การเตรียมและการทดสอบเบื้องต้น polyclonal antibodies ในการตรวจหาเชื้อ porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

Preparation and Preliminary Test of Polyclonal Antibodies for Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)

สุรศักดิ์ จิตตวิสุทธิกุล[1] อมรา ทองปาน[2] อรวรรณ บุตรดี[3] วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์[3] วรวิทย์ วัชชวัลคุ[3*]
Surasak Jittavisutthikul[1] Amara Thongpan[2] Orawan Boodde[3] Wilairat Shumsing[3] Worawidh Wajjwalku[3*]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสดังกล่าว โดยใช้ EU และ US-rN protein ซึ่งเป็น recombinant nucleocapsid protein จากเชื้อไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่แสดงออกในเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) และผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นให้เกิดการผลิต polyclonal antibodies ในกระต่าย พบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีได้ จากการทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนด้วยการทำ dot blotting โดยที่ polyclonal antibodies ดังกล่าวนี้สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อ nucleocapsid protein ของเชื้อ PRRSV โดยตรวจสอบด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) และวิธี immunohistochemistry

คำสำคัญ: PRRS, PRRSV, recombinant nucleocapsid protein, แอนติเจน, polyclonal antibodies

Keywords: PRRS, PRRSV, recombinant nucleocapsid protein, antigen, polyclonal antibodies

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Nakhonpathom, 73140

[2] ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900
Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900

[3] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900
Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, 10900

* Corresponding author: E-mail address: fvetwww@yahoo.com Tel. + (66 81) 9811545

Abstract

The aim of this study is the production of polyclonal antibodies for the simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). The recombinant nucleocapsid protein (rN-protein) of EU PRRSV (EU-rN protein) and US PRRSV (US-rN protein) expressed in *Escherichia coli* were partial purified and used as antigens. The polyclonal antibodies were detected the PRRSV by using immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) and immunohistochemistry.

บทนำ

ในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงและมีคุณภาพดีนั้น สุกรต้องมีสุขภาพดีและปราศจากโรคต่างๆ ดังนั้นนอกจากปัจจัยทางด้านอาหารและพันธุ์ของสัตว์แล้ว การป้องกันและจัดการโรคก็เป็นสิ่งจำเป็นและมีความสำคัญอย่างมาก โดยเฉพาะ porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) ซึ่งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจ และที่สำคัญเมื่อสุกรติดโรคดังกล่าวแล้วจะส่งผลให้อยู่ในสภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนที่เป็นอันตรายต่างๆ ได้ด้วย จึงเป็นสาเหตุของความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรอย่างมาก การระบาดครั้งแรกของโรคนี้เกิดขึ้นทางตอนเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1987 (Keffaber, 1989) และในปี ค.ศ. 1990 พบมีการระบาดในประเทศเยอรมันนี และแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปทั่วทวีปยุโรป โรคดังกล่าวนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อ porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ตามลักษณะทางพันธุกรรม คือ สายพันธุ์ North American PRRSV หรือ US PRRSV (Benfield et al., 1992) และ European PRRSV หรือ EU PRRSV (Wensvoort et al., 1991) โดยทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความใกล้เคียงกันทางด้านลำดับเบสและกรดอะมิโนประมาณ 70% เชื้อไวรัสนี้จัดอยู่ในอันดับ (Order) Nidovirales สกุล (Family) Arteriviridae และอยู่ในวงศ์ (Genus) Arterivirus (Cavanagh, 1997; Snijder and Meulenberg, 1998)

มีรายงานว่าในฟาร์มสุกรส่วนใหญ่ของประเทศไทยมีแนวโน้มที่อัตราการติดเชื้อ PRRSV จะเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็นต่อการกำหนดแนวทางในการแก้ปัญหาของโรคดังกล่าว การศึกษานี้จึงได้โคลน nucleocapsid gene (N gene) หรือ ORF7 gene ของเชื้อไวรัส EU PRRSV และ US PRRSV เพื่อ 1) ผลิต recombinant nucleocapsid protein (rN-protein) สำหรับใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย และ 2) เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส PRRSV ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในเนื้อเยื่อที่สงสัยการติดเชื้อดังกล่าวด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) และวิธี immunohistochemistry

