RESEARCH ARTICLE

Cloning and Expression of M1 Protein of Influenza A Virus in *Escherichia coli*

Jinpanee Na nakorn[1], Porntippa Lekcharoensuk[2], Orawan Boodde[3], Wilairat Chumsing[3], Worawidh Wajjwalku[1,4*]

Abstract

Objective — Influenza A virus can cause outbreaks of acute respiratory disease in a wide range of avian and mammalian species. Thus, the aim of this study was to clone and express recombinant M1 protein of influenza A viruses in *E. coli* for further development of laboratory diagnosis of the virus.

Materials and Methods — The viral RNA was extracted from swine influenza viruses subtype H3N2 infected cells. The extracted viral RNA was used as template for gene *M1* by RT-PCR using specific primer. The gene *M1* was ligated into the pQE30 before transformed into *E. coli* strain M15. The recombinant M1 protein was tested by western blot analysis, and expressed as antigen for production of polyclonal antibodies in a rabbit. The polyclonal antibodies were then evaluated by dot blotting and immunoperoxidase monolayer assay.

Results — We successfully cloned gene *M1*. This gene can express in *E. coli* yielding recombinant M1 protein. When the recombinant *M1* protein was injected in a rabbit, polyclonal antibodies against the protein were produced. The polyclonal antibodies can use to detect influenza A virus in infected cells.

Conclusion — The recombinant M1 protein and the polyclonal antibodies could be further developed for diagnosis of influenza A virus.

KKU Vet J. 2008;18(2):97-108 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords: Influenza A virus; Swine; Recombinant M1 protein; Diagnosis

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Nakhon Pathom, Thailand, 73140.
[2] Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 10900.
[3] Department of Farm Resources and Production Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhon Pathom, Thailand, 73140.
[4] Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 10900.
* **Corresponding author** E-mail address: fvetwww@yahoo.com

การโคลนและการแสดงออกของโปรตีน M1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ใน *Escherichia coli*

จินต์ภาณี ณ นคร[1], พรทิพภา เล็กเจริญสุข[2], อรวรรณ์ บุตรดี[3], วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์[3], วรวิทย์ วัชชวัลคุ[1,4*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคติดต่อระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน ทั้งในสัตว์ปีก และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อทำการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม M1 ใน E. coli เพื่อการพัฒนาการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสัตว์

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ สกัดอาร์เอนเอจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ย่อย H3N2 ในสุกร เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *M1* ของไวรัส ด้วยวิธีการ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะ แล้วนำชิ้นส่วนของยีน *M1* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pQE30 ถ่ายพลาสมิดลูกผสมที่ได้เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสม M1 ทำการตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนลูกผสมดังกล่าวด้วยวิธี western blot analysis แล้วนำไปฉีดกระต่ายเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ตรวจสอบแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี dot blotting และวิธี immunoperoxidase monolayer assay

ผลการศึกษา ยีน *M1* ถูกโคลนได้สำเร็จ และเมื่อยีนดังกล่าวแสดงออกใน *E. coli* ทำให้เกิดการผลิตโปรตีนลูกผสม M1 ได้ และเมื่อนำไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย พบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้

ข้อสรุป โปรตีนลูกผสม และแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำมาพัฒนา สำหรับการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ต่อไป

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2551;18(2):97-108 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สุกร โปรตีนลูกผสม M1 การวินิจฉัย

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900

[3] ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[4] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900

* **ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail address: fvetwww@yahoo.com

บทนำ

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus) จัดอยู่ในวงศ์ *Orthomyxoviridae* แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดเอ บี และซี ตามลักษณะของไวรัสแอนติเจนชนิด matrix protein (M1) และ nucleoprotein (NP) โดยชนิดเอ ทำให้เกิดโรคทางระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันในสัตว์หลายชนิด [1] เช่น ในมนุษย์ สัตว์ปีก สุนัข แมวน้ำ ม้า และสุกร ซึ่งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สามารถแบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อย (sub-type) ตามคุณสมบัติทางแอนติเจนของ hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA) ซึ่งมี HA 16 ชนิด และ NA 9 ชนิด สำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี และซี ส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ ไม่มีสายพันธุ์ย่อย แต่พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี ยังสามารถแยกได้จากแมวน้ำ [2] ส่วนเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดซี ยังสามารถแยกได้จากสุกร [3] อีกด้วย ลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร ความยาวของจีโนม 13.5 กิโลเบส เป็น RNA ไวรัสสายเดี่ยวมีเยื่อหุ้ม [4] ลักษณะเป็นแท่งจำนวน 8 แท่ง ซึ่งสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ 10 ชนิด คือ polymerase basic 2 (PB2), polymerase basic 1 (PB1), polymerase acid (PA), HA, NP, NA, matrix protein (M1), ion-chanel protein (M2), non structural protein 1 (NS1) และ non structural protein 2 (NS2) [5].

