

การใช้ Recombinant 3AB protein ที่สร้างจากเชื้อ *Escherichia coli* ในการตรวจสอบการติดเชื้อ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยเทคนิค ELISA

Detection of Foot and Mouth Disease infection by ELISA with Recombinant 3AB Protein Expressed in *Escherichia coli*

ปรีดา เลิศวัชรสารกุล¹ วิไล ลินจงสุบงกช² ดิลก อ้วนพรมมา² อรวรรณ บุตรดี¹ วิไลรัตน์ คำสิงห์¹
ธีระพล ศิริณฤมิตร¹ และวรวิทย์ วัชรวัลคุ¹

Preeda Lertwatcharasarakul¹, Wilai Linchongsukong², Dilok Aunpromma², Orawan Boodde¹, Wilarat
Chumsing¹, Teerapol sirinarumitr¹ and Worawidh Wajjwalku¹

บทคัดย่อ

การฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยกระตุ้นให้สัตว์เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อส่วนโปรตีนโครงสร้างของไวรัส แต่ในสัตว์ที่ได้รับเชื้อจะพบแอนติบอดีทั้งในส่วนของโปรตีนโครงสร้าง และโปรตีนส่วนอื่นของไวรัส ในการทดลองได้ทำการผลิตโปรตีน 3AB ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนส่วนอื่นของไวรัส โดยสังเคราะห์ในเชื้อ *E. coli* เพื่อใช้เตรียมแอนติเจนสำหรับการตรวจสอบภาวะการติดเชื้อในสุกรด้วยเทคนิค ELISA โดยโปรตีนจะทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยยูเรีย และละลายด้วย SDS ก่อนนำมาใช้ในการทำ ELISA ผลการทดลองให้ความจำเพาะในการตรวจสอบ 100 เปอร์เซ็นต์ กับการทดสอบกับกลุ่มสุกรที่ได้รับการฉีดวัคซีน และไม่พบประวัติการติดเชื้อมากกว่า 6 ปี จำนวน 144 ตัวอย่าง และจากการทดลองเปรียบเทียบกับ FMD-3ABC po-ca (CHEKIT[®]) ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป กับกลุ่มสุกรหลังจากการระบาดของโรคประมาณ 3 สัปดาห์ จำนวน 75 ตัวอย่าง ให้ผลที่สอดคล้องกัน 84 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีถือเกณฑ์ บวก/ลบ มีค่าเป็นบวกเนื่องจากซีรัมได้จากฟาร์มที่พบการระบาด ทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน 96 เปอร์เซ็นต์ การพัฒนาการตรวจสอบนี้จะมีประโยชน์ต่อการควบคุมการระบาด และกำหนดพื้นที่ หรือฟาร์มปลอดโรค

1 หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Veterinary Diagnostic Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University,
Kumphaengsaen Campus Nakorn Pathom. 73140

2 ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย กรมปศุสัตว์

Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, Dept. of Livestock Development, Pak Chong,
Nakhonratchasima

ABSTRACT

Detection of antibodies against nonstructural protein could potentially to differentiate foot and mouth disease (FMD) infected animals from vaccinated animals. The recombinant 3AB protein of FMD virus expressed in *E.coli* was used to detect antibodies in swine sera by ELISA technique. The partial purified 3AB protein was coated in ELISA plate. The sera were absorbed with *E.coli* suspension before testing. Total of 144 samples of vaccinated sera were tested, and results were negative. When compared with commercial test kit ,FMD-3ABC po-ca (CHEKIT®), used to detect FMD virus in 75 sera collected from growing pig after 3 weeks of FMD outbreak, this method gave 84% of similar results. However, suspected results from this method and commercial kit were considered as positive results, the similarity was increased up to 96% . This test could be used as an alternative test for detection FMD of an free pig farm in endemic areas.

Key words : Non-structural protein, FMDV, ELISA

คำนำ

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคระบาดที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากไม่สามารถส่งเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์เป็นสินค้าออกได้ โรคนี้เกิดจากเชื้อไวรัสมีทั้งหมด 7 ชนิด (serotype) เท่าที่พบรายงานในประเทศไทยมีเพียง 3 ชนิด คือ โอ เอ และ เอเชีย 1 เมื่อเซลล์สัตว์ได้รับเชื้อไวรัส เซลล์ติดเชื้อจะสร้างโปรตีนจากรหัสพันธุกรรมของไวรัสได้ 2 ชนิดคือ โปรตีนส่วนโครงสร้างของเชื้อ (Structural protein) และโปรตีนส่วนอื่นของเชื้อ (Non structural protein) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าสัตว์ที่เคยได้รับเชื้อไวรัสจะมีแอนติบอดีต่อโปรตีนทั้ง 2 ชนิด แต่สัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคนี้จะมีแอนติบอดีเฉพาะส่วนโครงสร้างของเชื้อ (Neitzert et al.,1991; Rodriguez et al.1994; Silberstein et al.,1997; Soresen et al.,1998) ดังนั้น การตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนอื่นของเชื้อสามารถบ่งชี้การไม่ปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยของสัตว์ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนอื่นของเชื้อจะเป็นประโยชน์สำหรับการกำหนดพื้นที่หรือฟาร์มปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยได้