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การสังเคราะห์ N gene ด้วยเทคนิค RT-PCR

RNA ที่สกัดได้จากเชื้อไวรัส 2 สายพันธุ์ คือ EU และ US PRRSV ในน้ำเลี้ยงเซลล์ (ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน) ด้วยการใช้ denaturing (D)-solution (Chomezynski and Sacchi, 1987), phenol-chloroform and isopropanol precipitation ถูกนำมาเป็น RNA ต้นแบบ (RNA template) ในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยการทำ reverse transcription โดยใช้ random primer hexamer ที่อุณหภูมิ 25˚C นาน 10 นาที, 42˚C นาน 60 นาที, 70˚C นาน 10 นาที และเก็บ cDNA ที่ 4˚C จากนั้นนำ cDNA ที่ได้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ N gene ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ specific primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับส่วนของ N gene คือ W7EU1 (5′ GGATCCATGGCCGGTAAAAACCAGAG 3′) คู่กับ W7EU2 (5′GTCGACTTGCACCCTGACTGGCGGA 3′) สำหรับการสังเคราะห์ N gene ของเชื้อไวรัส EU PRRSV และใช้ primer W7US1 (5′AGATCTATGCCAAATAACAMCGGCARG3′) คู่กับ W7US2 (5′GGATCCTGCTGAGGGTGATGCTGTG 3′) สำหรับการสังเคราะห์ N gene ของเชื้อไวรัส US PRRSV ซึ่ง primer ดังกล่าวประกอบด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ *Bam*HI, *Sal*I, *Bgl*II และ *Bam*HI ตามลำดับ โดยตั้งอุณหภูมิ predenature ที่ 94˚C นาน 5 นาที, denature ที่ 94˚C นาน 30 วินาที, annealing ที่ 53˚C นาน 30 วินาที, extension ที่ 72˚C นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72˚C นาน 7 นาที นำ PCR product มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

การโคลน N gene ของเชื้อไวรัส EU และ US PRRSV

นำ PCR product ของเชื้อไวรัส EU และ US PRRSV โคลนลงใน pDrive vector โดยทำ ligation ที่อุณหภูมิ 15˚C นานข้ามคืน ให้ได้เป็น pDrive_7EU และ pDrive_7US ซึ่งจะถูกถ่ายเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยการทำ transformation ทำการตรวจสอบโคลนจากคุณสมบัติต้านยาปฏิชีวนะ ampicillin และทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน หลังจากนั้นจึง subclone ดังนี้คือ pDrive_7EU ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Bam*HI และ *Sal*I ส่วน pDrive_7US ถูกตัดเอ็นไซม์ *Bgl*II และ *Bam*HI เพื่อโคลนเข้าสู่ pQE30 expression vector ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI กับ *Sal*I สำหรับเชื่อมต่อกับ EU-N gene และ *Bam*HI เพียงชนิดเดียวเพื่อเชื่อมต่อกับ US-N gene หลังจากนั้นจึงคัดเลือกโคลนด้วยการทำ PCR โดยใช้ pQE30 forward primer ของ vector คู่กับ W7EU2 reverse primer ของยีนกับโคลน EU-N gene และ pQE30 forward primer ของ vector คู่กับ W7US2 reverse primer ของยีนสำหรับโคลน US-N gene จากนั้นจึงยืนยันความถูกต้องของลำดับเบสและทิศทางของยีนทั้ง 2 โคลนโดยการทำ automate sequencing และนำลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีรายงานไว้ใน GenBank ต่อไป

