

# Expression of Recombinant Capsid Protein of Psittacine Beak and Feather Disease Virus Capsid Protein using *Pichia pastoris* system

Ladawan Sariya<sup>1\*</sup> Parut Suksai<sup>1</sup> Adisak Songjaeng<sup>2</sup> Phirom Prompiram<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic Animals, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, 999 Phuttamonthon 4 Road, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand.

<sup>2</sup>Dengue Hemorrhagic Fever Research Unit, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.

\*Corresponding author, E-mail address: ladawan.sar@mahidol.ac.th

## Abstract

Psittacine beak and feather disease virus (BFDV) is a haemagglutination circovirus causing psittacine beak and feather disease (PBFD) in psittacine birds. The infected birds showed feather dystrophy and occasionally associated with beak deformities. Development of vaccine and detection of the disease is difficult and ineffective due to this virus could not be cultured in tissue or cell lines and embryonated eggs. The aim of this study was to express recombinant capsid protein of BFDV using *Pichia pastoris* system. The recombinant protein was purified by affinity binding with Ni-NTA resin. From the results, the time point of protein expression was 48 hours after inducing with methanol. The recombinant capsid protein was expressed in inclusion bodies form. From SDS-PAGE analysis, the protein had molecular weight of 38 kDa. Moreover, Western blot analysis demonstrated that this recombinant protein could react with convalescent serum from BFDV-infected bird. Based on this information, it would be a potential to develop in house BFDV capsid protein-based diagnostic test and vaccine in the future.

**Keywords:** Recombinant capsid protein, Psittacine beak and feather disease virus, *Pichiapastoris*

# การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัส โรคขนและงอยปากผิดปกติโดยใช้ระบบเชื้อยีสต์ *Pichiapastoris*

ลดาวัลย์ สาริยา<sup>1\*</sup> ปรุสก์ สุกุล<sup>1</sup> อติศักดิ์ ส่งแจ้ง<sup>2</sup> ภิรมย์ พรหมพิราม<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
999 ถ. พุทรมณฑล สาย 4 ต.สาขลา อ.พุทรมณฑล จ.นครปฐม 73170

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยโรคไข้เลือดออก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล อ.บางกอกน้อย จ.กรุงเทพมหานคร 10700  
<sup>\*</sup>ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: ladawan.sar@mahidol.ac.th

## บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติเป็น haemagglutination circo virus และเป็นสาเหตุของโรคขนและงอยปากผิดปกติที่พบในกลุ่มนกตระกูลนกปากขอ นกที่เป็นโรคจะมีอาการขนร่วงและอาจมีงอยปากยื่นยาวไม่สวยงาม เนื่องจากเชื้อนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเนื้อเยื่อหรือเซลล์เพาะเลี้ยงและไข่ไก่ฟักได้ เป็นผลให้การพัฒนาวีธีการตรวจและการพัฒนาวัคซีนต่อโรคทำได้ค่อนข้างยาก ดังนั้น ในการศึกษาในครั้งนี้จะทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติ โดยให้ยีสต์มีการแสดงออกโดยอาศัยระบบเชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* จากนั้นทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการ Affinity binding กับโมเลกุลของโกลเทินิก จากผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอกพบว่าโปรตีนมีการแสดงออกได้ดีที่สุดหลังจากกระตุ้นด้วยเมทานอล 48 ชั่วโมง และพบว่าส่วนใหญ่เป็น inclusion bodies เมื่อนำโปรตีนมาทำการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า พบว่าโปรตีนมีขนาดประมาณ 38 kDa นอกจากนี้ยังพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถจับกับซีรัมของนกที่ติดเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติได้ เมื่อตรวจด้วยวิธี Western blot analysis ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะช่วยให้นักพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อและผลิตวัคซีนต่อเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติ โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอกในอนาคต

คำสำคัญ : รีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอก เชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติ เชื้อยีสต์ *Pichiapastoris*

