T 148799

การเพิ่มจำนวนของแบคคิวโลไวรัสอย่างต่อเนื่องในเซลล์แมลง (serial passages) เป็นผลให้ไวรัสมีการสะสมสารพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปและมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพในการ infection ของแบคคิวโลไวรัสในเซลล์แมลง เรียกว่าการเกิด passage effect ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในไวรัสแต่ละสายพันธุ์ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ serial passages ต่อการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพการผลิตแบคคิวโลไวรัส *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaNPV) สายพันธุ์ประเทศไทย (Th-HaNPV) ในเซลล์แมลง Hz cell line (*Helicoverpa zea*) โดยนอกจากการตรวจสอบปริมาณผลผลิตของไวรัสแล้วยังได้ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโปรตีนทั้งหมด (proteome) ของไวรัสด้วย

ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพของไวรัส Th-HaNPV ได้ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพในการ infection ในเซลล์แมลงของไวรัส ประสิทธิภาพในการผลิตแบคคิวโลไวรัสในรูปแบบ extracellular virus (ECV) และประสิทธิภาพในการผลิตแบคคิวโลไวรัสในรูปแบบ occlusion body (หรือผลึก polyhedra) จากการทำ serial passages จำนวน 10 ครั้ง ผลการตรวจสอบพบว่า เมื่อจำนวน passage number เพิ่มขึ้น % infection ลดลงเหลือ 23% ที่ passage 10 (เมื่อเปรียบเทียบกับ passage 3) ภายหลังการ passage อย่างต่อเนื่องปริมาณการผลิต ECV สูงขึ้นและสูงที่สุดที่ passage 5 ($1.61 \times 10^9$ pfu/ml) หลังจากนั้นปริมาณ ECV ลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการทำ serial passages สำหรับการตรวจสอบปริมาณการสร้างผลึกไวรัสหรือ polyhedra พบว่าที่ passage 3 ไวรัสสามารถสร้าง polyhedra ได้สูงสุดเท่ากับ 51 PIBs/cell และลดลงจนใน passage 10 เท่ากับ 5

PIBs/cell ซึ่งลดลงไปประมาณ 90% ผลของการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการ infection และการสร้างผลผลิตของไวรัส Th-HaNPV ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อจำนวน passage number สูงขึ้น ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาในแบคคิวโลไวรัสชนิด HaSNPV และ LdMNPV จากผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพของไวรัสสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลสำหรับการผลิตไวรัสในเซลล์แมลง เช่น ไม่ควร passage ไวรัสอย่างต่อเนื่องเกิน 6 passage เนื่องจากผลผลิตจะลดลงอย่างมาก เป็นต้น

สำหรับการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของไวรัส Th-HaNPV (ECV) ด้วยวิธี Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบโปรตีนของไวรัสที่ passage number แรกๆ ของการทำ serial passages (passage number ที่ 2) เพื่อใช้เป็น passage อ้างอิงในการตรวจสอบ protein profile เปรียบเทียบกับไวรัส passage number ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด (มีปริมาณการผลิต ECV สูงสุดใน passage number ที่ 5) และ ไวรัส passage number ที่มีประสิทธิภาพต่ำสุด (มีปริมาณการผลิต ECV ต่ำสุดใน passage number ที่ 10) ผลของการศึกษาพบว่าการทำ serial passages มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนของไวรัส โดยตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพของไวรัสตามที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ เช่น PE38 ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้น (transactivate) การ transcription ของ viral gene และ DNA replication และยังตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของ 25K FP protein ซึ่งเป็นโปรตีนจำเป็นต่อการสร้าง virion occlusion และ polyhedron เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิคนี้ช่วยให้สามารถตรวจพบโปรตีนของแบคคิวโลไวรัส (HaNPV) หลายชนิดที่อาจมีผลในการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพของไวรัสนอกเหนือจากโปรตีนที่มีการรายงานมาก่อน ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นโปรตีนตรวจสอบ (Marker protein) การเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพของไวรัสได้

Abstract

TE 148799

Serial passaging of baculoviruses in cell culture leads to rapidly accumulating mutant, also known as "the passage effect," which result in changing of virus efficacy. The effect of viral passaging varies between different types of baculovirus. This study aimed to investigate the effect of serial passages on baculovirus (Th-HaNPV) productivity in insect cell culture (Hz cell line) and to determine the overall protein expression (proteome) changes induced by serial passage of baculoviruses.

The viral efficacy on infection in cell culture and production of extracellular virus (ECV) and occlusion body (polyhedra) were determined throughout ten serial passages. The results showed that the percentage of infected cells producing polyhedra decreased to 23% at passage 10, compared to that of passage 3. The ECV titers increased gradually from passage 2 to 5. The highest ECV titers was obtained at passage 5 ($1.6x10^9$ pfu/ml). From passage 6 onwards, there was a gradual reduction in ECV production. The number of polyhedra produced per cell decreased from 51 polyhedra per cell at passage 3 to 5 polyhedra per cell at passage 10, representing a 90% reduction in yield. These results indicated that the viral productivity decreased rapidly during serial passages of Th-HaNPV in cell culture and this was similar to HaSNPV and LdMNPV. The information obtained from this study can be applied for baculovirus (Th-HaNPV) production such as serial passage of HaNPV should not be performed more than 6 passages since very low viral productivity will be obtained.

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) was used to determine the change of overall proteins expression of extracellular virus (ECV). ECV was obtained from virus stock at passage 2 (reference passage) passage 5 (high ECV titers) and passage 10 (low ECV titers). The results showed that the serial passages resulted in protein profiles changes which could be detected by 2D-PAGE. Some proteins which have been previous reported to be involved in transcriptionally transactivating viral gene and augmenting viral DNA replication such as PE38 and 25K FP protein, which was essential for polyhedron formation and viral occlusion, were found to be changed according to their efficacy in this study. Moreover, other proteins of baculovirus (HaNPV) which, has not been previously reported, were detected by this technique and may be used as marker protein to predict the viral efficacy.

Keywords : Baculovirus / Serial Passages / Passage Effect / Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis