ในการศึกษาการแสดงออกของยีนไคติเนสจากแบคคิวโลไวรัส *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus สายพันธุ์ไทย (Th-HaSNPV) ในระบบ baculovirus expression insect cell system นี้ใช้วิธีการโคลนยีนไคติเนสเข้าสู่แบคคิวโลไวรัส *Autographa californica* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV bacmid) ซึ่งเป็น shuttle vector ระหว่างแบคคิวโลไวรัสและแบคทีเรียเพื่อให้มีการแสดงออกในเซลล์แมลง โดย recombinant AcMNPV bacmid ได้รับยีน HaSNPV chitinase เข้าสู่จีโนมด้วยวิธี transposition ภายในเซลล์ *E. coli* (DH10Bac) ซึ่งได้รับการยืนยันผลการแทรกของ HaSNPV chitinase gene ด้วยวิธี PCR จากนั้นจึงนำไป transfection เข้าสู่เซลล์แมลง (SF-9) เพื่อให้ได้อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์สำหรับใช้ infect เซลล์แมลงเพื่อสังเคราะห์ recombinant HaSNPV chitinase จากการตรวจสอบโปรตีนที่คาดว่าเป็น recombinant HaSNPV chitinase ในเซลล์แมลงด้วยวิธี SDS-PAGE และ active-PAGE ยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่ามีการแสดงออกของ recombinant HaSNPV chitinase เนื่องจากใน AcMNPV bacmid มีการแสดงออกของ AcMNPV chitinase เองอยู่แล้วและมีขนาดมวลโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจึงต้องทำการยับยั้งการแสดงของ AcMNPV chitinase gene ใน AcMNPV bacmid ก่อน

ในการศึกษานี้ใช้วิธียับยั้งการแสดงออกของยีน AcMNPV chitinase โดยการนำยีน GFP เข้าแทรกตรงกลางเพื่อขัดขวางการแสดงออกของยีนนี้ด้วยวิธี homologous recombination ซึ่งต้องอาศัย homologous sequence ในการทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างยีนในจีโนมและยีนใหม่

โดยทำการศึกษาใน 2 กรณี คือ 1) กรณีที่ homologous sequence มีความเหมือนกับจีโนม 66% โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HaSNPV chitinase gene (ที่อยู่บนพลาสมิด pNVBGFP) พบว่า recombinant bacmid ที่ได้หลังจาก cotransfection มีการเรืองแสงสีเขียว ซึ่งมีวิธีทำไวรัสให้บริสุทธิ์ได้ 2 วิธี คือ วิธี plaque purification อย่างน้อย 4 รอบ (ใช้เวลา 4-6 สัปดาห์) จึงได้ไวรัสที่ปราศจากการเจือปนของไวรัสเดิม และอีกวิธีหนึ่ง คือ คัดเลือก recombinant bacmid โดยการใช้ colony selection เนื่องจาก bacmid เป็น baculovirus-bacteria shuttle vector พบว่าวิธีนี้ช่วยย่นระยะเวลาในการทำให้ไวรัสบริสุทธิ์ โดยคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มี recombinant AcMNPV bacmid ที่ต้องการ นำไปสกัด DNA เพื่อตรวจสอบการแทรกของ GFP gene ด้วยวิธี PCR ได้ภายใน 1-2 สัปดาห์ ผลการใช้ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ homologous region เพียง 66% นั้น พบว่ามีการเข้าแทรกของ GFP gene ในตำแหน่งที่ไม่จำเพาะกับยีนไคติเนส ทำให้ไม่สามารถขัดขวางการแสดงออกได้ จึงได้ทำการเปลี่ยนเป็น 2) กรณีที่ homologous sequence มีความเหมือน 100% โดยเปลี่ยนเป็น AcMNPV chitinase gene (ที่อยู่บนพลาสมิด pAcchiGFP) เพื่อแทรก GFP gene พบว่าเกิดการเข้าแทรกของ GFP gene เข้าสู่จีโนมของ AcMNPV ที่ตำแหน่งจำเพาะกับยีนไคติเนสเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR และภายหลังการคัดเลือก recombinant baculovirus ด้วยวิธี colony selection และทำการเตรียมไวรัสในเซลล์แมลง และเมื่อนำมาตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส พบว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส การศึกษานี้แสดงว่าสามารถนำวิธี homologous recombination มาใช้กับ AcMNPV bacmid เพื่อใช้ในการทำพันธุวิศวกรรมยีนต่างๆของ bacmid ได้ (โดยต้องมี homologous sequence ที่มีความเหมือน homology มากเพียงพอ) โดยไม่ต้องจำกัดที่การทำ transposition บริเวณที่มี transposon attachment site ของ bacmid เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้การทำ homologous recombination ของ bacmid ยังสามารถใช้วิธี colony selection เพื่อตรวจหาและแยก recombinant bacmid โดยการคัดเลือกโคโลนีได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกว่าการใช้แบคคิวโลไวรัสทั่วไป ซึ่งยังต้องใช้วิธี plaque purification ในการคัดเลือก recombinant baculovirus ที่ต้องการ