## บทนำ

เชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติ (Psittacine beak and feather disease virus) เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่ม haemagglutinating circovirus และเป็นสาเหตุของโรคขนและงอยปากผิดปกติ (Psittacine beak and feather disease) ที่พบในกลุ่มนกตระกูลนกปากขอทั่วโลก เช่น ประเทศเยอรมนี (Rahaus and Wolff, 2003) แอฟริกาใต้ (Heath et al., 2004) อิตาลี (Bert et al., 2005) รวมทั้งในประเทศไทยด้วย (Banlunara et al., 2002; Sariya et al., 2011) โดยเชื้อไวรัสจะเข้าไปทำลายเซลล์บริเวณโคนขน ฝักหนั่งและงอยปากของนกที่ติดเชื้อ ทำให้ขนมีอาการเส้นขนหลุดร่วง ก้านขนเปราะแตกหักง่ายและก้านขนไม่พัฒนา ทำให้ขนหงิกงอ การทำลายเซลล์บริเวณงอยปากทำให้งอยปากผิดปกติรูปร่าง เช่น งอยปากยาวผิดปกติ และยังทำให้งอยปากกร่อนได้ง่าย (Pass and Perry, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่านกที่ติดเชื้อไวรัสนี้จะมีภูมิคุ้มกันบกพร่องเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อที่ต่อมไทมัสและที่ต่อมเบอร์ดซำทำให้นกป่วยตายด้วยโรคติดเชื้อแทรกซ้อนจากเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา (Adair, 2000) และนกที่หายจากโรคนี้อาจจะยังมีชีวิตอยู่รอดต่อไปได้ แต่จะเป็นพาหะในการแพร่เชื้อสู่คนอื่นๆ บริเวณข้างเคียงได้ (Ritchie et al., 1991) เชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติเป็นไวรัสไม่มีเปลือกนอก (non-envelop virus) มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคไวรัสประมาณ 17 ถึง 23.5 นาโนเมตร (Niagro et al., 1998) มีสารพันธุกรรมเป็น DNA ชนิดวงกลมสายเดี่ยวขนาดประมาณ 1992 ถึง 2018 เบสซึ่งประกอบด้วย 3-7 open reading frames (ORF) แต่อย่างไรก็ตามมีเพียง 3 ORF ที่พบในทุกๆ สายพันธุ์ได้แก่ ORF1 ORF2 และ ORF5 (Bassami et al., 2001; Sariya et al., 2011) โดย ORF1 เป็น *rep* gene ที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส ORF2 เป็น *cap* gene ที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนเปลือกนอก (capsid) ของไวรัสส่วน ORF5 ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ จากการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมของยีนที่สร้างโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติที่แยกได้จากนกสายพันธุ์ต่างๆ จากหลายประเทศ พบว่าเชื่อนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง โดยสามารถแยกเชื้อได้เป็น 6 กลุ่ม (Phylogenetic cluster) โดยพบว่าแต่ละกลุ่มมีความจำเพาะในนกแต่ละสายพันธุ์และยังจำเพาะกับพื้นที่อีกด้วย (Bassami et al., 2001; Kloet and Kloet,

2004) สำหรับการศึกษายีนโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อที่แยกได้จากนกสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทยสามารถแยกเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม I กลุ่ม II และกลุ่ม V โดยเชื้อกลุ่ม I เป็นเชื้อที่มีความจำเพาะกับสายพันธุ์นกและพบในประเทศไทยเท่านั้น เชื้อกลุ่ม II เป็นเชื้อที่จำเพาะกับสายพันธุ์นกและพบในประเทศไทยและประเทศออสเตรเลีย และกลุ่ม V เป็นเชื้อที่ไม่มีความจำเพาะต่อพื้นที่และสายพันธุ์นก (Sariya et al., 2011) ถึงแม้ว่าเชื้อที่พบในปัจจุบันมีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบความแตกต่างทางซีโรไทป์ของเชื้อ (Raidal et al., 1993)