การผลิตและตรวจสอบรูปแบบของ rN-protein

พลาสมิด pQE30_7EU และ pQE30_7U5 ถูกถ่ายเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ M15 แล้วจึงทำการตรวจสอบและคัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกไปสังเคราะห์โปรตีนโดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) ที่มีพลาสมิดแต่ละชนิดที่กล่าวข้างต้นในอาหาร LB medium ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 μg/ml) และ kanamycin (25 μg/ml) ในเครื่อง shaking incubator ระดับ 170 rpm ที่อุณหภูมิ 37˚C นานข้ามคืน และ subculture ลงในอาหารชนิดเดียวกันในสัดส่วน 1:50 แล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37˚C นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 1.0 mM และนำไปเลี้ยงต่อนาน 5 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 4000 xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4˚C เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ไปตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 90 โวลต์ นาน 120 นาที และย้อมด้วย Coomassie blue

หลังจากนั้นนำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีพลาสมิดแต่ละชนิดคือ pQE30_7EU และ pQE30_7US ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนปริมาตร 1 ml/tube มาปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 4500 xg นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4˚C แยกเอาส่วนตะกอนมาตรวจสอบรูปแบบของโปรตีน โดยนำตะกอนเซลล์มาละลายในสารละลาย 1x STE (10 mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA pH 8.0 and 10 mM NaCl) ปริมาตร 200 μl และเติม lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 30 mg/ml จากนั้นบ่มบนน้ำแข็งนาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ระดับ 4500 xg นาน 1 นาที แยกส่วนใสด้านบน (soluble protein) และตะกอน (inclusion body) หลังจากนั้นนำทั้งสองส่วนตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification)

นำโปรตีนที่สังเคราะห์ได้มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนตามวิธีของ ปรีดา (2543) ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ ล้างตะกอนโปรตีนจากปริมาตรเริ่มต้น 50 ml ด้วย 8 M urea (จากการทดสอบ) ปริมาตร 3 ml จำนวน 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 4000 xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4˚C เก็บส่วนตะกอนเซลล์มาละลายด้วย 10% sarcosine ใน 1x STE pH 8.0 ปริมาตร 4 ml และเติม lysozyme ความเข้มข้น 100 mg/ml ปริมาตร 300 μl และ sonicate 3 ครั้งที่ 5 amplitude micron นาน 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 4500 xg นาน 5 นาที ย้ายส่วนใสใส่ microtube หลอดใหม่ แล้วเติม 10% Triton X-100 ปริมาตร 300 μl ผสมให้เข้ากัน ใช้สำหรับเป็น protein antigen ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย ทั้งนี้แบ่งโปรตีนบางส่วนมาตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot analysis จากนั้นวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay (Bradford, 1976)

การกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกระต่ายและการตรวจสอบแอนติบอดีต่อ EU-rN protein และ US-rN protein

นำ EU-rN protein และ US-rN protein ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ปริมาตร 500 μl ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 700 μg/ml ผสมกับ complete Freund's adjuvant (SIGMA®) ปริมาตร

500 µl ฉีดกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในกระต่าย โดยฉีดกระตุ้นภูมิทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ ทำการเก็บซีรัมจากกระต่ายหลังการฉีดกระตุ้นภูมิครั้งสุดท้ายนาน 7 วัน

นำซีรัมที่เก็บได้จากกระต่ายหลังการฉีดกระตุ้นภูมิครั้งสุดท้าย มาทดสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนโดยวิธี dot blotting เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน หลังจากนั้นทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PRRSV ด้วยวิธีการดังนี้คือ 1) วิธี IPMA ตามรายงานของ Wensvoort et al. (1991) กล่าวคือ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มเซลล์ควบคุมหรือเซลล์ปกติ และกลุ่มเซลล์ที่ถูก infect ด้วยเชื้อ PRRSV จากนั้นจึงนำเซลล์ทั้งสองกลุ่มดังกล่าวมาทดสอบการทำปฏิกิริยากับ anti-EU หรือ anti-US antibodies และ 2) วิธี immunohistochemistry โดยการนำตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดจากสุกรปกติ และสุกรที่มีการติดเชื้อ PRRSV มาทำปฏิกิริยากับ anti-EU หรือ anti-US antibodies และตรวจสอบผลภายใต้กล้อง inverted microscope

