

จุฬารัตน์ ลิตจันทร์ 2551: การพัฒนาเชื้อไวรัสวัคซีนไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยเทคนิค reverse genetics (rg H5N1) ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ ศัตวแพทย์หญิงพรทิพา เล็กเจริญสุข, Ph.D.  
77 หน้า

การผลิตวัคซีนป้องกันโรคไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากไวรัสธรรมชาติ ประสบปัญหาเนื่องจากไวรัสทำให้ไข่ไก่ฟักตายก่อน 24 ชั่วโมงทำให้ได้ผลผลิตต่ำ ส่วนวัคซีนที่ผลิตจากไวรัสชนิด H5 แต่เป็นสายพันธุ์อื่น (heterologous) มักจะให้ภูมิคุ้มกันไม่เต็มที่ การศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้เทคนิค reverse genetics ในการสร้าง seed virus vaccine โดยการโคลนยีน HA และ ยีน NA จาก HPAI H5N1 และยีนอีกหกท่อนจาก swine influenza A virus (H1N1) จะถูกใช้เป็นชิ้นแกนหลัก ทำการดัดแปลงยีน HA โดยทำการกำจัดส่วนของ polybasic amino acids บริเวณ cleavage site เพื่อลดความรุนแรงในการก่อโรค หลังจากนั้นทำการโคลนแต่ละยีนเข้าไปยังพลาสมิดที่แสดงออกได้สองทิศทาง (pDZ) และทำการสร้าง reassortant โดยใช้ พลาสมิด pDZ ที่มียีน HA ที่ผ่านการดัดแปลงแล้วและพลาสมิด pDZ ที่มียีน NA ของ HPAI H5N1 และ ยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ของ SIV H1N1 นำพลาสมิดทั้งสองอันเข้าเซลล์ผสมระหว่างเซลล์ 293T และ Madin-Darby Kidney (MDCK) อนุภาคไวรัส (rg H5N1) ที่เก็บจากสารละลายเหนือเซลล์ (supernatant) สามารถทำให้ไข่ไก่ฟักอายุ 10 วันติดเชื้อ ผลของการเพิ่มปริมาณสายพันธุ์กรรมทั้งแปดท่อนด้วย RT-PCR พบว่าไวรัสมีครบทั้ง 8 ท่อน และประกอบด้วยยีน HA ที่ผ่านการดัดแปลงแล้วซึ่งไม่มี polybasic amino acid และยีน NA ของ HPAI H5N1 และ ยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ของ swine influenza virus (SIV) H1N1 ตามที่ต้องการ ไวรัสที่ได้จาก allantoic fluid มีไตเตอร์  $2 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml นอกจากนี้ ไวรัสที่ได้สามารถทำให้เซลล์ MDCK ติดเชื้อและสามารถยืนยันการติดเชื้อได้ด้วยวิธี immunofluorescent test และการที่ไวรัสสามารถทำให้เกิด plaque ได้นั้นต้องอาศัย trypsin ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถพัฒนา seed virus สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ได้เป็นผลสำเร็จ

Jutarat Lidjun 2008: Development of Reverse Genetics Derived Avian Influenza H5N1 (rgH5N1) Virus Vaccine. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Porn Tippa Lekcharoensuk, Ph.D. 77 pages.

Production of vaccine against highly virulent avian influenza (HPAI) virus (H5N1) using wild type virus grown in embryonated chicken eggs results in low virus yield because the embryo dies before 24 hours. On the other hand, most of heterologous vaccines are not able to induce highly effective immunity. A reverse genetics technique was employed to produce seed HPAI H5N1 vaccine by cloning HA and NA genes derived from the HPAI H5N1 as the remaining six genes of swine influenza A virus (SIV) H1N1. Polybasic amino acids were removed from the cleavage site of HA gene to reduce pathogenicity. Each gene was cloned into bidirectional transcription plasmid (pDZ). The reassortants were created by transfecting modified HA and NA genes, from HPAI (H5N1), as well as PB2, PB1, PA, NP, M and NS genes from SIV (H1N1) into a mixture of 293T and Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. The rescued rgH5N1 in the supernatant over the transfected cells was infectious when inoculated into allantoic cavity of 10-day-old embryonated eggs. The results of RT-PCR using RNA templates isolated from the allantoic fluid demonstrated that the rescued virus contained all 8 gene segments comprising of the modified HA and NA genes derived from HPAI H5N1, and PB2, PB1, PA, NP, M and NS genes of SIV H1N1. The titer of virus in the allantoic fluid was as high as  $2 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml. The rescued virus was infectious in MDCK cells as confirmed by immunofluorescent assay. In addition, plaque formation by rgH5N1 was trypsin dependent. These results show that we have successfully produced seed rgH5N1 virus vaccine for the production of HPAI H5N1 vaccine.