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสนี้ได้ทำให้การพัฒนาวัคซีนล่าช้าและการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อจึงมุ่งเน้นตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสูง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติเพื่อใช้ในการผลิตวัคซีนและการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี Hemagglutination และ Hemagglutination inhibition ซึ่งวิธีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีทั้งระบบการใช้โปรคาริโอต (Prokaryote) เช่น การใช้ *Escherichia coli* (Patterson et al., 2013) ซึ่งระบบนี้ถึงแม้จะสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากและมีค่าใช้จ่ายน้อย แต่โปรตีนที่ได้ส่วนมากจะอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำและคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนไม่ดีเนื่องจากไม่มีขบวนการหลังการสร้างโปรตีน (Posttranslational modification) และอีกระบบคือระบบการใช้ยูคาริโอต (Eukaryote) เช่น การใช้ Baculovirus (Stewart et al., 2007; Duvenage et al., 2013) ซึ่งขบวนการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีขบวนการหลังการสร้างโปรตีนทำให้โปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนคล้ายคลึงกับโปรตีนเปลือกนอกของไวรัสในธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าระบบดังกล่าวไม่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณมากและมีค่าใช้จ่ายสูง (Heath et al., 2006) ดังนั้น ในการศึกษาในครั้งนี้จะทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติ โดยให้มีการแสดงออกในระบบเชื้อยีสต์ *P. pastoris* ซึ่งเป็นระบบการแสดงออกที่ง่ายมีค่าใช้จ่ายน้อยแต่ผลิตโปรตีนได้ปริมาณมากและโปรตีนจะมีขบวนการหลังการสร้างโปรตีนเช่นเดียวกับระบบการแสดงออกในยูคาริโอตทำให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโปรตีนที่แยกได้จากเชื้อธรรมชาติ (Cregg et al., 2000)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### เชื้อไวรัสและซีรัม

เชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เป็นเชื้อที่แยกได้จากนกกระต๊อตัวดำ (*Probosciger aterrimus goliath*) Accession no. GU015022 (BFDV13/49) ซึ่งเป็นตัวแทนเชื้อไวรัสกลุ่ม I ที่พบในประเทศไทยเท่านั้น (Sariya et al., 2011) ส่วนซีรัมได้จากนกกระต๊อที่ติดเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติและนกที่ไม่ติดเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติเป็นนกที่ทราบประวัติสุขภาพแน่ชัด และผ่านการตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่นและสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

### การโคลนยีนโปรตีนเปลือกนอกเข้าพลาสมิด pPICZαA

เพิ่มปริมาณยีนโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติด้วยการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BFDV-Cap-6f-*KpnI* (5' ATC GGT ACC CCA ATG GCT GCA GTG CC 3') และ BFDV-Cap-843r-*XbaI* (5' TGT TCT AGA TAA GTG CTT GGA TTG TTA GG 3') ไพรเมอร์นี้ออกแบบมาจากส่วนที่มีความคงตัวสูง (conserved sequence) ของยีนโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคขนและงอยปากผิดปกติที่พบในประเทศไทย

ส่วนประกอบของน้ำยา PCR มีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำยาแต่ละชนิดใน PCR ปริมาตร 25 µl ดังนี้ 1X PFU DNA buffer (MgSO<sub>4</sub>) 0.4 mM dNTPs mix 0.5 M primer forward 0.5 M primer reverse เอนไซม์ PFU DNA polymerase ปริมาณ 0.5 unit และ DNA template ปริมาตร 10-100 ng จากนั้นผสมให้เข้ากันและนำไปใส่ในเครื่อง DNA thermal cycler (Biorad, USA) โดยใช้พารามิเตอร์และจำนวนรอบของการทำ PCR คือ first denature ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ และ Denature ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที Annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที จำนวน 35 รอบ และสุดท้าย Final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำ PCR product (ยีนโปรตีนเปลือกนอก) ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้

Gel extraction kit (QIAGEN, Germany) ทำการตัดพลาสมิด pPICZαA และยีนโปรตีนเปลือกนอกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *XbaI* และเชื่อมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligatase (NEB, United kingdom) แล้วนำไป Transform เข้า *E. coli* TOP10F' (Invitrogen, USA) โดยใช้ Calcium chloride และคัดเลือกพลาสมิดที่มีการแทรกของยีนโปรตีนเปลือกนอก โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Low salt LB medium ที่มียา zeocin และตรวจลำดับเบสของยีนโปรตีนเปลือกนอกด้วยการทำ Sequencing เมื่อได้พลาสมิดที่มีการแทรกของยีนโปรตีนเปลือกนอกแล้วนำพลาสมิดดังกล่าวไป Transform เข้าเชื้อยีสต์ *P. pastoris* strain KM71H โดยใช้ Easy Comp transformation (Invitrogen, USA) และคัดเลือกพลาสมิดที่มีการแทรกของยีนโปรตีนเปลือกนอกโดยนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract peptone dextrose sorbital ที่มียา zeocin