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคทางระบบหายใจแบบเฉียบพลันทั้งในสัตว์ปีก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เมื่อไม่นานมานี้ พบว่ามีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกจากในทวีปเอเชีย และแพร่ระบาดจากทวีปเอเชียไปสู่ทวีปอื่นๆ [6] ซึ่งก่อปัญหาทางสาธารณสุขทั่วโลก ในประเทศไทยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ นอกจากจะแพร่ระบาดในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกแล้ว ยังมีการติดต่อไปยังคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น สำหรับในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยพบว่ามีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ เช่นกัน แต่เป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสุกรสายพันธุ์ย่อย H1N1 และ H3N2 [7-9] สุกรที่เป็นโรคจะแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจคล้ายกับคนที่เป็นหวัด สุกรจะมีไข้สูง เบื่ออาหาร น้ำหนักลด อาการจะรุนแรงมากเมื่อมีการติดเชื้อแทรกซ้อน อาจจะทำให้สุกรตาย หรือแท้งได้ในแม่สุกรที่มีไข้สูง เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จึงเป็นเชื้อไวรัส ที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจต่อทั้งอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกและสุกรเป็นอย่างมาก ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็นอย่างมากต่อการกำหนดแนวทางในการควบคุมและแก้ปัญหาโรคดังกล่าว

จากการศึกษาโครงสร้างส่วนต่างๆ ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ทำให้ทราบว่าส่วน Matrix protein (M) เป็นโปรตีนที่อยู่ภายใต้ชั้น envelope มีหน้าที่ในการทำโครงสร้างของอนุภาคไวรัสให้มีความแข็งแรง คงรูปร่าง และยังใช้ในการแยกชนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ออกเป็นชนิดเอ บี และซี ซึ่ง M เป็นสายพันธุกรรมแท่งที่ 7 โดย M มีความยาวประมาณ 1027 นิวคลีโอไทด์ มีกรอบการอ่านรหัสของโปรตีนที่เป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัส โปรตีน M1 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 252 ตัว และ M2 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 97 ตัว ในการศึกษานี้เราได้ทำการสังเคราะห์ โปรตีน

ลูกผสม M1 ใน *E.coli* สายพันธุ์ M15 โดยโคลนจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในสุกร (Swine Influenza Virus, SIV) สายพันธุ์ย่อย H3N2 ซึ่งใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาต่อและการพัฒนาการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในสัตว์ต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การสังเคราะห์ยีน M1 ด้วยเทคนิค ReverseTranscription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

สกัด viral RNA จากเชื้อไวรัส SIV สายพันธุ์ย่อย H3N2 (A/SW/Thailand/KU7.2/04) ที่แยกได้ในประเทศไทยในปี 2004 จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยใช้ Trizol® (Invitrogen) นำ RNA ที่สกัดมาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ cDNA และเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะ ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีน M1 คือ McloneSIV1 (5' CGC GGA TCC GGT CCC CTC AAA GCC 3') และ McloneSIV2 (5'CGG GGT ACC TCA CTT GAA TCG CTG 3') สำหรับการสังเคราะห์ยีน *M1* ของเชื้อไวรัส SIV ซึ่งไพร์เมอร์ดังกล่าวประกอบด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Kpn*I ตามลำดับ ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 2x reaction mix (Invitrogen) จำนวน 12.5 ไมโครลิตร Forward และ Reverse primer ความเข้มข้น 10 พิกโคโมล อย่างละ 2.5 ไมโครลิตร SuperScrip™III RT/Platinum® *Taq Mix* (Invitrogen) จำนวน 0.5 ไมโครลิตร และ RNA จำนวน 7 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เมื่อมีการสังเคราะห์ cDNA แล้วจะเข้าสู่การทำ PCR โดยทันที ซึ่งปรับอุณหภูมิ pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยเปรียบเทียบกับ standard DNA (DNA marker) โดยใช้ 1.0 % agarose gel เป็นตัวกลางในการทำ electrophoresis และใช้ 1xTA เป็น buffer ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของ PCR product โดยผ่านสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบขนาดภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel document และเก็บ PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการโคลนต่อไป