ผลการทดลอง

การสังเคราะห์ N gene ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการใช้เทคนิค RT-PCR ในการสังเคราะห์ N gene ของเชื้อไวรัส EU และ US PRRSV ด้วย primer ที่มีความจำเพาะกับยีน พบว่าได้ PCR product ที่มีขนาด 394 bp และ 381 bp ตามลำดับ เมื่อนำมาแยกขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis (Figure 1)

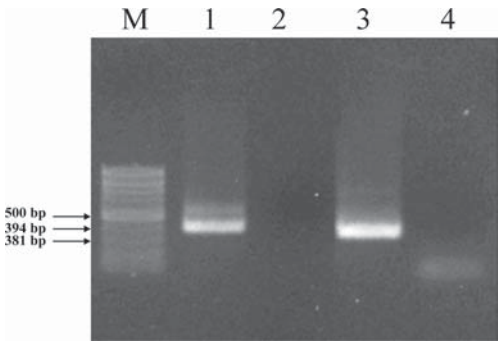

Figure 1 1.0% Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product of N gene of two PRRSV type using specific primer. Lane M = 100 bp molecular weight marker, Lane1 = PCR product of EU-N gene, Lane2 = negative control of EU-N gene, Lane3 = PCR product of US-N gene and Lane4 = negative control of US-N gene.

การโคลน N gene ของเชื้อ EU และ US PRRSV

การตรวจสอบเพื่อคัดเลือกโคลนของ EU และ US-N gene ที่ถูก subclone เข้าสู่ pQE30 vector ด้วย primer ของ vector คู่กับ reverse primer ของยีนนั้นพบว่าได้แถบดีเอ็นเอของ PCR product ขนาด 411 bp และ 401 bp ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเมื่อทำการตรวจสอบยืนยันโคลน pQE30_7EU และ pQE30_7US ด้วยการวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยการทำ automate sequencing แล้วนำลำดับเบสเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BioEdit จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ Lelystad virus (LV; EU PRRSV) ACCESSION M96262, ATCC VR-2332 (US PRRSV) ACCESSION U87392 ที่มีรายงานไว้ใน GenBank (Meulenberg et al., 1993, 1995; Kapur et al., 1996; Nelsen et al., 1999) พบว่าได้ค่าความเหมือน (similarity) เท่ากับ 98.438% จากโคลน pQE30_7EU และ 95.935% จากโคลน pQE30_7US (Figure 2)

```
M96262-ORF7     MAGKNQSQKKKKSTAPMGNGQPVNQLCQLLGAMIKSQRQQPRGGQAKKKKPEKPHFPLAA
EU-ORF7         MAGKNQSQKKKKNTAPMGNGQPVNQLCQLLGAMIKSQRQQPRGGQAKKRKPEKPHFPLAA
                ************.**********************************:***********

M96262-ORF7     EDDIRHHLTQTERSLCLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTS
EU-ORF7         EDDIRHHLTQTERSLCLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTS
                ************************************************************

M96262-ORF7     TSASQGAS
EU-ORF7         TSASQGAS                (a)
                ********

U87392-ORF7     MPNNNGKQQKRKKGDGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPGKKNKKKNPEKPHFPLATE
US-ORF7         MPNNNGGQQKKQKGNGQPVNQLCQMLGRIIAQQNQSRGKGPGKKNKKKNPEKPHFPLATE
                ****** ***::**:************:*******************************

U87392-ORF7     DDVRHHFTPSERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLSDSGRISYTVEFSLPTHHTVRLIRVTAS
US-ORF7         DDVRHHFTPSERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLSDSGRISYTVEFSLPTHHTVRLIRVTAS
                ************************************************************

U87392-ORF7     PSA
US-ORF7         PSA                     (b)
                ***
```

Figure 2 Alignment of amino acid sequence of the N gene of PRRSV (a) EU genotype and (b) US genotype.