### การหาเวลาที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอก

นำเชื้อยีสต์ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ buffer glycerol-complex medium (BMGY) ปริมาตร 1 ml ที่ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ประมาณ 16-18 ชั่วโมงมาถ่ายลงใน flask ขนาด 500 ml ที่มี BMGY ปริมาตร 100 ml ปิดด้วยฝักก๊อชสะอาด 2 ชั้น บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที จนกว่าเชื้อขุ่นจนได้ OD600 เท่ากับ 2.0 จากนั้นนำเชื้อไปปั่นที่ 3000 x g นาน 5 นาทีเทส่วนใสส่วนบนทิ้งและละลายตะกอนด้วย buffer methanol-complex (BMMY) medium ให้ได้ความขุ่น OD600 เท่ากับ 1.0 เทเชื้อทั้งหมดลงใน flask ขนาด 250 ml ปิดด้วยฝักก๊อชสะอาด 2 ชั้น และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที นาน 96 ชั่วโมง โดยเติม 100% เมทานอล (methanol) ลงใน flask ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5% ทุกๆ 24 ชั่วโมง และเก็บเชื้อปริมาณ 1 ml ใส่ในหลอด 1.5 ml ทุกๆ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเพื่อเก็บส่วนใสและเซลล์โดยเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อสำหรับตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอกโดยวิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การเตรียมโปรตีน การทำ Western blot analysis และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) purification kit

แตกเซลล์ยีสต์ด้วย acid-wash glass bead โดยเขย่าด้วย vortex นาน 30 วินาที พักบนน้ำแข็งนาน 30 วินาที และทำซ้ำอีก 7 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 x g นาน 10 นาที แล้วเก็บโปรตีนส่วนใสซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำ (Soluble protein) ไว้สำหรับทำ SDS-PAGE โดยใช้เจลความเข้มข้น 12% และแยกที่ 120 volt นาน 90 นาที จากนั้นย้อมดูโปรตีนด้วย Coomassie blue

การทำ Western blotting ทำได้โดยถ่ายโปรตีนจากเจล SDS-PAGE ลงบน nitrocellulose membrane (BioRad, USA) ที่ 120 volt นาน 120 นาที และ block ด้วย 5% skim milk-T นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและล้างด้วย PBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ย้อมด้วยซีรัมกึ่งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติเงือง 1:20 นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และหลังจากที่ล้างด้วย PBS-T แล้วย้อมด้วย Protein A-HRP เงือง 1: 5,000 นาน 1 ชั่วโมงตรวจหา band โปรตีนที่เกิดขึ้นด้วย DAB substrate (Pierce, USA) นาน 5-10 นาที

ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอกให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA resin (Invitrogen, USA) ในสภาวะ Native purification พร้อมทั้งวัดปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วย Bio-Rad protein assay (BioRad, USA) และเก็บโปรตีนไว้ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

## ผลการวิจัย

**การโคลนยีนโปรตีนเปลือกนอกเข้ากับพลาสมิด pPICZ $\alpha$ A**

จากการเชื่อมยีนโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติกับพลาสมิด pPICZ $\alpha$ A และ Transform เข้า *E. coli* TOP10F<sup>r</sup> จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีการแทรกสอดของยีนโปรตีนเปลือกนอกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี zeocin พบว่ามีทั้งหมด 3 โคลน คือ โคลนที่ 10 โคลนที่ 11 และโคลนที่ 16 และเมื่อนำทั้ง 3 โคลนไปหาลำดับสารพันธุกรรมพบว่ายีนโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสเชื่อมต่อกับพลาสมิดแบบถูกต้องทิศทางและมีลำดับสารพันธุกรรมถูกต้อง (ดังแสดงในรูปที่ 1)