การโคลนยีน M1 ของเชื้อไวรัส SIV สำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม M1

นำ PCR product โคลนเข้าสู่ TA cloning vector (RBC) โดยทำการเชื่อมกันที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ได้เป็น pTA_M1 นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีทางเคมี (Chemical transformation) ทำการตรวจสอบโคลนด้วยวิธี Blue-White colony คุณสมบัติต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) วิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน และยืนยันความถูกต้องของยีนโดยการหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA sequencing โดยวิธี dideoxy

chain termination เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีรายงานใน Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม Bioedit version 7.0.9.0 จากนั้นเลี้ยง *E.coli* ในอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis method [10] นำยีนเป้าหมายโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pQE30 โดยนำพลาสมิด pTA_M1 และ pQE30 ที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ออกแบบไว้ที่ปลาย 5′ และ 3′ ของยีน คือ *Bam*HI และ *Kpn*I หลังจากนั้นเชื่อมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันตามวิธีข้างต้นเพื่อสร้างพลาสมิด pQE30_M1 นำพลาสมิด pQE30_M1 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี transformation แล้วทำการคัดเลือกโคลนจากคุณสมบัติต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และวิธี PCR

การผลิตและการตรวจสอบโปรตีนลูกผสม M1

เลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pQE30_M1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดถ่ายเข้าสู่เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ทำการทดสอบและคัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกไปสังเคราะห์โปรตีน โดยเลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีพลาสมิด pQE30_M1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มียาปฏิชวนะแอมพิซิลิน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ กานามัยซิน (kanamycin) ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเครื่อง shaking incubator ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วทำการเลี้ยงต่อลงในอาหารชนิดเดียวกันในสัดส่วน 1:50 เลี้ยงต่อไปที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมล และนำไปเลี้ยงต่อนาน 3 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ไปตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีน โดยใช้การเคลื่อนที่ของโปรตีนใน 15% SDS-PAGE ผ่านสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 90 โวลต์ นาน 120 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย Coomassie Brilliant blue (Fisher Biotech) และเปรียบเทียบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้กับ standard protein (Protein ladder)

การทำ Western blot analysis

ทำการตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนลูกผสม M1 (recombinant M1 protein) ที่ผลิตได้โดยวิธี western blot นำ โปรตีนลูกผสม M1 มาแยกขนาดด้วย 15% SDS-PAGE โดยผ่านสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 90 โวลต์ นาน 120 นาที ทำการย้ายโปรตีนจากเจลลงในแผ่นเยื่อไนโตรเซลลูโลสด้วยเครื่อง transfer gel ด้วยกระแสไฟฟ้า 250 มิลลิแอมแปร์ นาน 3 ชั่วโมง นำส่วนของเจลไปย้อมด้วย Coomassie Brilliant blue (Fisher Biotech) เพื่อตรวจสอบการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากเจลไปยังแผ่นเยื่อไนโตรเซลลูโลส จากนั้นนำแผ่นเยื่อไนโตรเซลลูโลสไปตรวจสอบด้วยการทำ blotting โดยจะบล็อกแผ่นเยื่อไนโตรเซลลูโลสด้วย 10% skim milk (10% dry skim milk ใน 1x PBST) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำแผ่นเยื่อไนโตรเซลลูโลสมาตัดแบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรก

นำมาบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ในเซรุ่มของสุกรที่ปกติ และที่มีแอนติบอดีต่อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งใช้เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) โดยทำการเจือจางเซรุ่มสุกรที่อัตราส่วน 1:200 และใช้ Protein G เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ในอัตราส่วน 1:500 ส่วนกลุ่มที่สองนำมาบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ในเซรุ่มของไก่ที่ปกติ และที่มีแอนติบอดีต่อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งใช้เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ โดยทำการเจือจางเซรุ่มไก่ที่อัตราส่วน 1:200 และใช้ goat anti chicken IgY HRP เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ ในอัตราส่วน 1:500 และใช้ DAB (3,3′ Diaminobenzidine tetrahydrochloride dehydrate) เป็น substrate ทิ้งไว้จนเกิดสี และหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น [11]

การกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในกระต่ายและการตรวจสอบแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม M1 และเซลล์ติดเชื้อ

นำโปรตีนลูกผสม M1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) ผสมกับ complete Freund's adjuvant (SIGMA®) อัตราส่วน 1:1 ฉีดเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในกระต่าย โดยฉีดกระตุ้นภูมิทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ หลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 3 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงทำการเก็บเซรุ่มของกระต่ายเพื่อนำมาตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม M1 โดยวิธี dot blotting เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างเซรุ่มกับตัวเจือจาง (diluent) ที่เหมาะสมที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับแอนติเจน โปรตีนลูกผสม M1 โดยเริ่มจาก 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 และ 1:12800 โดยใช้ goat anti-rabbit peroxidase (ZYMEDTM) เจือจางที่อัตราส่วน 1:500 เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ และใช้ DAB เป็น substrate หลังจากนั้นทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส SIV สายพันธุ์ย่อย H3N2 ด้วยวิธี Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) โดยทำการย่อยเซลล์เพาะเลี้ยง Madin-Darby Canine Kidney Cells (MDCK) ที่ติดเชื้อไวรัส SIV สายพันธุ์ย่อย H3N2 ให้หลุดเป็นเซลล์เดี่ยวๆด้วย 0.1% trypsin จากนั้นเติม 1X PBS นำสารละลายทั้งหมดไปปั่นที่ 1500 rpm นาน 5 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ไปเกลี่ยลงบนสไลด์คู่กับเซลล์ควบคุม ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์ไปแช่ใน 4% formalin นาน 10 นาที ย้ายสไลด์ไปแช่ใน 0.5% saponin นาน 10 นาที จากนั้นเติมเซรุ่มที่กระตุ้นได้จากกระต่าย ในอัตราส่วน 1:400 เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และใช้ goat anti-rabbit peroxidase เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิในอัตราส่วน 1: 500 จากนั้นเติม DAB เป็น substrate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10-15 นาที แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อ่านผลเซลล์ที่ติดเชื้อจะให้สีน้ำตาลแดง

ผลการศึกษา

การสังเคราะห์และการโคลนยีน M1

จากการทำ RT-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *M1* ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้น พบว่าได้ PCR product ที่มีขนาด 702 bp **(Figure 1)** และเมื่อนำ PCR product ที่ได้โคลนลงใน TA

cloning kit และ transform ลงใน *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด โดยดูจากสีของโคโลนีที่ได้สีขาว (Blue-White colony) และสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จากนั้นนำโคโลนีสีขาวนั้นมาตรวจสอบยืนยันว่ามียีน *M1* แทรกอยู่จริงโดยทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *M1* เพื่อยืนยันผล และหาลำดับลำดับเบสของโคลนที่ได้โดยตรวจสอบลำดับเบส พบว่าไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR มีความจำเพาะต่อยีน M1 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ทำการยืนยันผลลำดับเบสของ PCR product และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ที่แยกได้จากสุกร สายพันธุ์ย่อย H3N2 (DQ186981) สุกรป่า สายพันธุ์ย่อย H3N2 (AM746618) ไก่งวง สายพันธุ์ย่อย H1N1 (Z26859) มนุษย์ สายพันธุ์ย่อย H1N2 (EF101742) และจากไก่ สายพันธุ์ย่อย H5N1 (DQ997124) ซึ่งมีรายงานในฐานข้อมูล Genbank พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายคลึงประมาณ 93-97% ส่วนลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันประมาณ 97-99% **(Figure 2)** และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของไข้หวัดใหญ่ชนิดบี และซี มาเปรียบเทียบพบมีความคล้ายคลึงเพียง 46.7% และ 30.2% ตามลำดับ (ไม่แสดงผล)