การผลิตและตรวจสอบรูปแบบของ rN-protein และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification)

ผลของการเหนี่ยวนำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่มีพลาสมิดแต่ละชนิดคือ pQE30_7EU และ pQE30_7US ให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (control) ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG พบว่ามีการสังเคราะห์โปรตีนที่มีขนาด 16.75 และ 17.34 kDa ตามลำดับ (Figure 3) ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า EU-rN protein และ US-rN protein และจากการศึกษารูปแบบโปรตีน พบว่า rN-protein ที่สังเคราะห์ได้จากทั้ง pQE30_7US และ pQE30_7EU เป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปของ inclusion body เมื่อตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE

เมื่อนำโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ทั้ง US-rN protein และ EU-rN protein มาทำ partial purification พบว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิดมีโปรตีนอื่นของเชื้อ *E. coli* ปนเปื้อนอยู่น้อยเมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากันกับโปรตีนที่ไม่ได้ทำ partial purification ส่วนผลของการตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนที่ผ่านการทำ partial purification ด้วยวิธี Bradford assay (Bradford, 1976) ทำให้ทราบว่า US-rN protein และ EU-rN protein มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.45 mg/ml และ 1.40 mg/ml ตามลำดับ

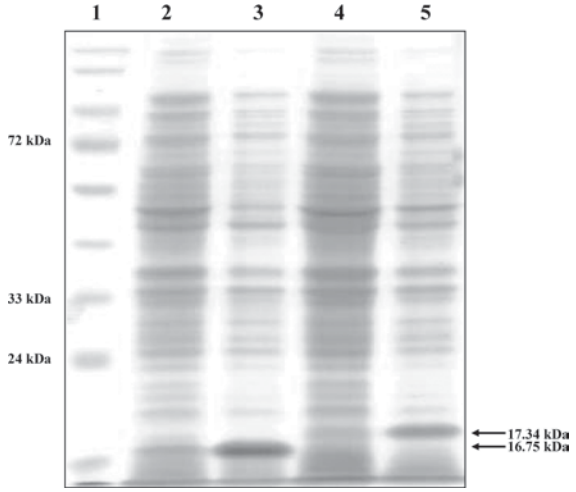

Figure 3 SDS-PAGE of recombinant nucleoprotein: Lane1 = Protein Ladder, Lane2 = pQE30EU no IPTG,Lane3 = pQE30EU with 1.0 mM IPTG, Lane4 = pQE30US no IPTG and Lane5 = pQE30US with 1.0 mM IPTG.

การกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกระต่าย และการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อ US-rN protein และ EU-rN protein

เมื่อนำซีรัมจากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย EU และ US-rN protein มาตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี dot blotting พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีกับ EU และ US-rN protein แสดงให้เห็นว่า EU และ US-rN protein สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีได้ แต่แอนติบอดีดังกล่าวเป็น polyclonal antibody จึงเกิด cross reaction ได้กับแอนติเจนจากเชื้อไวรัส PRRSV ทั้งสองสายพันธุ์

ส่วนผลการทดสอบหาอัตราส่วนระหว่างซีรัมกับตัวเจือจาง (diluent) ที่เหมาะสมที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับแอนติเจนคือ 1:400 และเมื่อนำแอนติบอดีดังกล่าวมาตรวจสอบการทำปฏิกิริยากับเชื้อ PRRSV ในเซลล์ MARC-145 ด้วยวิธี IPMA และในเนื้อเยื่อปอดที่มีการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่ามีการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีกับเชื้อ PRRSV ที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งจะเห็นได้จากเซลล์ติดเชื้อไวรัสจะมีสีน้ำตาลแดง เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติที่ปลอดเชื้อ (Figure 4)

และเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อไวรัส PRRSV พบว่าก็ติดสีน้ำตาลแดงเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ของเนื้อเยื่อปกติ (Figure 5)

