วัคซีนเชื้อตาย (Inactivated-virus vaccine) วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live-attenuated vaccine) วัคซีนโปรตีนซับยูนิต (Protein subunit vaccine) และวัคซีนอนุภาคไวรัสเสมือน (Virus-like particle vaccine) หรือวัคซีนรูปแบบใหม่ (Next-generation vaccine platform) ได้แก่ วัคซีนที่ใช้ไวรัสเป็นพาหะ (Viral vector vaccine) วัคซีนรหัสพันธุกรรม (DNA or RNA vaccine) และวัคซีน Antigen-presenting cell (APC vaccine)[3] ในบรรดาวัคซีนเหล่านี้ วัคซีนชนิด mRNA เป็นวัคซีนที่ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีข้อได้เปรียบในการผลิตหลายประการ เช่น ใช้เวลาในผลิตน้อยกว่าวัคซีนทั่วไป มีกระบวนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหรือไวรัสในการผลิตเหมือนกับวัคซีนรูปแบบเดิม ทำให้ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนที่มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ สามารถปรับปรุงวัคซีนเพื่อรองรับสายพันธุ์หากไวรัสมีการกลายพันธุ์ รวมถึงมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูง[4,5] วัคซีนชนิด mRNA เป็นวัคซีนที่ถูกนำมาใช้งานเป็นครั้งแรกในการป้องกันโรคโควิด 19 โดยมีตัวยาที่สำคัญ (Drug substance) คือ mRNA ที่มีการปรับปรุงให้มีความเสถียรมากขึ้น เมื่อนำ mRNA เข้าไปในเซลล์จะทำให้เกิดการแปลรหัสให้สร้างโปรตีนหนามของไวรัส SARS-CoV-2 ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้[5] เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ยาสำเร็จรูป (Drug product) mRNA จะถูกนำมาห่อหุ้มด้วย Lipid nanoparticle (LNP) ซึ่งจะช่วยทำให้ mRNA มีความคงตัวและสามารถขนส่งเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้[4]

แนวทางการควบคุมคุณภาพวัคซีนชนิด mRNA ที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้กล่าวถึงการควบคุมคุณภาพด้านความเป็นเอกลักษณ์ (Identity) ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปของวัคซีนชนิด mRNA ที่สามารถใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mRNA ได้โดยตรงหรือวิเคราะห์จากการเปลี่ยนรหัสนิวคลีโอไทด์ของ mRNA ที่เป็น complementary DNA หรือการทำ High-throughput sequencing ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนได้เช่นกัน[6] ซึ่งสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ทำการพัฒนาวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing และการระบุเอกลักษณ์ด้วยวิธี Reverse-transcription PCR ในการตรวจสอบคุณภาพด้านความเป็นเอกลักษณ์ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA แล้ว ซึ่งตัวอย่างวัคซีนมีคุณลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตามที่บริษัทผู้ผลิตระบุไว้ แต่วิธีนี้ไม่ได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ได้จากการแปลรหัส mRNA สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนหนามที่ต้องการได้จริง ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนนั้นมีหลายวิธี เช่น การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western Blot ซึ่งสามารถทราบขนาดของโปรตีนที่ได้ตามน้ำหนักโมเลกุล[7] วิธี Immuno-staining ซึ่งเป็นการย้อมเซลล์ด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเพื่อดูว่ามีการผลิตโปรตีนดังกล่าวในเซลล์หรือไม่[8] แต่ทั้งสองวิธีนี้ไม่สามารถหาในเชิงปริมาณได้ และมีการนำวิธี Flow cytometry มาศึกษาผลผลิตโปรตีนหนามดังกล่าวในเซลล์ ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้[9] คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการทดสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA โดยการแสดงออกของโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 บนผิวเซลล์

293FT ด้วยเทคนิค Flow cytometry เพื่อการหาเอกลักษณ์ของโปรตีนหนามที่แปลรหัสมาจากวัคซีนชนิด mRNA และทดสอบความถูกต้องของวิธีดังกล่าวว่าสามารถนำมาใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการได้จริง โดยคาดหวังให้วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบวิธีในการควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของวัคซีนชนิด mRNA และนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นการหาค่าความแรงในเชิงปริมาณของวัคซีนได้ต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT

เพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT (Cat. no. 11625, Invitrogen, USA) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM high/glucose (Gibco, USA) ที่ประกอบด้วย 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA), 1% Non-essential amino acid (NEAA) (Gibco, USA), 1% penicillin/streptomycin (Gibco, USA), และ 2% HEPES (Gibco, USA) ในการทำให้เซลล์หลุดลอกจากภาชนะเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนใช้ 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco, USA) และ Phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, USA)

วัคซีนตัวอย่างและการเตรียม

วัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA ที่มีการนำเข้ามาทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการระหว่างปี พ.ศ. 2564–2565 ได้แก่ วัคซีน Comirnaty™ ของบริษัทไฟเซอร์ (Pfizer-BioNTech)

เตรียมวัคซีนเพื่อนำมาใช้ในการศึกษา โดยเจือจางวัคซีนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM high/glucose ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติม เพื่อให้ได้ปริมาณ mRNA ที่ 15, 30 และ 60 ไมโครกรัม

แอนติบอดีและสารละลาย

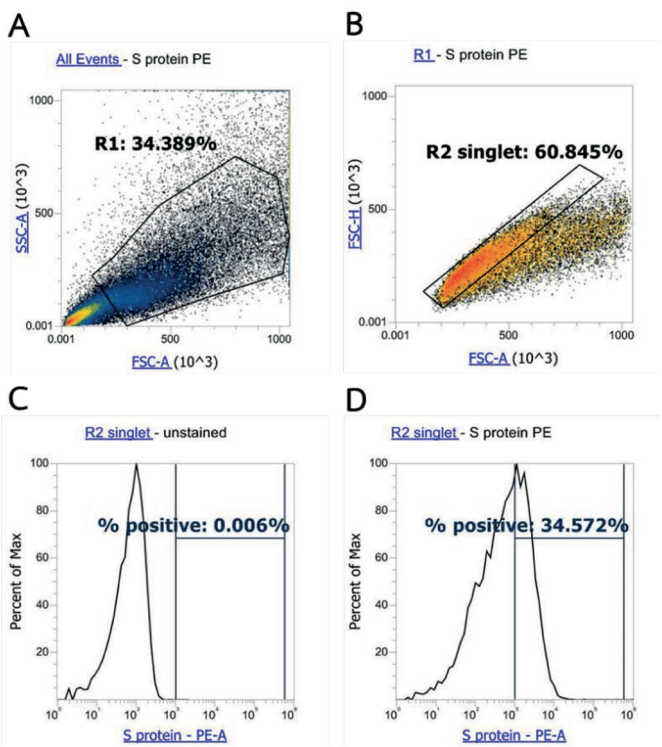
แอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 clone CR3022 (Cat no. NBP2-90980, Novus Biologicals Inc, USA) เจือจางก่อนใช้งานในอัตราส่วน 1:100 เป็นแอนติบอดีที่ใช้ในการย้อมเซลล์เพื่อตรวจหาโปรตีนหนามของวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA โดยมีแอนติบอดี Human IgG1 Kappa Isotype Antibody Control (Cat no. NBP3-06872-0.1 MG, Novus Biologicals Inc, USA) เจือจางก่อนใช้งานในอัตราส่วน 1:50 เป็นแอนติบอดีควบคุม และแอนติบอดี Goat Anti-Human IgG-PE, Cat no. STBT-2040-09 (Southern Biotech, USA) ที่เจือจางก่อนใช้งานในอัตราส่วน 1:200 เป็นแอนติบอดีสำหรับการตรวจติดตาม

FACs staining buffer ประกอบด้วย 1% FBS ใน 1 × PBS ใช้ในการเจือจางแอนติบอดีและกระบวนการย้อมเซลล์สำหรับการทดสอบ Flow cytometry

การวิเคราะห์โปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ 293FT ด้วยวิธี Flow cytometry

เติมเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT จำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อหลุมทดสอบ ลงไปในจานสำหรับเพาะเลี้ยงแบบ 6 หลุม (Costar, China) โดยให้มีปริมาตรหลุมละ 3 มิลลิลิตร ทุกหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้อบเพาะเชื้อที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (Binder, Germany) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมตัวอย่างวัคซีนที่มีปริมาณ mRNA ที่ต้องการศึกษาลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงในหลุมที่กำหนด แล้วบ่มต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วย PBS แช่เย็น ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร 2 ครั้ง โดยระวังไม่ให้กระทบกับเซลล์ จากนั้นเติม PBS แช่เย็น ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงไปทุกหลุม ตามด้วยการดูดปล่อยด้วยปิเปตหรือใช้ cell lifter เพื่อลอกเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงอย่างเบามือ ย้ายเซลล์ในของเหลวใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf, Centrifuge 5430, Eppendorf, Germany) ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที และดูดส่วนของเหลวใสทิ้งเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ก่อนเติมแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 หรือแอนติบอดี Human IgG1 Kappa Isotype Control หรือ FACs staining buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในตัวอย่าง

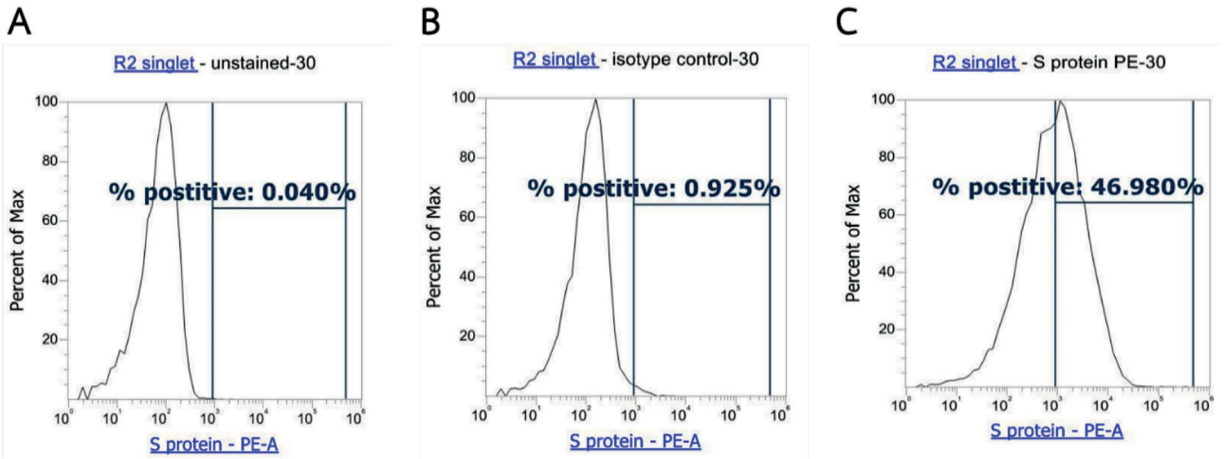
ที่กำหนด จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์และปั่นล้างเซลล์ด้วยการเติม FACs staining buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที 1 ครั้ง ดูดส่วนใสทิ้งเติม Goat anti-human IgG-PE หรือ FACs staining buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างที่กำหนด บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ในที่มืด จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์และปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้ง หลังจากดูดส่วนใสทิ้ง เติม FACs staining buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และนำเซลล์แขวนลอยไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer (Attune NxT Acoustic Focusing, Thermo Fisher, USA) โดยใช้โปรแกรม Attune™ NxT Software ปรับตั้งค่าพารามิเตอร์ในการใช้งานโปรแกรมและเครื่องตามคู่มือเหมือนกันทุกการทดสอบ สำหรับเกณฑ์การวิเคราะห์เซลล์ เลือกกลุ่มประชากร R1 (R1 cell population gate) จากประชากรเซลล์ทั้งหมด (All events หรือ Acquired cell count) และเลือกประชากร R2 จากประชากร R1 โดยคัดเลือกจากเกณฑ์ที่เป็นเซลล์เดี่ยว (R2 singlet cell gate) โดยที่กลุ่มประชากรใน R2 จะต้องมีจำนวนเท่ากับ 10,000 events (cells) และปรับตั้งเกณฑ์สำหรับ Antigen positive cell (% Positive cells) จากเซลล์ที่ไม่มีการเติมวัคซีนและใช้เกณฑ์เดียวกันในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนหนาม (S protein) บนผิวเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ด้วยโปรแกรม Attune™ NxT Software A) แสดงกลุ่มประชากรเซลล์ R1 ที่ได้จากการเลือกประชากรจากภาพการกระจายตัวของเซลล์ตามขนาด (Forward scatter; FSC) และความซับซ้อนภายในเซลล์ (Side scatter; SSC) ของประชากรทั้งหมด, B) แสดงกลุ่มประชากรเซลล์ R2 Singlet ที่ได้จากการเลือกประชากรจากภาพการกระจายตัวของเซลล์ตามขนาดแบบ FSC-H และ FSC-A ของประชากร R1, C) ภาพ Histogram แสดงกลุ่มประชากรที่เป็น % positive ของเซลล์ที่มีโปรตีนหนามแสดงออกบนผิวเซลล์แต่ไม่มีการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม และ D) แสดงกลุ่มประชากรที่เป็น % positive ของเซลล์ที่มีโปรตีนหนามแสดงออกบนผิวเซลล์และถูกย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม

การแปลผลการวิเคราะห์การแสดงออกโปรตีนหนามบนผิวเซลล์ 293FT

การพิจารณาการแสดงออกโปรตีนหนามบนผิวเซลล์ ทำโดยวิเคราะห์จาก ค่า % positive ที่เลือกจาก Singlet (R^2) ในการวิเคราะห์กราฟ Histogram ที่สร้างจากโปรแกรมในเครื่อง Flow cytometer โดยเซลล์ที่เติมวัคซีนและไม่เติมวัคซีน ที่อยู่ในสภาวะที่ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี (unstained) สภาวะที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม (Isotype Control) จะตั้งค่าให้มี % positive น้อยกว่า 1 และถ้า % positive มากกว่าหรือเท่ากับ 1 แสดงว่าเซลล์สามารถผลิตโปรตีนหนามได้ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กราฟ Histogram แสดงผลการวิเคราะห์ % positive ที่แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีการติดสารเรืองแสงที่สภาวะการย้อมแอนติบอดีที่แตกต่างกัน ในเซลล์ที่เติมวัคซีน mRNA ปริมาณ 30 ไมโครกรัม A) สภาวะที่ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี (unstained-30), B) สภาวะที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม (Isotype Control-30) และ C) สภาวะย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม (S protein PE-30)

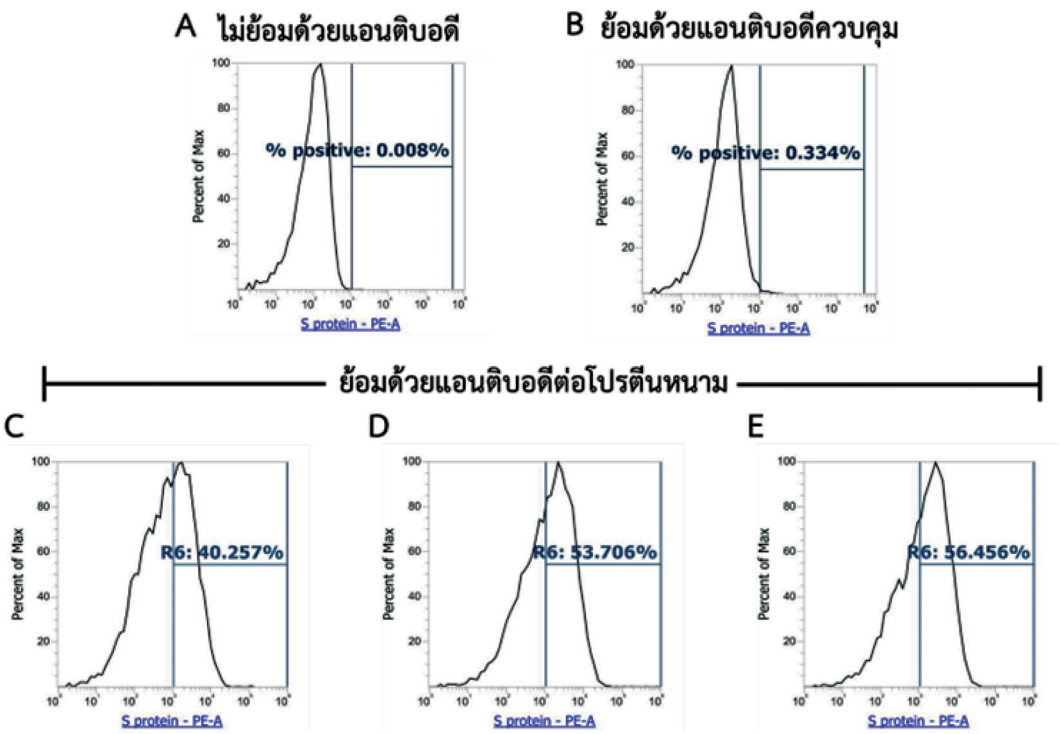
การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของวิธีการวิเคราะห์โปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ 293FT ด้วยเทคนิค Flow cytometry