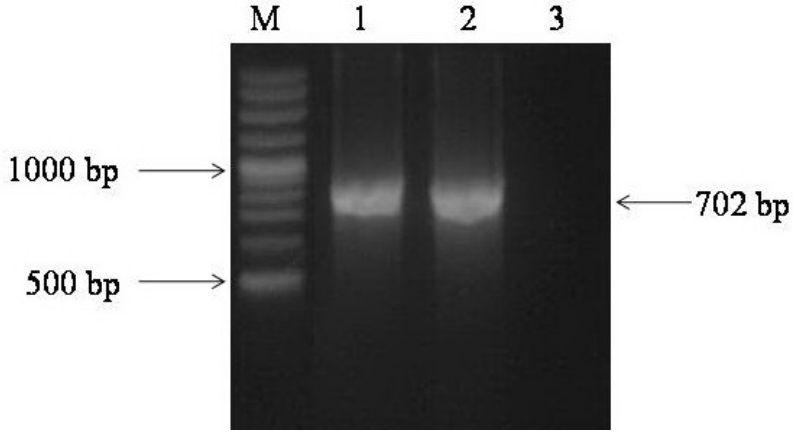

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of M1 gene: Lane M = standard marker (100 bp), lane 1-2 = 702 bp of M1 gene, lane 3 = negative control.

การผลิตและการประเมินความจำเพาะของโปรตีนลูกผสม M1

จากการเลี้ยงเชื้อ *E.coli* เพื่อสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I และโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pQE30 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน แล้วทำการถ่ายพลาสมิดลูกผสม pQE30_M1 เข้า *E coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด และ ทำการถ่ายต่อลงใน *E coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนลูกผสม M1 พบว่ามีการสร้างโปรตีนซึ่งมีขนาดประมาณ 26 kDa **(Figure 3)** โปรตีนที่สร้างจาก *E. coli* ครั้งนี้ให้โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น inclusion body เนื่องจากแถบโปรตีนปรากฏชัดเจนอยู่ในตะกอนเซลล์ซึ่งเป็นตัวแทนของ inclusion body เมื่อตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE เมื่อนำโปรตีนลูกผสม M1 ไปตรวจสอบความจำเพาะด้วยวิธี

Western blot พบว่าเกิดแถบสีน้ำตาลตรงตำแหน่งประมาณ 26 kDa ของเซรุ่มสุกรและไก่ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ แต่ไม่ขึ้นแถบสีน้ำตาล ในเซรุ่มสุกรและไก่ที่ปกติ **(Figure 4)**

```
                    10        20        30        40        50        60        70
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DQ997124    GPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPSERGLQRRRFVQNALNGN
EF101742    ..........................................................................
Z26859      ..........................................................................
AM746618    ..........................................................................
DQ186981    ..........................................................................
Clone M gene ........................................................................

                    80        90       100       110       120       130       140
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DQ997124    GDPNNMDRAVKLYRKLKREITFHGAKEVALSYSTGALASCMGLIYNRMGTVTTEVAFGLVCATCEQIADS
EF101742    .............K..............S.......................................
Z26859      .............K..............S.......................................
AM746618    .............K..............S.......................................
DQ186981    .............K..............S.......................................
Clone M gene .............K..............S.......................................

                   150       160       170       180       190       200       210
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DQ997124    QHRSHRQMVTTTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAAEAMEVASQARQMVQAMRTIGTHPSSSA
EF101742    ........A..................................D......K.....H.............
Z26859      ........A.............................................H.............
AM746618    ........A.............................................H.............
DQ186981    ........A.............................................H.............
Clone M gene ........A.......................................N.T....H.............

                   220       230
            ....|....|....|....|....|.
DQ997124    GLKDDLLENLQAYQKRMGVQMQRFK*
EF101742    ....................I....*
Z26859      ....................I....*
AM746618    ....................I....*
DQ186981    ....................I....*
Clone M gene ....................I....*
```

Figure 2. Amino acid sequence alignment of M1 gene from PCR amplification compare with the sequence of A/swine/Leipzig/145/92(H3N2) (DQ186981), A/wild boar/Germany/WS169/2006(H3N2) (AM746618), A/turkey/Germany/3/91(H1N1) (Z26859), A/Philippines/344/2004(H1N2) (EF101742) and A/chicken/Hubei/wk/1997(H5N1) (DQ997124) from Gen Bank.