**การหาเวลาที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอก**

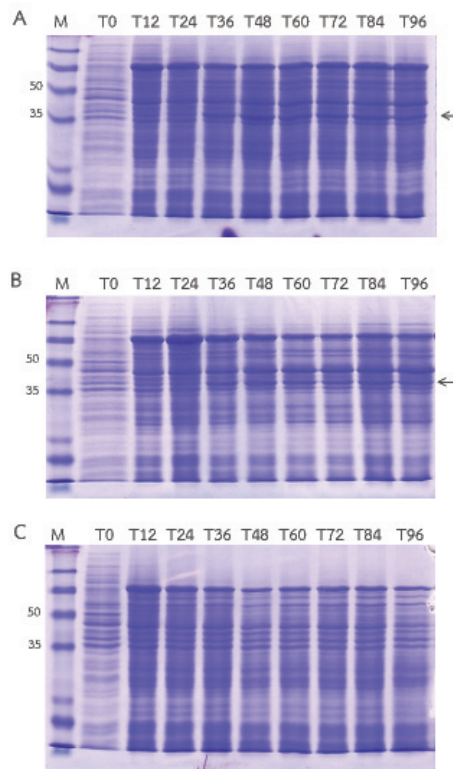
เมื่อนำพลาสมิดจากโคลนที่ 10 และ 11 ไป Transform เข้าเชื้อยีสต์ *P. pastoris* strain KM71H แล้วนำเชื้อยีสต์ที่ได้ไปกระตุ้นด้วยเมทานอล ในระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับ *P. pastoris* KM71H ที่มีเฉพาะพลาสมิด และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์และโปรตีนจากเซลล์มาทำ SDS-PAGE พบว่ายีสต์ *P. pastoris* KM71H integrant โคลนที่ 10 เริ่มมีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกนอกในชั่วโมงที่ 36 และแสดงออกมากขึ้นและคงที่ในชั่วโมงที่ 48-96 ขณะที่ยีสต์ *P. pastoris* KM71H integrant โคลนที่ 11 เริ่มมีการแสดงออกของโปรตีนเปลือกนอกในชั่วโมงที่ 36 และแสดงออกมากขึ้นในชั่วโมงที่ 48 จากนั้นเริ่มมีการแสดงออกลดลงเล็กน้อยและคงที่ในชั่วโมงที่ 60-96 ดังนั้น เวลาที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนเปลือกนอกจาก *P. pastoris* KM71H integrant โคลนที่ 10 และ 11 คือ ชั่วโมงที่ 48 เนื่องจากโปรตีนมีการแสดงออกมากที่สุดและเร็วที่สุด โดยโปรตีนเปลือกนอกของไวรัสอยู่ในเซลล์ยีสต์ (inclusion bodies) เป็นโปรตีนขนาดประมาณ 38 kDa ดังแสดงในรูปที่ 2 ขณะที่ไม่พบโปรตีนเปลือกนอกในน้ำเลี้ยงเซลล์ (ไม่ได้แสดงผล) และเมื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA resin พบว่าได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง (ดังแสดงในรูปที่ 3) และโปรตีนมีความเข้มข้น 15.4 mg/L

**การตรวจความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอกโดยวิธี Western blotting**

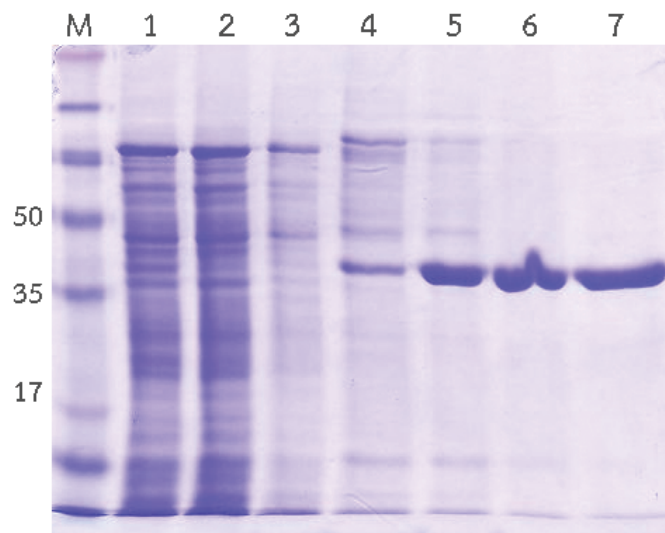
เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้นั้น มีความจำเพาะกับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติหรือไม่ สามารถทำได้โดยนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนนั้นมาทำ Western blotting โดยการย้อมด้วยซีรัมกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติโดยธรรมชาติ พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถจับกับซีรัมกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสได้อย่างจำเพาะ ขณะที่รีคอมบิแนนท์โปรตีนไม่จับกับซีรัมของนกที่ไม่ติดเชื้อไวรัสดังแสดงในรูปที่ 4