กำหนดให้ใช้ปริมาณ mRNA ในตัวอย่างเท่ากับ 30 ไมโครกรัม ซึ่งเท่ากับปริมาณที่แนะนำใน 1 โดส และมีพารามิเตอร์ในการทดสอบตาม ICH guideline หัวข้อความจำเพาะ (Specificity) ของวิธี[10] โดยพิจารณา % positive ของเซลล์ในแต่ละตัวอย่างจากวัคซีน mRNA จำนวน 1 รุ่นการผลิต ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เกณฑ์การตัดสินผลกำหนดให้ค่า % positive ของเซลล์ควบคุมหรือการทดสอบที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม (Human IgG1 Kappa Isotype Control Isotype Control) ต้องมีค่าน้อยกว่า 1% เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีการและแอนติบอดีที่ใช้สามารถตรวจหาและมีความจำเพาะต่อโปรตีนหนาม ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายของวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA เพื่อให้สามารถระบุเอกลักษณ์ของวัคซีนดังกล่าวได้

ผล

ผลการศึกษาปริมาณ mRNA ที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนหนามบนผิวของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT

จากการตรวจวิเคราะห์โปรตีนหนามบนผิวของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่มีการเติมวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA ที่มีปริมาณ mRNA 15, 30 และ 60 ไมโครกรัม พบว่ามี % Positive cells เฉลี่ยเท่ากับ 40.26, 53.71 และ 56.46 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟ Histogram แสดงผลการวิเคราะห์ % positive ที่แสดงจำนวนเซลล์ที่มีการติดสารเรืองแสง A) เซลล์ที่เติมวัคซีน 30 ไมโครกรัม ที่ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี, B) เซลล์ที่เติมวัคซีน 30 ไมโครกรัม ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม, C) เซลล์ที่เติมวัคซีน 15 ไมโครกรัม ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม, D) เซลล์ที่เติมวัคซีน 30 ไมโครกรัม ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม และ E) เซลล์ที่เติมวัคซีน 60 ไมโครกรัม ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม

ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของวิธีการวิเคราะห์โปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ 293FT ด้วยเทคนิค Flow cytometry

ผลวิเคราะห์โปรตีนหนามที่แสดงออกในเซลล์ 293FT พบว่าเซลล์ที่มีการเติมวัคซีนโรคโควิด 19 ชนิด mRNA ปริมาณ 30 ไมโครกรัม และย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม มีค่า % Positive cells เฉลี่ยเท่ากับ 47.045% ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีการเติมวัคซีนและย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม แสดงค่า % Positive cells เฉลี่ยเท่ากับ 0.808% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ตัดสิน (น้อยกว่า 1%)

ผลที่ได้จากเซลล์ที่มีการเติมวัคซีนแต่ไม่มีการย้อมด้วยแอนติบอดีหรือย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม ให้ค่า % Positive cells น้อยกว่า 1% เหมือนกับผลที่ได้จากเซลล์ที่ไม่มีการเติมวัคซีนในทุกสภาวะการย้อม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาและแอนติบอดีต่อโปรตีนหนามมีความจำเพาะในการตรวจติดตามเซลล์ที่มีโปรตีนหนามเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ % Positive cell ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่มีการแสดงออกของโปรตีนหนามในแต่ละกลุ่มทดสอบที่สภาวะต่าง ๆ

