การพัฒนาชุดทดสอบ ELISA เพื่อหาชนิดย่อยของแอนติบอดีของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก(H5N1) ได้ทำการศึกษาโดยได้ผลิตโปรตีน hemagglutinin (HA) ชนิด H5 และโปรตีน neuraminidase (NA) ชนิด N1 โดยใช้ Baculovirus expression system โดยนำเอาไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ A/chicken/Thailand/Kamphaengphet-01/2004 (H5N1) มาสกัด RNA แล้วจึงเพิ่มจำนวนยีน HA และ NA โดยวิธี RT-PCR ได้ PCR product ขนาด 1,704 bp และ 1,347 bp ตามลำดับ จากนั้น PCR product ที่ได้นำมาสร้าง recombinant baculovirus โดยการทำ recombination ระหว่าง pENTR/D-TOPO vector กับ BaculoDirect Linear DNA แล้วทำให้โปรตีนมีการแสดงออกในเซลล์แมลง (Sf9 cells) โปรตีนที่ได้ถูก secrete ออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ คือ โปรตีน HA และ NA (ขนาด 56 และ 55 kDa) ซึ่งถูกออกแบบให้มีเชื่อมต่อกับ 6x Histidine tag ติดอยู่ทางปลายด้าน C –terminal รวมแล้วมีขนาด 60 และ 59 KDa ตามลำดับ ซึ่งตรวจสอบได้โดยวิธี Western blotting โดยใช้ anti-His และ anti-HA antibody พบว่าเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างโปรตีน HA และ NA คือ 72 ชั่วโมงหลัง infection จากนั้นนำโปรตีน HA และ NA ที่ได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์มา coat ลงใน ELISA plate แล้ว block ด้วย 1% BSA ก่อนที่จะทำการเติมตัวอย่างของซีรั่มไก่ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ลงไป จากผลการทดลองสามารถบอกได้ว่าโปรตีน HA สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของซีรั่มไก่ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกออกจากซีรั่มไก่ปกติได้ (p value < 0.05) ส่วนในการใช้โปรตีน NAเพื่อแยกความแตกต่างของชนิดย่อยของซีรั่มไก่ยังได้ผลไม่ชัดเจนจะต้องมีการพัฒนาต่อไป

186430

In this study, the prototype of ELISA test of antibody against H5 subtype of hemagglutinin (HA) and N1 subtype of neuraminidase (NA) of avian influenza viruses were constructed and verified. The genomic RNA of the local virus isolated strain A/chicken/Thailand/Kamphaengphet-01/2004 was extracted. The HA and NA genes were amplified using RT-PCR and the product sizes were 1,704 and 1,347 bps, respectively. To produce the recombinant proteins, the recombinant baculoviruses were constructed using pENTR/D-TOPO vector and recombination with BaculoDirect Linear DNA. The viruses were then used to infect the Sf9 insect cells. The secreted HA and NA proteins with 6x histidine tag at the C-terminal were detected by Western blot analysis using anti-His and anti-HA antibody. The product sizes of HA and NA were 60 and 59 KDa, respectively. The optimum time is 72 hours after infection. The ELISA plates coated with the recombinant HA proteins and block with 1%BSA can differentiate between positive and negative chicken anti-serum (p value < 0.05). However, using recombinant NA protein still gives an indistinguishable result and need further improvement.