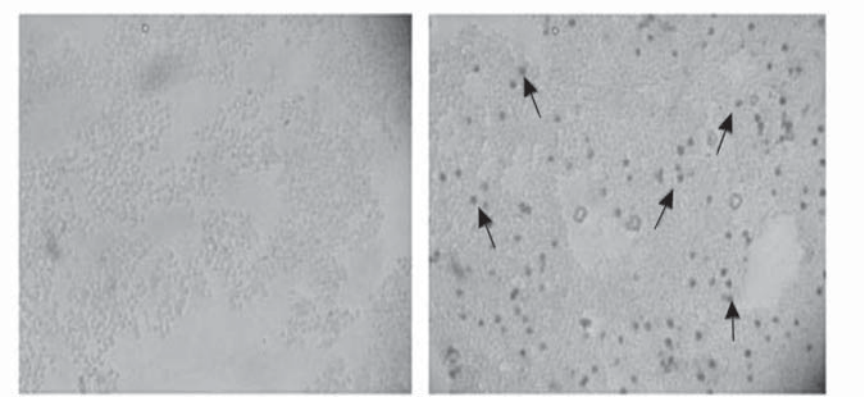

Figure 4 Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) of MARC-145 cells on the left is normal and the right is infected with PRRSV that detected by anti-US or EU antibodies. The nuclei of infected cells were shown red-brown color (red arrow), whereas the nuclei of non-infected cells were colorless staining.

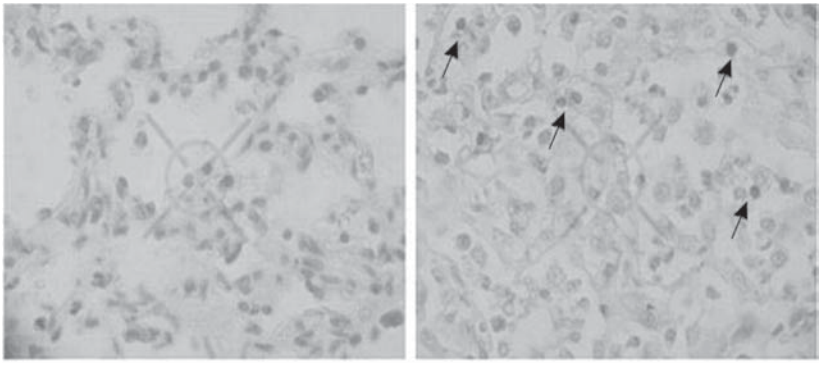

Figure 5 Immunohistochemistry of lung tissue on the left is normal and the right is infected with PRRSV detected using anti-US or EU antibodies. The nuclei of infected cells were shown red-brown color (red arrow), whereas the nuclei of non-infected cells were colorless staining.

วิจารณ์

การสังเคราะห์ N gene โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะ ซึ่งถูกออกแบบให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้น มีจุดประสงค์เพื่อให้เกิดความสะดวกในการโคลนโดยไม่ต้องกังวลกับทิศทาง

ของยีนในขั้นตอนการโคลนลงใน cloning vector ทำให้สามารถตัดยีนออกมาใช้เป็น insert DNA โดยที่ frame การอ่านลำดับเบสยังมีความถูกต้อง ซึ่งเป็นการออกแบบ primer ในลักษณะเดียวกันกับ Dea et al. (2000), Witte et al. (2000) และ Seuberlich et al. (2002) โดยมีวัตถุประสงค์สำหรับการโคลนเช่นกัน

การศึกษาครั้งนี้เป็นการโคลนยีนที่อาศัยการแสดงออกในระบบของ prokaryotic cell เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ปริมาณมาก สะดวก รวดเร็ว และประหยัด ซึ่งพบว่า EU-rN protein มีขนาด 16.75 kDa และ US-rN protein มีขนาด 17.34 kDa โดยโปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วย 6x-histidine ขนาด 3 kDa ซึ่งเหมือนกับที่เคยมีรายงานไว้ (Witte et al., 2000; Seuberlich et al., 2002) สำหรับใช้ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ทั้งนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ US-rN protein และ EU-rN protein กับ N-protein ที่มีรายงายใน GenBank พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดเหมือนกับที่มีรายงานไว้มากกว่า 95% เป็นข้อมูลที่บงชี้ว่าโปรตีนที่ผลิตได้เป็น N-protein ของเชื้อไวรัส PRRSV อย่างแน่นอน