ในการศึกษานี้ได้ใช้เทคโนโลยีชีวภาพสำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบแอนติบอดีต่อโปรตีน 3AB ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนส่วนอื่นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบการปลอดเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยในสุกร

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

RT-PCR และการหาลำดับเบส

โคลนยีน 3AB จากเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยชนิด โอ เอ และ เอเซีย 1 ซึ่งแยกได้จากห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ด้วยวิธี RT-PCR ตามวิธีเดียวกับ วรวิทย์ และคณะ (2542) PCR ของเชื้อ 3AB ของเชื้อทั้ง 3 ชนิดจะทำการหาลำดับเบสด้วย ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kits (Applied Biosystem) การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนของเชื้อทั้ง 3 ชนิดใช้โปรแกรม DNASIS

การสร้างพลาสมิดลูกผสมเพื่อสังเคราะห์โปรตีน 3AB

ผลผลิต PCR ของเชื้อสายพันธุ์ โอ จะเชื่อมเข้าสู่พลาสมิด pCRII (Invitrogen[®]) และทำการตัดต่อยีนลงสู่พลาสมิด pQE30 (QIAGEN) สำหรับการผลิตโปรตีน ในเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ M15 (ปริดา, 2543)

การเตรียมโปรตีนสำหรับการทำ ELISA

เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ M15 ที่สังเคราะห์โปรตีน 3AB โดยกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG จะใช้เตรียมเป็น 3AB antigen ส่วนเชื้อที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นให้สร้างโปรตีน 3AB ใช้สำหรับการเตรียม control antigen และ sample diluent ในการเตรียม 3AB antigen และ control antigen มีวิธีการโดยย่อดังนี้หลังจากการปั่นตกตะกอนเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยง 100 มิลลิลิตร แล้วล้างตะกอนเชื้อด้วยยูเรียความเข้มข้นที่ 4M, 6M และ 8M โดยใช้ยูเรีย 4 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 4 มิลลิลิตร และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส การเตรียม sample diluent หลังจากปั่นตกตะกอนจะละลายด้วย 50 มิลลิลิตร phosphate buffered saline (PBS) ต้มในน้ำเดือด 5 นาที และทำการ sonication ที่ความถี่ 23 KHz. 5 amplitude 3 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาทีบนน้ำแข็ง ด้วย soniprep150 ultrasonic disintegrator (MSE)

การ coat โปรตีน และขั้นตอนการทำ ELISA

Control antigen จะใช้ในการ coat ในแถวเลขคู่ ส่วน 3AB antigen จะใช้ในการ coat ในแถวเลขคี่ โดยเจือจางที่ 1:20 ด้วย coating buffer pH9.6 ข้ามคืน ที่ 4 องศาเซลเซียส ใน ELISA plate โดยใช้ F96-MAXISORP (NUNC) เจือจางตัวอย่างซีรัมที่ 1:100 ด้วย sample diluent ที่ 1:100 ใน dilution plate และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ส่วน ELISA plate ทำการล้าง 3 ครั้งด้วย phosphate buffered saline tween20(PBST) แล้วจึง Block ด้วย 5% skim milk 30 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เท skim milk ออก แล้วเติม ซีรัมที่เจือจางลงในหลุม Control antigen และ 3AB antigen หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST แล้วเติม 100 ไมโครลิตรของ goat anti swine IgG conjugated HRP (DAKO[®]) ที่เจือจางที่ 1:4000 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST เติม 100 ไมโครลิตร TMB single solution (ZYMED[®]) เมื่อครบ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm 10 นาที ด้วยเครื่อง ELISA reader

การอ่านผลถ้าค่าผลต่างระหว่างหลุม 3AB antigen ลบด้วยหลุม control antigen น้อยกว่าหรือ เท่ากับ 0.1 ให้อ่านผลเป็นลบ ถ้าผลต่างมากกว่า 0.1 แต่ไม่มากกว่า 0.15 ให้อ่านผลเป็นกลุ่มบวก/ลบ และผลต่างมากกว่า 0.15 อ่านผลเป็นบวก

ขั้นตอน ELISA ของ FMD-3ABC po-ca (CHEKIT[®]) ทำตามคู่มือของชุดตรวจสอบ

ซีรัมในการตรวจสอบ

ซีรัมชุดที่ 1 เป็นซีรัมจากสุกรที่ได้รับการทำวัคซีนมากกว่า 10 ครั้ง จากฟาร์มที่ไม่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในระยะเวลา 6 ปี ซีรัมกลุ่มที่ 2 เป็นซีรัมจากสุกรในฟาร์มที่พบมีการระบาดของโรคประมาณ 3 อาทิตย์ positive control และ negative serum ได้จากการตรวจสอบด้วย FMD-3ABC po-ca (CHEKIT[®])

