

EXPRESSION OF RECOMBINANT NS1 PROTEIN IN BACULOVIRUS SYSTEM AND DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST NS1 PROTEIN OF AVIAN INFLUENZA A VIRUS (H5N1)

PATUMPORN JEAN-UMPUNKUL 4937153 SIIM/M

M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: TARARAJ DHARAKUL, M.D.,Ph.D.,
KANOKWAN POOMPUTSA, Ph.D.

ABSTRACT

Influenza A viruses infect a variety of avian and mammalian species, including humans; and have a significant impact on global health. The nonstructural protein, NS1 is an important non-structural protein that is abundantly expressed in influenza virus infected cells, but it is not incorporated into mature virions. In this study, the 6xHis-tag recombinant NS1 protein (rNS1) was produced from full length NS1 cDNA from (A/chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/cu-k2/04), and expressed by Baculovirus Expression System using Sf9 cells and purified by metal affinity chromatography on a Co²⁺ column. The identity of the purified rNS1 protein was confirmed by Western blot analysis. Furthermore, our results showed that Sf9 insect cells can produce biologically active recombinant NS1, utilizing it as antigen for immunization for monoclonal antibody (MAb) production. The hybridoma producing MAb to NS1 protein was screened by ELISA and Western blot analysis. Two MAbs were shown to be the best MAb pair to develop the NS1 sandwich ELISA to identify NS1 antigen. The developed MAb-based NS1 sandwich ELISA was shown to react specifically with NS1 protein of several isolates of H1N1 and H3N2 human influenza A virus infected MDCK cell culture. This NS1 sandwich ELISA can be used to identify NS1 protein of influenza A virus not only in infected MDCK cell culture, but also influenza A infected clinical specimens in the future.

KEY WORDS: INFLUENZA A VIRUS/ NS1/NON-STRUCTURAL PROTEIN 1/
BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM/ MONOCLONAL
ANTIBODY

112 pages

การผลิตโปรตีน NS1 ด้วยระบบ Baculovirus และการพัฒนาโมโนโคลนัล แอนติบอดี ต่อโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนก ชนิด H5N1

EXPRESSION OF RECOMBINANT NS1 PROTEIN IN BACULOVIRUS SYSTEM AND DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST NS1 PROTEIN OF AVIAN INFLUENZA A VIRUS (H5N1)

ปทุมพร เจียรอำพันกุล 4937153 SIIM/M

วท.ม. (วิทยานิพนธ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ชารินทร์ ชารากุล M.D.,Ph.D., กนกวรรณ พุ่มพุทรา,Ph.D.

บทคัดย่อ

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตหลายหลายชนิดรวมถึงมนุษย์ด้วย เมื่อมีการติดเชื้อเกิดขึ้น ไวรัสจะสร้างโปรตีนออกมามากมาย หนึ่งในนั้นก็คือโปรตีน NS1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ที่ติดเชื้อในขณะที่ไวรัสมีการขยายจำนวน นอกจากนี้โปรตีน NS1 จะพบเป็นจำนวนมากในเซลล์ที่ติดเชื้อแต่จะไม่พบในอนุภาคไวรัส ในการศึกษานี้ได้ทำการสร้างโปรตีนลูกผสม NS1 ที่มีการต่อของ 6xHis จากไวรัสสายพันธุ์ H5N1 (A/chicken/Nakorn-Pathom/Thailand/cu-k2/04) ด้วย Baculovirus Expression System โดยใช้เซลล์แมลงชนิด Sf9 โปรตีน NS1 ที่ถูกสร้างขึ้นถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ด้วยไอออนโลหะชนิด Co^{2+} และนำมาทดสอบเพื่อยืนยันด้วยวิธี Western Blot analysis ซึ่งผลการทดสอบบ่งบอกว่าเซลล์แมลงชนิด Sf9 สามารถผลิต recombinant โปรตีน NS1 ที่มี biological activity และสามารถนำไปใช้ต่อเพื่อเป็น antigen ในการฉีดหนูทดลองเพื่อการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี เซลล์ hybridoma ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน NS1 ได้นั้นผ่านการคัดเลือกด้วยวิธี ELISA และ Western Blot analysis โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวนสอง โคลนที่มี activity ติดต่อโปรตีน NS1 สามารถนำมาจับคู่กันเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบโปรตีน NS1 ด้วยวิธี sandwich ELISA ซึ่งวิธีการตรวจสอบนี้ได้แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เลือกสามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับโปรตีน NS1 ในเซลล์ MDCK ที่ถูกติดเชื้อด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ที่ติดเชื้อในมนุษย์สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าวิธีการตรวจหาโปรตีน NS1 ด้วยวิธีการ sandwich ELISA นั้นนอกจากจะสามารถตรวจสอบโปรตีน NS1 ได้ในเซลล์ทดลองที่ถูกติดเชื้อแล้ว ยังสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการตรวจหาโปรตีน NS1 ในสิ่งส่งตรวจที่มีเซลล์ที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอด้วย