บทคัดย่อ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and mouth disease; FMD) เป็นโรคระบาดที่รุนแรงในปศุสัตว์ สัตว์ที่ติดเชื้อสามารถกลายเป็นพาหะ ซึ่งทำให้ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนและเกิดการกลายพันธุ์ได้อย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยโรคดังกล่าวขึ้นมากมาย เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสัตว์ที่ติดเชื้อออกจากสัตว์ที่เคยได้รับวัคซีนต่อไวรัสปากและเท้าเปื่อย (FMDV) โดยใช้หลักการในการตรวจหา non-structural proteins (NSPs) ซึ่งเป็นไวรัสแอนติเจนที่พบเฉพาะในเซลล์ของสัตว์ที่ติดเชื้อ และแอนติบอดีต่อ NSPs นอกจากนั้น การพัฒนาชุดตรวจโรคที่สามารถแยกสัตว์ที่ฉีดวัคซีนออกจากสัตว์ที่ติดเชื้อ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน 3ABC ซึ่งเป็น NSP ชนิดหนึ่ง โดยวิธีดั้งเดิมคือการใช้เทคนิค hybridoma แต่เนื่องจากเทคนิคนี้จำเป็นต้องเพาะเลี้ยง Hybridoma cell ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาแพง และต้องการบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญโดยเฉพาะในการเลี้ยงและคัดเลือก Hybridoma cell เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิคใหม่ทางด้าน antibody engineering เช่น Phage display technology ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้รวดเร็วกว่า และราคาถูกกว่า นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษา Antibody clone ได้ง่ายกว่า ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการพัฒนาวิธีผลิตแอนติเจนและโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการวินิจฉัยแยกระหว่างสัตว์ที่ติดเชื้อและสัตว์ที่ได้รับวัคซีน

ในการผลิตแอนติเจนนั้นได้ทำการโคลนและผลิตโปรตีน 3ABC ในเซลล์แมลงโดยใช้เทคนิค Baculovirus Expression System โดยทำการโคลนยีน 3ABC ของ FMDV type O จากตัวอย่างในประเทศไทยเข้าไปใน baculovirus expression vector และให้มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเซลล์แมลง ส่วนในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน 3ABC นั้นได้ใช้ Phage display technology โดยเริ่มจากการตัดต่อส่วนของแอนติบอดียีนที่ได้จากไก่ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยที่รวมกับแอนติบอดียีนส่วน constant ของคน เข้าใน phagemid vector แล้วนำไปใส่ในเซลล์แบคทีเรีย เพื่อสร้างเป็นตัวฟาจที่มีแอนติบอดีแสดงอยู่บนผิว

ผลที่ได้จากการผลิตแอนติเจนครั้งนี้ พบว่าจากการตรวจสอบโปรตีนที่มีการแสดงออกในเซลล์แมลงโดยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 55-60 kDa จากเซลล์แมลงที่ถูกทำให้ติดเชื้อ baculovirus ที่มียีน 3ABC (recombinant 3ABC-baculovirus; AcMNPV.3ABC) และไม่พบโปรตีนดังกล่าวในเซลล์ที่เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย wild type baculovirus นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนดังกล่าวในเซลล์แมลงที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย recombinant 3ABC-baculovirus สามารถจับกับ anti-3AB rabbit polyclonal serum เมื่อตรวจสอบด้วย immunofluorescence assay (IFA) ซึ่งไม่พบในเซลล์กลุ่มควบคุมและเซลล์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย wild type baculovirus โปรตีน 3ABC ที่สกัดจากเซลล์แมลงสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมที่ได้จากโคภายหลังการติดเชื้อ 2 และ 3 สัปดาห์ โดยให้ปฏิกิริยาบวกกับซีรัมภายหลังการติดเชื้อ 3 สัปดาห์ที่แรงกว่า จากผลการทดลองดังกล่าวได้แสดงให้เห็นว่า recombinant protein ดังกล่าวคือโปรตีน 3ABC

ผลที่ได้จากการผลิตแอนติบอดีพบว่า จากการใช้ Phage display technology นั้น เราสามารถสร้างแอนติบอดีไลบรารีดังกล่าวเป็นผลสำเร็จ โดยมีขนาดของไลบรารีที่ได้ที่ประมาณ 10^6 ซึ่งในขั้นต่อไปจะเป็นการคัดเลือกตัวฟาจที่จำเพาะกับโปรตีน 3ABC (ที่เป็นผลผลิตของโครงการวิจัยที่ 1) ในขั้นตอนการทำ panning ต่อไป

Abstract

Foot-and-mouse disease (FMD) is one of the most important viral diseases of livestock. The culling of animal to control this disease also results in the majority economic loss. Vaccination is one of the control strategies of this disease. However, this leads to the difficulty in differentiating the vaccinated from infected animals. In addition, infected animals can become carriers in which virus can replicate and mutate. For this reason, several detection tests to differentiate the infected animal from vaccinated animals (DIVA) were developed. These tests are based on the detection of non-structural proteins (NSPs) or antibodies to the NSPs. Most of current foot-and-mouth disease virus (FMDV) DIVA tests utilize the non-structural protein 3ABC protein as antigen and polyclonal or monoclonal antibody specific to 3ABC. The monoclonal antibody mostly produced from conventional hybridoma technology. This technology is more expensive and laborious comparing to the new antibody engineering technology. In this study, we describe the production of antigen and monoclonal antibody to develop diagnostic tests for DIVA.

For the antigen production, the non-structural protein, the 3ABC gene of FMDV type O from Thailand was cloned into a baculovirus expression vector and the gene product was expressed in insect cells. Additionally, to produce monoclonal antibody specific to FMDV, the phage displayed antibody library was constructed. The antibody genes (variable region of heavy and light chains) were amplified from cDNA that was reverse-transcribed from immunized chicken RNA. Constant regions of heavy and light chains of human were also amplified from pComb3XTT vector. The antigen binding fragments (Fab) were further amplified by combining the heavy chain Fd and chimeric light chain.

The results of the 3ABC protein production in insect cells showed that the expressed protein had a molecular weight approximately 55-60 kDa as detected by SDS-PAGE. The 55-60 kDa protein was not present in the lysates from either insect cell control or wild type baculovirus infected cells. The insect cells infected with the recombinant 3ABC-baculovirus reacted with anti-3AB rabbit polyclonal serum when detected by an immunofluorescence assay (IFA). The IFA reactivities with anti-3AB rabbit polyclonal were absent in control cells and in cells infected with wild type baculovirus. Moreover, the lysates containing the recombinant 3ABC protein reacted with sera from cattle previously exposed to FMDV for two and three weeks. The serum from the cattle after three-week inoculation yielded a stronger positive signal. The results from this study confirm that the recombinant protein expressed in insect cells is 3ABC protein.

The results of monoclonal production using phage display technology showed that the full-length Fab amplified by combining the heavy chain Fd and chimeric light chain had 1500 bps in length. By using phagemid pComb3XSS, the Fab fragment was successfully transformed to *E. coli* cells and displayed as fusion protein with the coat protein of phage, to generate the antibody library with diversity at 10^6. The recombinant antibody specific to non-structural protein 3ABC will be further selected from the obtained antibody library.