

การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียไวรัสอย่างต่อเนื่องในเซลล์แมลง (Serial passage) มีผลทำให้ไวรัสสะสมสารพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งนำไปสู่การลดประสิทธิภาพของไวรัสในการ infection ในเซลล์แมลง เรียกว่าการเกิด passage effect ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อการศึกษาหน้าที่ของยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับ passage effect ของแบคทีเรียไวรัส *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* สายพันธุ์ไทย (Th-HaNPV) โดยใช้เทคนิค RNA interference

โดยได้ทำการตรวจสอบการเกิด RNAi ในแบคทีเรียไวรัสดัดแปลงพันธุกรรม Th-HaNPV (chi-gfp) ที่มีการแสดงออกของยีน gfp เพื่อเป็นต้นแบบของการทดลอง พบว่าการชักนำ dsRNA ที่จำเพาะต่อยีน gfp เข้าสู่เซลล์แมลง Hz ที่ถูก infect ด้วยไวรัส Th-HaNPV(chi-gfp) สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน gfp ได้ จึงสรุปได้ว่าเทคนิค RNA สามารถนำมาใช้ในเซลล์แมลง Hz ที่ถูก infect ด้วย HaNPV ได้ ซึ่งจะได้นำไปใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนต่อไป

จากการศึกษาระดับการ transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า HaNPV open reading frame ที่ 27 (HaNPVOrf27) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในไวรัส Th-HaNPV ที่ผ่านการทำ serial passage จึงได้ทำการตรวจสอบหน้าที่ของยีนดังกล่าวซึ่งคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด passage effect ด้วยเทคนิค RNAi โดยชักนำ dsRNA ที่จำเพาะต่อยีน HaNPVOrf27 เข้าสู่ Hz เซลล์ที่ถูก infect ด้วยไวรัส Th-HaNPV (wild type) ทั้งใน passage 3 แล้วทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง morphology ของเซลล์แมลง พบว่าไวรัสมีการสร้างผลึกลดลง และเซลล์แมลงตายโดยมีลักษณะของการ apoptosis สันนิษฐานว่าหน้าที่ของยีน HaNPVOrf27 อาจเกี่ยวข้องกับการสร้างผลึกไวรัส และการป้องกันการเกิด apoptosis

Serial passaging of baculovirus in cell culture leads to rapidly accumulating mutant also known as “passage effect” which result in changing of virus efficiency. This study aimed to use the RNA interference (RNAi) technique to study function of gene that suspected to be involved in the passage effect of *Helicoverpa armigera Nucleopolyhedrovirus* (Th-HANPV).

The RNAi approach to prevent gene expression in HaNPV baculovirus was first investigated by using recombinant HaNPV expressing green fluorescence protein (GFP), Th-HaNPV (Chi-gfp) as a model. Introduction of dsRNA that homologous to the gfp gene into Th-HaNPV (Chi-gfp infect insect cells (Hz) showed potent inhibition of GFP expression in Hz cell. This indicated that RNAi technique can be applied for interference of gene expression in the HaNPV baculovirus infected Hz insect cell. This technique can be exploited for the possibility of passage suppression effect in the baculovirus-insect cell system.

HaNPVorf27 was one of the genes that found to be highly expressed in the Th-HaNPV after serial passage. To study its roles in the baculovirus passage effect, the RNAi technique using dsRNA specific to the HaNPVorf27 was introduced to the infected cells. The HaNPVorf27 transcription level was found to be decreased after the RNAi was introduced in virus passage 3 (before) and passage 10 (after serial passage). The infected cell viabilities and morphology were observed under microscope. It was found that inhibition of HaNPVorf27 expression led to the decrease in the number of polyhedron formation and rapid cell death in apoptosis manner. The function(s) of the HaNPVorf27 was therefore proposed that it may play some roles in polyhedra formation processes and/or involve in presentation of apoptotic cell death (or anti-apoptosis).