บทคัดย่อ

T140181

Envelope protein (E) เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ของไวรัสเดงกี่ ซึ่งเป็นไวรัสสาเหตุของโรคไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever) มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี้ในร่างกายของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการสกัดและศึกษาคุณสมบัติของ recombinant envelope protein ที่ผลิตได้จากระบบ Baculovirus Expression Insect Cell System เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของ recombinant envelope protein ในการนำไปใช้เป็นแอนติเจน เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ต่อไป

การผลิต recombinant envelope protein ของไวรัสเดงกี่จากระบบ Baculovirus Expression Insect Cell System นั้น อาศัยเซลล์แมลงเป็นเซลล์เจ้าบ้านซึ่งเมื่อถูก infect ด้วย recombinant envelope baculovirus ซึ่งเป็นแบคคิวโลไวรัสที่ผ่านกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมให้มียีนควบคุมการสังเคราะห์ envelope protein เป็นส่วนหนึ่งของจีโนมของแบคคิวโลไวรัส ทำให้เซลล์มีการผลิต recombinant envelope protein ซึ่งสามารถตรวจสอบการสังเคราะห์ recombinant envelope protein ได้โดยวิธี Western blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody (3H5) ที่มีความจำเพาะต่อ envelope protein ของไวรัสเดงกี่ ผลการตรวจสอบพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 57.8 kDa ที่จำเพาะต่อแอนติบอดี้ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดมวลโมเลกุลกับ recombinant envelope protein ที่ผลิตจากแบคทีเรีย (ขนาดประมาณ 55.3 kDa) พบว่ามีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจาก

การที่ recombinant envelope protein ที่ผลิตจากเซลล์แมลงมีกระบวนการ post-translational modification โดยเฉพาะกระบวนการ glycosylation เกิดขึ้น

จากการทดลองทำการสกัด recombinant envelope protein โดยใช้วิธี Cation Exchange Chromatography และวิธี Immobilized Metal ion Affinity Chromatography (IMAC) พบว่าในการสกัด recombinant envelope protein ด้วยวิธี Cation Exchange Chromatography นั้น recombinant envelope protein สามารถจับกับ cation exchanger ในสภาวะ native และถูกชะออกมาใน elute buffer ที่มี NaCl อย่างน้อย 0.25 M ส่วนการสกัด recombinant envelope protein ด้วยวิธี IMAC นั้น recombinant envelope protein สามารถจับกับ Co^{2+} metal ที่ immoblize บน resin ในสภาวะ denature และถูกชะออกมาใน elute buffer ที่มี 0.2 M imidazole โดยพบว่าการสกัดทั้งสองวิธีสามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนได้เพียงบางส่วนเท่านั้น จากการตรวจสอบการ glycosylation ของ recombinant envelope protein โดยใช้เอนไซม์ N-glycosidase F พบว่าน่าจะเป็นไกลโคโปรตีน การตรวจสอบความเสถียรของ recombinant envelope protein ที่อยู่ในรูปของ infected Sf-9 cells ซึ่งทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 0-6 เดือนนั้น พบว่าการเก็บรักษา infected Sf-9 cells ตั้งแต่ 2 เดือนขึ้นไปนั้น ความเสถียรของ recombinant envelope protein ลดลง และลดลงถึง 71% ในเดือนที่ 6 ส่วนในการตรวจสอบความจำเพาะระหว่าง recombinant envelope protein กับ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับ epitope ต่างๆของ envelope protein ของไวรัสเดงกี่ พบว่า recombinant envelope protein ที่ผลิตจากเซลล์แมลงมีความเป็นแอนติเจนที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ recombinant envelope protein ที่ผลิตจากแบคทีเรีย แสดงว่า recombinant envelope protein ที่ผลิตจากเซลล์แมลงมีความคล้ายคลึงกับ dengue 2 envelope protein ในธรรมชาติมากกว่า recombinant envelope protein ที่ผลิตจากแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า recombinant envelope protein ที่ผลิตจากเซลล์แมลงมีความจำเพาะกับซีรั่มของผู้ป่วยไข้เลือดออกและไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับซีรั่มของคนปกติเมื่อตรวจสอบโดยวิธี dot blot analysis ซึ่งแสดงให้เห็นถึงคุณภาพที่ดีของ recombinant envelope protein ในด้านความจำเพาะต่อแอนติบอดี้ในซีรั่มของผู้ป่วย ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสต่อไป

Abstract

TE140181

Envelope protein is a structural protein of Dengue virus, a major cause of pediatric morbidity and mortality dengue hemorrhagic fever (DHF). This antigenic protein contains epitopes that induced neutralizing, hemagglutinin antibodies and elicited protective immune response in dengue virus patient. This study focused on purification and characterization of recombinant envelope protein produced from Baculovirus Expression Insect Cell System that is aimed to be used as protein antigen for diagnosis of dengue infection.

In the Baculovirus Expression Insect Cell System, insect cells were used as host for the production of recombinant envelope protein when being infected by genetic engineered recombinant envelope baculovirus that dengue envelope gene was inserted into baculovirus genome. The recombinant envelope protein was detected in infected cells by Western blot analysis using monoclonal antibody (3H5) specific to dengue envelope protein. The recombinant envelope protein at molecular mass of approximately 57.8 kDa was identified. When compared its molecular weight with recombinant envelope protein produced by *E. coli* (55.3 kDa), it was suggested that recombinant envelope protein from insect cells might be a glycosylated protein.

Purifications of recombinant envelope protein were performed using cation exchange chromatography and metal ion affinity chromatography (IMAC). Recombinant envelope protein bound to cation exchanger under native condition and could be eluted by elute buffer contained 0.25 M NaCl. Recombinant envelope protein was found to bind to Co^{2+} immobilized resin (IMAC) under denaturing condition and could be eluted by elute buffer contained 0.2 M imidazole. These results suggested that recombinant envelope protein could therefore be partially purified by both methods. The recombinant envelope protein is a glycoprotein as confirmed by N-glycosidase F treatment. The stability of recombinant envelope protein kept at -20°C (in infected Sf-9 cells) for 0-6 months was examined. After 2 months, the stability of recombinant envelope protein declined, to the level of 71% within 6 months. The interactions between recombinant envelope protein and monoclonal antibodies, specific to various epitopes of dengue envelope protein were studied. The recombinant envelope protein from insect cell was shown to be a better antigen than the recombinant envelope protein from bacteria. In addition, the recombinant envelope protein from insect cell was shown to be specifically reacted with pooled convalescent sera but not with pooled normal sera as demonstrated by dot blot analysis. These results indicated the possibility of using the recombinant envelope protein for the development of a new dengue virus diagnostic kit in the future.