บทคัดย่อ

การระบาดของไวรัส Influenza (H5N1) ในสัตว์ปีก และรายงานการติดเชื้อสายพันธุ์นี้จากสัตว์ปีกไปสู่คนในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2004-2005 ก่อให้เกิดความกังวลไปทั่วโลกว่าไวรัสสายพันธุ์นี้อาจเกิดกลายพันธุ์และสามารถแพร่เชื้อระหว่างมนุษย์ อาจทำให้เกิดเกิดการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อกรณีมีการระบาดเกิดขึ้น เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะช่วยลดความสูญเสียต่อชีวิตและทรัพย์สินของประชากรโลกได้ การผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสในปัจจุบันเป็นการผลิตไวรัส ซึ่งต้องมีการป้องกันการแพร่ของเชื้อไปยังสิ่งแวดล้อมขณะดำเนินการผลิต ซึ่งระบบป้องกันนั้นมีต้นทุนสูง โดยเฉพาะในการขยายขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

การผลิตวัคซีนในรูปแบบการใช้เฉพาะโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสส่วนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี เช่น Hemagglutinin เป็นการผลิตวัคซีนที่ไม่ต้องมีระบบควบคุมความปลอดภัยของไวรัสขณะดำเนินการผลิต โครงการนี้ได้ทำการผลิต Recombinant hemagglutinin protein จาก Baculovirus Expression Insect Cell System ซึ่งทำโดยการทำพันธุวิศ กรรมแบคคิวโลไวรัส ซึ่งเป็นไวรัสที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ให้มียีน hemagglutinin เป็นส่วนหนึ่งของพันธุกรรม และเมื่อนำแบคคิวโลไวรัสนี้ไปติดเชื้อเข้าสู่เซลล์แมลง เซลลแมลงมีการสร้าง recombinant hemagglutinin protein ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Western blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับโปรตีน hemagglutinin ของไวรัส Influenza (H5N1) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในถังหมัก 2.5 ลิตรพบว่า ควรใช้ไวรัสที่ MOI 0.1 ในการ infect เซลล์แมลงจำนวน $0.6x10^6$ เซลล์/มล. และทำการเก็บเกี่ยวรีคอมบีแนนต์โปรตีนในวันที่ 5 หลังการ infection ทำการสกัดรีคอมบีแนนต์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ซึ่งสามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนได้ ปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้เท่ากับ 228.5 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อนำรีคอมบีแนนต์ H5N1โปรตีนมาทดสอบการการสร้างภูมิคุ้มกันในหนูทดลองพบว่าเมื่อฉีดโปรตีนกระตุ้นหนู3 ครั้งและนำซีรัมของหนูมาตรวจพบว่ามีการสร้างสารภูมิคุ้มกันต่อรีคอมบีแนนต์ H5N1โปรตีนในหนูกลุ่มทดลองและไม่พบในกลุ่มควบคุม

คำสำคัญ: Influenza (H5N1), Baculovirus expression system and Hemagglutinin protein

Abstract

Spreading of avian influenza virus (H5N1) and reports on human infection during 2004-2005 caused worldwide concern on influenza pandemic. Vaccine is an alternative method to prevent loses from this disease. To produce this vaccine, viruses must be produced in large amount to be used as antigen to trigger immune system. The viruses are however infectious, therefore virus containment at high biosafety level is required. This certainly affects cost for construction of vaccine factory.

The method is to use recombinant influenza virus protein as antigen. Viral proteins that stimulate immune response such as hemagglutinin could be used. In this study, hemagglutinin protein was produced by Baculovirus Expression Insect Cell System. Baculovirus, which is safe to human and environment, was genetically engineered to have hemagglutin gene inserted into its genome. The genetically engineered baculoviruses were then infected into their natural insect cell hosts. The recombinant hemagglutinin protein was produced from infected insect cells. The optimal conditions in 2.5 l fermentor to produce the highest level of recombinant protein were obtained. It was found that the baculoviruses at multiplicity of infection (MOI) 0.1 was optimum for infection into 0.6×10^6 cells /ml and the protein could be harvested at 5 day post infection. The recombinant hemagglutinin from infected insect cells was purified by using chromatography.The purify heamaglutinin protein production was 228.5 μg /l. The immunogenicity was tested in Balb C mice and found the antibody againt H5N1 HA antigen in the serum of these mice.

Keywords: Influenza (H5N1), Baculovirus expression system and Hemagglutinin protein