|             |             |             |             |             |             |             |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|             | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... |
|             | 5           | 15          | 25          | 35          | 45          | 55          |
| Capsid gene | -----       | -----       | -----       | -----       | ----AATGGC  | TGCAGTGCCC  |
| Clone 10    | GCTGAATTCA  | CGTGGCCCAG  | CCGGCCCGTCT | CGGATCGGTA  | CCCCAATGGC  | TGCAGTGCCC  |
| Clone 11    | GCTGAATTCA  | CGTGGCCCAG  | CCGGCCCGTCT | CGGATCGGTA  | CCCCAATGGC  | TGCAGTGCCC  |
| Clone 16    | GCTGAATTCA  | CGTGGCCCAG  | CCGGCCCGTCT | CGGATCGGTA  | CCCCAATGGC  | TGCAGTGCCC  |
|             | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... |
|             | 65          | 75          | 85          | 95          | 105         | 115         |
| Capsid gene | CGGTGCCCCA  | GGCGGCGGGT  | AATACTAACC  | GCCGCCTGTG  | GGGCACCTCT  | AACTGCGCAT  |
| Clone 10    | CGGTGCCCCA  | GGCGGCGGGT  | AATACTAACC  | GCCGCCTGTG  | GGGCACCTCT  | AACTGCGCAT  |
| Clone 11    | CGGTGCCCCA  | GGCGGCGGGT  | AATACTAACC  | GCCGCCTGTG  | GGGCACCTCT  | AACTGCGCAT  |
| Clone 16    | CGGTGCCCCA  | GGCGGCGGGT  | AATACTAACC  | GCCGCCTGTG  | GGGCACCTCT  | AACTGCGCAT  |
|             | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... |
|             | 125         | 135         | 145         | 155         | 165         | 175         |
| Capsid gene | GCGCTATATT  | TTCAGATTAG  | ACGAAGATAT  | GCCCGCCCAT  | ACTACCGCAG  | ACGTCACATC  |
| Clone 10    | GCGCTATATT  | TTCAGATTAG  | ACGAAGATAT  | GCCCGCCCAT  | ACTACCGCAG  | ACGTCACATC  |
| Clone 11    | GCGCTATATT  | TTCAGATTAG  | ACGAAGATAT  | GCCCGCCCAT  | ACTACCGCAG  | ACGTCACATC  |
| Clone 16    | GCGCTATATT  | TTCAGATTAG  | ACGAAGATAT  | GCCCGCCCAT  | ACTACCGCAG  | ACGTCACATA  |
|             | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... |
|             | 185         | 195         | 205         | 215         | 225         | 235         |
| Capsid gene | AGGCGATACC  | GCCGGGCGACG | TAGACACGTC  | CGCAGACGCC  | GTTTCACAAC  | CAATAGAGTT  |
| Clone 10    | AGGCGATACC  | GCCGGGCGACG | TAGACACGTC  | CGCAGACGCC  | GTTTCACAAC  | CAATAGAGTT  |
| Clone 11    | AGGCGATACC  | GCCGGGCGACG | TAGACACGTC  | CGCAGACGCC  | GTTTCACAAC  | CAATAGAGTT  |
| Clone 16    | AGGCGATACC  | GCCGGGCGACG | TAGACACGTC  | CGCAGACGCC  | GTTTCACAAC  | CAATAGAGTT  |
|             | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... |
|             | 245         | 255         | 265         | 275         | 285         | 295         |
| Capsid gene | TACACTCTCC  | GACTCAAACG  | CGAATTCAAA  | TTCGAAATTC  | AGAAACAAC   | CACCAGTACT  |
| Clone 10    | TACACTCTCC  | GACTCAAACG  | CGAATTCAAA  | TTCGAAATTC  | AGAAACAAC   | CACCAGTACT  |
| Clone 11    | TACACTCTCC  | GACTCAAACG  | CGAATTCAAA  | TTCGAAATTC  | AGAAACAAC   | CACCAGTACT  |
| clone 16    | TACACTCTCC  | GACTCAAACG  | CGAATTCAAA  | TTCGAAATTC  | AGAAACAAC   | CACCAGTACT  |
|             | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... |
|             | 305         | 315         | 325         | 335         | 345         | 355         |
| Capsid gene | GGCAACATAA  | TTTGGAATTC  | TGACTACATA  | ACATTTGCAT  | TGTCAGACTT  | CCTAAACACA  |
| Clone 10    | GGCAACATAA  | TTTGGAATTC  | TGACTACATA  | ACATTTGCAT  | TGTCAGACTT  | CCTAAACACA  |
| Clone 11    | GGCAACATAA  | TTTGGAATTC  | TGACTACATA  | ACATTTGCAT  | TGTCAGACTT  | CCTAAACACA  |
| Clone 16    | GGCAACATAA  | TTTGGAATTC  | TGACTACATA  | ACATTTGCAT  | TGTCAGACTT  | CCTAAACACA  |
|             | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... |
|             | 365         | 375         | 385         | 395         | 405         | 415         |
| Capsid gene | CCAAACCCTC  | CAAACTTAA   | TTTCGAAGAC  | TACCGAATTA  | AGTTAGCTAA  | AATGGAAATG  |
| Clone 10    | CCAAACCCTC  | CAAACTTAA   | TTTCGAAGAC  | TACCGAATTA  | AGTTAGCTAA  | AATGGAAATG  |
| Clone 11    | CCAAACCCTC  | CAAACTTAA   | TTTCGAAGAC  | TACCGAATTA  | AGTTAGCTAA  | AATGGAAATG  |
| Clone 16    | CCAAACCCTC  | CAAACTTAA   | TTTCGAAGAC  | TACCGAATTA  | AGTTAGCTAA  | AATGGAAATG  |
|             | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... | ..... ..... |
|             | 425         | 435         | 445         | 455         | 465         | 475         |
| Capsid gene | AGGCCACAT   | GGGGCCACTA  | CTCCATTCT   | TCAGAAGGAT  | TCGGCCACAC  | GGCCGTAATC  |
| Clone 10    | AGGCCACAT   | GGGGCCACTA  | CTCCATTCT   | TCAGAAGGAT  | TCGGCCACAC  | GGCCGTAATC  |
| Clone 11    | AGGCCACAT   | GGGGCCACTA  | CTCCATTCT   | TCAGAAGGAT  | TCGGCCACAC  | GGCCGTAATC  |
| Clone 16    | AGGCCACAT   | GGGGCCACTA  | CTCCATTCT   | TCAGAAGGAT  | TCGGCCACAC  | GGCCGTAATC  |