กลุ่มทดสอบ	ตัวอย่าง	เกณฑ์การตัดสิน (% Positive cell)	(% Positive cell)			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
			1	2	3		
เซลล์ที่เติมวัคซีนโรคโควิด 19 ชนิด mRNA	ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี	< 1%	0.118	0.009	0.070	0.066	0.055
	ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม	< 1%	0.112	0.159	0.429	0.233	0.171
	ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม	≥ 1%	57.756	33.938	49.442	47.045	12.089
เซลล์ที่ไม่เติมวัคซีนโรคโควิด 19 ชนิด mRNA	ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี	< 1%	0.518	0.035	0.097	0.217	0.263
	ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม	< 1%	0.287	0.445	0.554	0.429	0.134
	ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม	< 1%	0.939	0.705	0.781	0.808	0.119

วิจารณ์

การใช้เทคนิค Flow cytometry ในศึกษาการแสดงออกของโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ที่ได้จากการแปลรหัส mRNA ในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น มีการนำเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดมาใช้ในการวิจัยต่าง ๆ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของงาน รวมทั้งแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาต้องมีความจำเพาะต่อโปรตีนหนาม มีการรายงานการใช้แอนติบอดี โคลน CR3022 ในการศึกษาของ Corbett KS และคณะ โดยเป็นการศึกษาสารพันธุกรรมดัดแปลงชนิด mRNA (mRNA-1273) ซึ่งนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 พบว่าเมื่อเหนี่ยวนำ mRNA ดัดแปลงดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง HEK293T และวิเคราะห์โปรตีนหนามบนผิวเซลล์โดยเครื่อง Flow cytometer พบว่าเซลล์สามารถผลิตโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ได้ และโปรตีนที่ได้มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้[11] นอกจากนี้มีรายงานการใช้แอนติบอดี โคลน CR3022 ในงานวิจัยของ Rauch S และคณะ ที่ศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนหนามที่ได้จากการแปลรหัส mRNA ที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa และทำการวิเคราะห์การแสดงออกโปรตีนทั้งภายในเซลล์และบนผิวเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนหนามส่วนใหญ่ที่ผลิตจาก mRNA ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นนั้นมีการแสดงออกบนผิวเซลล์[12] จากการทบทวนข้อมูล พบว่าแอนติบอดี โคลน CR3022 เป็นแอนติบอดีที่ทำให้เกิด Neutralization โดยจำเพาะต่อโปรตีนหนามตำแหน่ง S1[13] ซึ่งเหมาะแก่การนำมาวิเคราะห์เอกลักษณ์และความเป็นไปได้ของโปรตีนหนามที่พัฒนาขึ้นว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ วัคซีน mRNA ที่ผลิตในระหว่าง ปี พ.ศ. 2564-2565 ยังเป็นวัคซีนที่ผลิตขึ้นต่อโปรตีนหนามแบบ full-length ของสายพันธุ์ดั้งเดิม ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยทดสอบการแสดงออกของโปรตีนหนามเฉพาะบนผิวเซลล์เท่านั้น โดยตำแหน่งโปรตีนหนามสามารถอยู่บนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ได้ขึ้นกับการออกแบบ mRNA ที่ผู้ผลิตพัฒนาขึ้น ทั้งนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของวัคซีน ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ในอนาคตสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของโปรตีนหนามทุกตำแหน่งของเซลล์ได้ โดยสามารถเพิ่มขั้นตอนในการเจาะเซลล์และย้อมภายในเซลล์