ผลการทดลอง และวิจารณ์

กรดอะมิโนของโปรตีน 3AB ของเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันน้อยกว่า 6.2 เปอร์เซ็นต์ (Fig.1) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกโปรตีน 3AB ของเชื้อชนิด โอ สำหรับการเตรียมแอนติเจน เนื่องจากกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันดังนั้นโปรตีน 3AB ของเชื้อแต่ละชนิดสามารถใช้ตรวจสอบแอนติบอดีต่อเชื้อต่างชนิดได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานอื่น (Knowles et al., 2001)

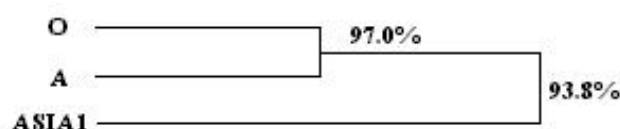


Figure1 Homology percentage of amino acid sequences among O, A and Asia1 based on 3AB gene sequences

ความจำเพาะ (specificity) ต่อการตรวจสอบแอนติบอดีต่อโปรตีน 3AB ด้วยวิธีนี้ (3ABKU-1P) มีค่า 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากให้ผลลบกับการทดลองกับซีรัมในกลุ่มที่ 1 การเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ 3ABKU-1P กับชุดตรวจสอบสำเร็จรูป FMD-3ABC po-ca (CHEKIT[®]) กับซีรัมสุกรชุดที่ 2 (Table 1) พบว่าให้ผลบวก บวก/ลบ และลบ เหมือนกัน 84 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีถือเกณฑ์ บวก/ลบ มีค่าเป็นบวกเนื่องจากซีรัมได้จากฟาร์มขณะเกิดโรคประมาณ 3 สัปดาห์ ทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน 96 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาความคงทนของแอนติเจนหลังจากการ coat แอนติเจน ลงบน ELISA plate พบว่าแอนติเจนที่ coat ไว้ยังให้ผลการตรวจสอบคงที่อย่างน้อย 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Table1 Comparison between 3AB protein (3AB KU-1P) กับ FMD-3ABC po-ca (CHEKIT[®]) using 75 sera collected from growing pig after 3 weeks of FMD outbreak

		FMD-3ABC po-ca (CHEKIT [®])		
		-	+/-	+
3AB KU-1P	-	15	3	0
	+/-	0	2	5
	+	0	4	46

สรุป

ลำดับกรดอะมิโนของ 3AB มีความคล้ายคลึงกันสูง เหมาะแก่การใช้ในการพัฒนาเทคนิค ELISA สำหรับการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส เชื้อ *E.coli* ที่ใช้สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนได้ในปริมาณมาก สะดวกในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ราคาถูก และโปรตีนที่ได้สามารถทำ partial purification โดยใช้ยูเรียเพื่อใช้ในการเตรียมแอนติเจน ผล ELISA แสดงให้เห็นว่าโปรตีน 3AB สามารถใช้แยกแอนติบอดีจากสุกรที่ได้รับเชื้อออกจากแอนติบอดีที่เกิดจากการฉีดวัคซีน จากผลการทดลองในครั้งนี้จะทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการให้สะดวก และรวดเร็วต่อการปฏิบัติงานมากขึ้น และจะนำไปใช้ในการสำรวจและเฝ้าติดตามการระบาดของโรคในประเทศไทย ในสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ปรีดา เลิศวัชรสารกุล. 2543. การผลิตโปรตีน 3AB ในเชื้อ *E.coli* สำหรับการตรวจสอบแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วรวิทย์ วัชชวัลคุ, สุวิชา เกษมสุวรรณ, วิไลรัตน์ คำสิงห์, จตุรงค์ วงศ์สินทิ, อติศร ยะวงศา, เกียรติศักดิ์ ต้นเจริญ, นิกร ทองทิพย์, วันดี รุ่งรัตนอุบล และธนู ภิญญภูมิมินทร์ 2542. การแยกเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แสดงอาการทางคลินิก น.388-391. ใน งานประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37, 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ม กรุงเทพมหานคร
- Knowles, N.J., P.R. Davies, T. Henry, V. O'Donnell, J.M. Pacheco, and P.W. Mason. 2001. Emergence in asia of foot and mouth disease viruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein. J. Virol. 75:1551-1556.
- Neizert, E., E. Beck, P.A. De Mello, I. Gomes, and I.E. Berdmann. 1991. Expression of the Aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infectinos. Virol. 184:799-804.

- Rodriguez, A., J. Dopopaza, J.C. Saiz, and F. Sobrino. 1994. Immunogenicity of non structural proteins of foot and mouth disease virus: difference between infected and vaccinated swine. Arch Virol. 136:123-131.
- Siebert, P.D., and A. Chenchik. 1993. Modified acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination. Nucleic Acids Research. 21:2019-2020.
- Silberstein, E., G. Kaplan, O. Tabogo, S. Duffey, and E. Dalma. 1997. Foot and mouth disease virus infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 protein. Arch. Virol. 142:795-805.
- Sorensen, K.J., K.G. Madsen, E.S. Madsen, J.S. Salt, J.Nqindi, and D.K.J. Mackey. 1998. Differentiation of infection from vaccination in foot and mouth disease by the detection of antibodies to non structural protein 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. Arch. Virol. 143:1461-1476.