ในการศึกษารูปแบบโปรตีนนั้น พบว่าทั้ง EU-rN protein และ US-rN protein เป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปของ inclusion body เนื่องจากแถบโปรตีนปรากฏชัดเจนอยู่ในส่วนของตะกอนเซลล์ ซึ่งเป็นตัวแทนของ inclusion body เมื่อตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่มีรายงานไว้โดย บุญญา (2545), Dea et al. (2000) และ Seuberlich et al. (2002) เมื่อนำโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ทั้ง US-rN protein และ EU-rN protein มาทำ partial purification พบว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิดมีโปรตีนอื่นของเชื้อ *E. coli* ปนเปื้อนอยู่น้อยเมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากันกับโปรตีนที่ไม่ได้ทำ partial purification ในขณะที่ผลของการตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนที่ผ่านการทำ partial purification นั้นพบว่ามีความเข้มข้นมากกว่าโปรตีนที่ได้จากการใช้ affinity chromatography (640 μg/ml) ที่รายงานไว้โดย Seuberlich et al. (2002) ซึ่งเชื่อว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของ *E. coli* กับโปรตีนดังกล่าวอยู่ด้วย ดังนั้นการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้ถึงแม้ไม่ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ 100% แต่นับได้ว่ามีความบริสุทธิ์ในระดับที่สามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว และประหยัดอีกด้วย

EU และ US-rN protein ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีได้ในกระต่าย และแอนติบอดีดังกล่าวนี้ สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส PRRSV ในเซลล์เพาะเลี้ยง และเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อได้ ดังนั้นแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อไวรัส PRRSV ในเซลล์เพาะเลี้ยงและเนื้อเยื่อสุกรที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อได้ และยังสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส PRRSV ใน infected cell line ได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

บุญญา ปิ่นมี. 2545. การตรวจสอบการติดเชื้อระยะแรกของ porcine reproductive and respiratory Syndrome virus (PRRSV) ด้วย recombinant protein. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรีดา เลิศวัชระสารกุล. 2543. การผลิตโปรตีน 3AB protein of foot and mouth disease virus in *E. coli* for serodiagnosis. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Benfield, D.A., Nelson, E.A., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D. and Chladek, D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J. Vet. Diagn. Investig. 4: 127-133.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method of measuring microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye coupling. Anal. Biochem. 72: 248-264.

Cavanagh, D. 1997. *Nidovirales*: a new oreder comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Arch. Virol. 42: 629-633.

Chomezynski, P. and S. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159.

Dea, S., Wilson, L., Therrien, D. and Cornaglia, E. 2000. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and reaspiratory syndrome virus using recombinant *E. coli*-expressed nucleocapsid protein as antigen. J. Virol. Methods 87: 109-122.

Kapur, V., Elam, M.R., Pawlovich, T.M. and Murtaugh, M.P. 1996. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the Midwestern United States. J. Gen. Virol. 77: 1271-1276.

Keffaber, K.K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. 1: 1-9.

Meulenberg, J.J.M., Hulst, M.M., De Meijer, E.J., Moonen, P.L.J.M., Den Besten, A., DeKluyver, E.P., Wensvoort, G. and Moormann, R.J.M. 1993. Lelystadn virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. J. Virol. 192: 62-72.

Meulenberg, J.J.M., Petersen-den Besten, A., de Kluyver, E.P., Moormann, R.J.M. and Wensvoort, G. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. J. Virol. 206: 155-163.

Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P. and Faaberg, K.S. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J. Virol. 73: 270-280.

Seuberlich, T., Tratschin, J-D., Thür, B. and Hofmann, M.A. 2002. Nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9: 1183-1191.

Snijder, E. J. and Meulenberg, J.J. 1998. The molecular biology of arteriviruses. J. Gen. Virol. 79: 961-979.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., Ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, J.M., Moonen, P.L.J.M., Zetstra. T., de Boer, E.A., Tibben, H.J., de Jong, M.F., van't Veld, P., Groenland, G.J.R., van Gennep, J.A., Voets, M.T., Verheijden, J.H.M. and Broomskamp, J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Q. 13: 121 130.

Witte, S.B., Chard-Bergstrom, C., Loughin, T.A. and Kapil, S. 2000. Development of a recombinant nucleoprotein-based enzyme-link immunosorbent assay for quantification of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7: 700-702.