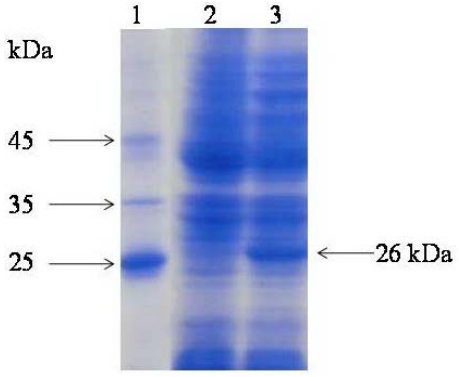

Figure 3. SDS-PAGE analysis of recombinant M1 protein at 26 kDa: Lane 1 = Molecular Weight standard (kDa), lane 2 = non-expression of recombinant M1 protein, lane 3 = expression of recombinant M1 protein.

การกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกระต่ายและตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม M1

เมื่อนำเซรุ่มจากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย โปรตีนลูกผสม M1 มาตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี dot blotting พบว่าเซรุ่มจากกระต่ายสามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับโปรตีนลูกผสม M1 ส่วนการทดสอบหาไตเตอร์ของ hyperimmuneserum จากกระต่ายที่ได้โดยการเจือจางตามลำดับแบบสองเท่า (two-fold serial dilution) จาก 1:100 ถึง 1:12,800 และปล่อยให้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม M1 พบว่า แอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ทุกความเข้มข้น **(Figure 5)**

เมื่อนำแอนติบอดีดังกล่าวมาตรวจสอบการทำปฏิกิริยากับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ย่อย H3N2 ในเซลล์ MDCK ด้วยวิธี IPMA พบว่ามีการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ย่อย H3N2 ที่ อยู่ภายในเซลล์ MDCK จะเห็นได้จากเซลล์ติดเชื้อไวรัสจะมีสีน้ำตาลแดงของ peroxide เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ติดสี **(Figure 6)**

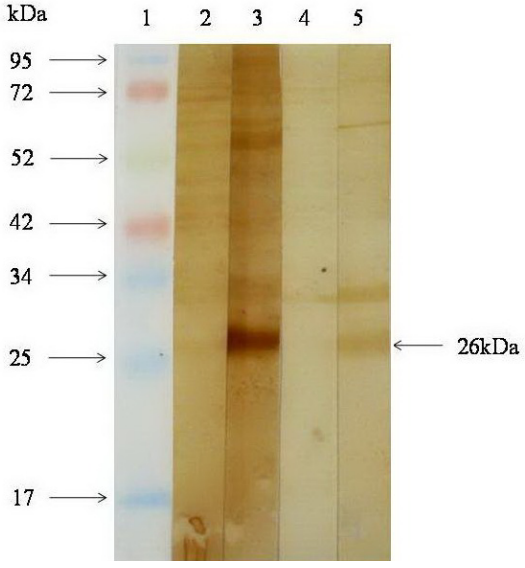

Figure 4. Western blot analysis showed activity of recombinant M1 protein. The lane 1 corresponded to molecular weight standard. The lane 2 was probed with normal chicken serum. The lane 3 was probed with chicken anti-AIV polyclonal antibody. The lane 4 was probed with normal swine serum. The lane 5 was probed with swine anti-SIV polyclonal antibody.

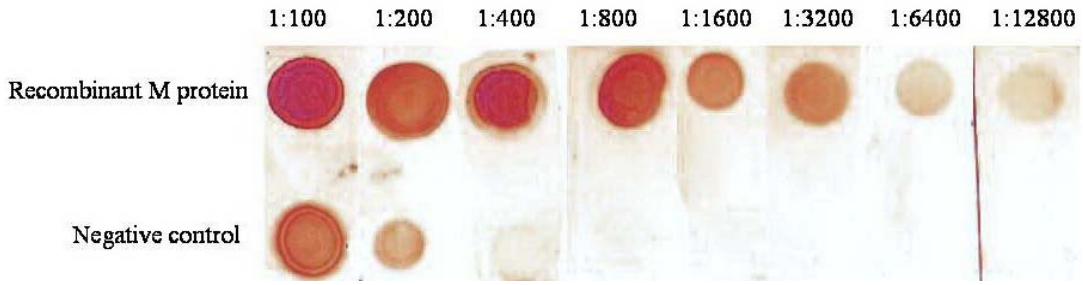

Figure 5. Dot blot analysis with various antibody titer against recombinant M1 protein.