Expression of chitinase gene of Thai isolated *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (Th-HaSNPV) in baculovirus expression insect cell system was performed in this study using *Autographa californica* multinucleocapsid nuleopolyhedrovirus (AcMNPV) bacmid, baculovirus-bacteria shuttle vector. HaSNPV chitinase gene was inserted into AcMNPV bacmid by transposition at transposon attachment site in *E. coli* (DH10Bac cells). Recombinant AcMNPV bacmid with HaSNPV chitinase gene inserted into its genome via transposition process was purified from bacteria and confirmed by PCR analysis. The recombinant bacmid was used for transfection into insect cells. During transfection, recombinant baculovirus particles were formed and released to infect into neighboring insect cells to produce recombinant HaSNPV chitinase enzyme. SDS-PAGE and active-PAGE analysis were performed to detect expression of recombinant HaSNPV chitinase. However, the HaSNPV chitinase expression can not be confirmed since the expression of AcMNPV chitinase gene of bacmid itself was also observed at approximately the same molecular weight. In order to use the AcMNPV bacmid as an expression vector for HaSNPV chitinase gene, AcMNPV chitinase gene expression in AcMNPV bacmid must first be interrupted.

In this study, insertion of GFP gene in the middle of AcMNPV chitinase gene by homologous recombination was performed for AcMNPV chitinase gene disruption. Two homologous sequences for recombination were tested. The first sequence was the use of HaSNPV chitinase which had 66% identity to the AcMNPV bacmid on the pNVBGFP as homologous region. Recombinant AcMNPV bacmid infected into insect cell (SF-9) produced virus progeny with green fluorescent. Isolation of recombinant AcMNPV baculovirus expressing GFP was performed by 4 rounds plaque purification which takes long time (4-6 weeks). An alternative method for selection of recombinant bacmid was therefore proposed. Since the AcMNPV bacmid is baculovirus-bacteria shuttle vector, colony selection method was choosen. A single colony was selected. Confirmation of GFP gene insertion into AcMNPV bacmid extracted from each colony was performed by PCR analysis and recombinant bacmid expressing GFP can be selected in shorter time (1-2 weeks). However, analysis of insertion of GFP gene into AcMNPV chitinase gene by PCR shows no GFP gene at specific chitinase gene. The second sequence with 100% homology (AcMNPV chitinase) was therefore used. It was found that after homologous recombination, the recombinant baculovirus expressing GFP had GFP gene inserted at specific AcMNPV chitinase gene and no acitivity of AcMNPV chitinase in infected insect cells which infected by this recombinant AcMNPV baculovirus was observed. This study demonstrated that homologous recombination method (with high % homology of homologous sequence) can be applied with AcMNPV bacmid for genetic engineering of any genes of the bacmid rather than limiting at the transposition attachment site that is generally used of bacmid. In addition, colony selection of recombinant bacmid after homologous recombination can be used for separation of recombinant and parental bacmid in shorter time compare to plaque purification.