ในการหาปริมาณ mRNA ที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยใช้ mRNA ปริมาณต่างกันตั้งแต่ 0.004-60.0 ไมโครกรัม ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เพื่อให้ครอบคลุมโดสที่แนะนำของวัคซีนที่ใช้ในการศึกษา พบจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดโปรตีนหนามแปรผันโดยตรงกับปริมาณ mRNA ที่เติมลงไป โดยปริมาณ mRNA ที่ 30 ไมโครกรัม สามารถให้ผลการทดสอบที่สม่ำเสมอและให้ผลที่ไม่แตกต่างจากปริมาณ mRNA ที่ 60 ไมโครกรัม และที่ปริมาณ mRNA เท่ากับ 30 ไมโครกรัม เป็นปริมาณที่แนะนำใน 1 โดส ของวัคซีนที่ใช้ในการวิจัยนี้

การศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีมีความสำคัญต่อการระบุเอกลักษณ์ ตัวอย่างที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม (Human IgG1 Kappa Isotype Antibody Control) ถูกนำมาใช้ในการพิจารณาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม เพื่อเป็นการยืนยันว่า % Positive cell ที่ได้เกิดขึ้นเกิดจากการจับกันแบบจำเพาะระหว่างโปรตีนกับแอนติบอดี ไม่ได้เกิดจากการเรืองแสงของพื้นหลัง (background fluorescence)[14] Isotype Antibody Control เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะกับโปรตีนหนาม แต่มี isotype เดียวกันกับแอนติบอดีจำเพาะที่ใช้ในการทดสอบ โดยเป็นการยืนยันว่าเซลล์กับแอนติบอดีไม่มีการจับกันแบบไม่จำเพาะที่เกิดจาก Fc receptor ของเซลล์จับกับบริเวณ Fc domain ของแอนติบอดี[15,16] โดยเมื่อพิจารณาสภาวะที่เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับวัคซีน เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะเปรียบเทียบกับแอนติบอดีควบคุม พบว่ามีค่า % Positive cells ต่างกัน 201.62 เท่า แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ใช้มีความจำเพาะต่อโปรตีนหนาม

เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT สามารถผลิตโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ได้ เมื่อได้รับวัคซีน mRNA เท่านั้น เนื่องจากโปรตีนหนามเป็นโปรตีนของไวรัสและไม่พบในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมตามธรรมชาติ ดังนั้นเมื่อพิจารณาสภาวะที่มีการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนหนาม พบว่า % Positive cells ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงที่เติมวัคซีนเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมวัคซีนซึ่งเป็นเซลล์ควบคุม มีค่าต่างกัน 58.20 เท่า แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการผลิตและแสดงออกของโปรตีนหนามบนผิวเซลล์ได้เมื่อได้รับวัคซีน mRNA เท่านั้น

จากการศึกษาข้างต้น วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการระบุเอกลักษณ์ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA โดยการพิสูจน์โปรตีนหนามได้อย่างมีความจำเพาะ วิธีดังกล่าวสามารถนำมาตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เพื่อยืนยันเอกลักษณ์วัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA ที่นำมาขึ้นทะเบียนหรือเพื่อวัตถุประสงค์อื่น ๆ โดยไม่จำเป็นต้องมีสารมาตรฐานอ้างอิงหรือวิธีการของผู้ผลิต ซึ่งเป็นข้อจำกัดในช่วงที่เกิดการระบาดของโรคโควิด 19 ในช่วงที่ผ่านมา นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังมีแนวโน้มที่จะขยายขอบข่ายในการนำมาพิจารณาคุณลักษณะด้านความแรงของวัคซีน ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยเพิ่มการทวนสอบวิธีในพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องตามแนวทาง ICH Q2 ได้ และสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากการพัฒนาวิธีนี้มาประยุกต์และเป็นแนวทางในการตรวจสอบเอกลักษณ์และค่าความแรงของวัคซีน mRNA ที่ใช้ป้องกันโรคชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ระหว่างการวิจัยและพัฒนาได้ต่อไปในอนาคต