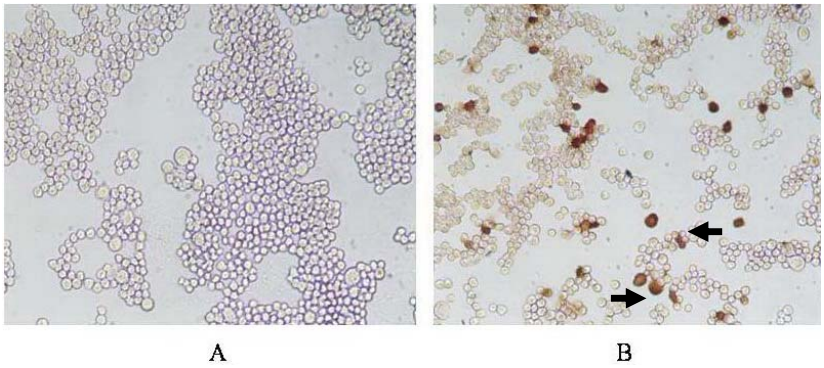

Figure 6. Immunoperoxidase monolayer of rabbit hyper immune sera against recombinant M1 protein. Negative reactivity detected by IPMA (Figure 6A). Positive reaction of rabbit anti-rM1 antibody detected by IPMA (Figure 6B).

วิจารณ์

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษายีนในส่วน M1 จากเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ย่อย H3N2 ซึ่งมีรายงานว่า M1 โปรตีนเป็นโปรตีนที่ใช้แยกชนิดของเชื้อไข้หวัดใหญ่ว่าเป็นชนิดเอ บี หรือซี [4] และเมื่อนำลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับลำดับเบส (multiple alignment) ที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม ClustalW และ BioEdit พบว่าลำดับเบสของยีน M1 และลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีน M1 ของไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในที่มีรายงานใน Genbank ที่เพาะแยกจากในสุกร (DQ186981) สุกรป่า (AM746618) ไก่งวง (Z26859) มนุษย์ (EF101742) และในไก่ (DQ997124) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี และซี มาเปรียบเทียบด้วย พบว่าค่าความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้ระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี และซี กับลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่ายีน M1 ที่ผลิตได้นั้นมีความจำเพาะต่อยีน M1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ มากกว่าชนิดบี และซี

ส่วนโปรตีนลูกผสม M1 ที่ผลิตได้จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ M15 โดยใช้ pQE30 เป็น expression vector ซึ่งในการผลิตโปรตีนลูกผสม M1 นั้น ต้องคำนึงถึงสายพันธุ์ของเซลล์เจ้าบ้าน ชนิดและคุณสมบัติของเวคเตอร์และสภาวะที่เหมาะสม โดยเวคเตอร์ pQE30 นั้นเหมาะสมที่จะนำไปถ่ายลงสู่ *E.coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อกระตุ้นให้ยีนที่แทรกอยู่ในเวคเตอร์ pQE30 มีการสร้างโปรตีนเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีปริมาณสูง โปรตีนลูกผสม M1 ที่ผลิตได้มีคุณสมบัติเป็น inclusion bodies โดยใช้ 8M Urea และ 1% sacokyl ในการละลายโปรตีนก่อนที่จะทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ เมื่อนำโปรตีนลูกผสมไปตรวจสอบความจำเพาะต่อสัตว์ที่มีแอนติบอดีต่อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ พบว่าโปรตีนนี้สามารถที่จะจับกับแอนติบอดีต่อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอได้ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสม M1 นี้มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีของสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ และจากการทดลองนำซีรัมจากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนลูกผสม M1 มาตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี dot blotting พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีกับโปรตีนลูกผสม M1 แสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสม M1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีได้ เมื่อนำแอนติบอดีดังกล่าวมาตรวจสอบการทำปฏิกิริยากับเชื้อไข้หวัดใหญ่สุกร สายพันธุ์ย่อย H3N2 ในเซลล์ MDCK ด้วยวิธี IPMA ให้ผลบวก แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นให้เกิดการผลิตด้วยโปรตีนลูกผสม M1 นั้นสามารถทำปฏิกิริยาได้กับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบ และวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในเซลล์เพาะเลี้ยง ที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อได้ ซึ่งเป็นการวินิจฉัยการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ อีกวิธีหนึ่งที่ให้ความรวดเร็ว และง่ายกว่าวิธีการการเพาะแยกเชื้อจากไข่ฟัก หรือจากเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่มีจำเพาะสูง แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบโดยเฉลี่ยประมาณ 5 วัน แต่อาจนานมากกว่าสัปดาห์หากเชื้อมีปริมาณน้อย [12] งานวิจัยในครั้งนี้มีเป้าหมายหลักในการผลิตโปรตีนลูกผสม M1 ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างของเชื้อไข้หวัดใหญ่ ที่ใช้แยกชนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ว่าเป็นชนิด เอ บี หรือ ซีที่มีความจำเพาะสูง [13-15] เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคให้เกิดความรวดเร็วและถูกต้อง อีกทั้งโปรตีนลูกผสมที่ได้ ยังสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณการผลิตเพื่อให้ได้ตามความต้องการ

ดังนั้นโปรตีนลูกผสมและแอนติบอดีที่ผลิตได้จาก *E. coli* นี้ มีความเหมาะสมและควรที่จะนำไปพัฒนาต่อ เช่นการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโปรตีนลูกผสม M1 และแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ รวมทั้งการพัฒนาการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ด้วยวิธี ELISA หรือวิธี Immunohistochemistry (IHC) โดยใช้โปรตีนลูกผสม M1 และแอนติบอดีที่ผลิตได้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในเบื้องต้นในสัตว์ชนิดต่างๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

1. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chamber TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992;56:152-179.
2. Osterhaus ADME, Rimmelzwaan GF, Martina BEE, Bestebroer TM, Fouchier RAM. Influenza B Virus in Seals. *Science.* 2000;288:1051-1053.
3. Guo Y, Ulrich D. Genome Analysis of Influenza C Viruses Isolated in 1981/82 from Pigs in China. *J Gen Virol.* 1984;65:1857-1872.
4. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *The Viruses and Their Replication.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 1353-1445.
5. Ghendin E, Sengamalay N, Shumway M, Zaborsky J, Feldblyum T, Subbu V, et al. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature.* 2005;437:1162-1166.
6. Songserm T, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N. Domestic Ducks and H5N1 Influenza Epidemic, Thailand. *Emerging Infectious Diseases.* 2006;12:575-581.
7. Kupradinun S, Peanpijit P, Bhodhikosoom C, Yoshioka Y, Endo A, Nerom K. The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. *Arch Virol.* 1991;118:289-297.
8. Nerome K, Ishida M, Nakayama M, Oya A, Kanai C, Suwicha K. Antigenic and genetic analysis of A/Hong Kong (H3N2) influenza viruses isolated from swine and man. *J Gen Virol.* 1981;56:441-445.
9. Parchariyanon S, Damrongwatanapokin S, Pinyochon W, Chuxnum T, Hinjoy S, Choomkasien P. Investigation of influenza A virus infection in pigs from 5 reported AIV outbreak provinces in 2004. *J Thai Vet Med Assoc.* 2006;57:16-25.
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual.* 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
11. Harlow E, Lane D. *Antibodies A Laboratory Manual.* USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988.
12. Shalit I, Mckee PA, Beauchamp H, Waner JL. Comparison of polyclonal antiserum versus monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influenza A virus infection by immunofluorescence in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1985;22:877-879.
13. Lamb RA, Lai CJ. Conservation of influenza virus membrane protein (MI) amino acid sequence and open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in HINI and H3N2 strains. *Virology.* 1981;112:746-751.
14. Buckler-White AJ, Naeve CW, Murphy BR. Characterization of a gene coding for M proteins which is involved in host range restriction of an avian influenza A virus in monkeys. *J Virol.* 1986;57:697-700.
15. Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RJ. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *Virology.* 1991;65:5491-5498.