สรุป

จากผลการศึกษาพบว่าวิธี Flow cytometry ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจติดตามเซลล์ 293FT ที่ผลิตโปรตีนหนามของไวรัส SARS-CoV-2 ได้ จึงอาจใช้เป็นวิธีในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีน COVID-19 ชนิด mRNA โดยมีความจำเพาะต่อโปรตีนหนามในตัวอย่างวัคซีน ทั้งนี้ผู้วิจัยมีเป้าหมายที่จะพัฒนาวิธีดังกล่าวให้เป็นวิธีมาตรฐานที่สามารถใช้ได้กับทุกผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปแบบวัคซีน mRNA ในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.สุภาพร ภูมิอมร ผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้คำปรึกษา และขอขอบคุณทุนสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในการสนับสนุนงานวิจัยนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Al-Jighefee HT, Najjar H, Ahmed MN, Qush A, Awwad S, Kamareddine L. COVID-19 vaccine platforms: challenges and safety contemplations. Vaccines 2021; 9(10): 1196. (38 pages).
2. Martínez-Flores D, Zepeda-Cervantes J, Cruz-Reséndiz A, Aguirre-Sampieri S, Sampieri A, Vaca L. SARS-CoV-2 vaccines based on the spike glycoprotein and implications of new viral variants. Front Immunol 2021; 12: 701501. (21 pages).

3. van Riel D, de Wit E. Next-generation vaccine platforms for COVID-19. Nat Mater 2020; 19(8): 810–2.
4. Fang E, Liu X, Li M, Zhang Z, Song L, Zhu B, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. Signal transduct Target Ther 2022; 7(1): 94. (31 pages).
5. Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, Foged C, Thakur A. Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines. Pharmaceutics 2020; 12(2): 102. (27 pages).
6. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations. WHO Technical Report Series No. 1039. Geneva: World Health Organization; 2022. p. 85-154.
7. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci 2012; 4(9): 429-34.
8. Maity B, Sheff D, Fisher RA. Immunostaining: detection of signaling protein location in tissues, cells and subcellular compartments. Methods Cell Biol 2013; 113: 81-105.
9. Mizrahi O, Ish Shalom E, Baniyash M, Klieger Y. Quantitative flow cytometry: concerns and recommendations in clinic and research. Cytometry B Clin Cytom 2018; 94(2): 211-8.
10. International Conference on Harmonization Guideline on validation of analytical procedures: text and methodology (ICH Q2(R1)). In: European pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2023. p. 723-726.
11. Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. Nature 2020; 586(7830): 567-71.
12. Rauch S, Roth N, Schwendt K, Fotin-Mleczek M, Mueller SO, Petsch B. mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine candidate CVnCoV induces high levels of virus-neutralising antibodies and mediates protection in rodents. NPH Vaccines 2021; 6(1): 57. (9 pages).
13. Huo J, Zhao Y, Ren J, Zhou D, Duyvesteyn HM, Ginn HM, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by destruction of the prefusion spike. Cell Host Microbe 2020; 28(3): 445-54.
14. Hulspas R, O'Gorman MR, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom 2009; 76(6): 355-64.
15. มงคล เหล่าอารยะ. การใช้ flow cytometry ในงานวิจัยด้านการแพทย์และทางคลินิก. เชียงใหม่เวชสาร 2557; 53(2): 99-109.
16. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic multicolor flow cytometry. Curr Protoc Immunol 2017; 117(1): 5.4.1-38.

Development for Analysis of the SARS-CoV-2 Spike Protein in 293FT Cells by Flow Cytometry for Identity Determination of the mRNA COVID-19 Vaccines

Puthita Chokreansukchai, Achira Namjan, and Wipawee Wongchana
Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Regarding national quality control of vaccines and biological products, the Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Thailand, developed a method to determine the identity of the mRNA COVID-19 vaccine. In this study, it was demonstrated that treating the mRNA COVID-19 vaccine in 293FT cell cultures induced the expression of the SARS-CoV-2 spike protein, which could be detected by a specific antibody using flow cytometry. The amount of mRNA added varied with the number of cells containing the spike protein. Additionally, the antibody used was specific to the spike protein compared to the antibody control. The method demonstrated that 30 micrograms of mRNA vaccine increased the percentage of cell-expressed spike protein to approximately 47%, compared to untreated cells or the control group, which showed less than 1% positive cell expression. This method was successful in determining the identity of the mRNA COVID-19 vaccine. It is also expected that this developed method will be a standardized assay that can be used with other products in the form of mRNA vaccines in the future.

Keywords: COVID-19 vaccine, mRNA vaccine, Spike protein, Flow cytometry, 293FT cells