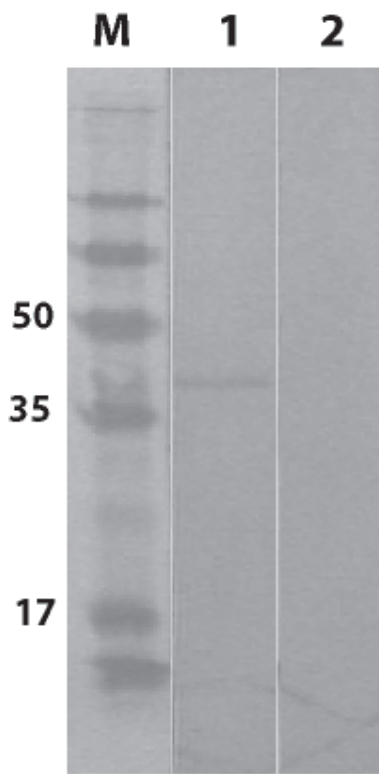
รูปที่ 1 แสดงผลการหาลำดับเบสยีนโปรตีนเปลือกนอกที่เชื่อมกับพลาสมิด pPICZαA โคลนที่ 10, 11 และ 16 เมื่อเทียบกับยีนโปรตีนเปลือกนอก (Capsid gene) ของเชื้อไวรัสโรคขนและจอยปากคุดปกติ (Accession no. GU015022)



**รูปที่ 2** แสดงการทำ SDS-PAGE โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนจากเซลล์ยีสต์ที่เก็บในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 **A:** โปรตีนจากเซลล์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H integrant โคโลนี่ 10, **B:** โปรตีนจากเซลล์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H integrant โคโลนี่ 11, **C:** โปรตีนจากเซลล์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H/vector ลูกศรแสดงโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคน และจอยปากผิดปกติ **M:** protein standard marker (kDa)



**รูปที่ 3** แสดงการทำ SDS-PAGE ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคนและจอยปากผิดปกติหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA resin Lane ที่ 1 คือ โปรตีนก่อนทำให้บริสุทธิ์ Lane ที่ 2 คือ โปรตีนที่เหลือหลังจากการจับกับ Ni-NTA resin Lane ที่ 3 คือ โปรตีนที่ออกมาจากการล้าง Lane ที่ 4-7 คือ โปรตีนส่วนที่ 1-4 ที่ออกมาหลังจากเติม Elution buffer ตามลำดับ **M:** protein standard marker (kDa)



**รูปที่ 4** แสดงผลการทำ Western blotting เมื่อนำรีคอมบีแนนท์โปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติ ย้อมด้วยซีรัมคนที่ติดเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติ (Lane ที่ 1) และย้อมด้วยซีรัมคนที่ไม่ติดเชื้อ (Lane ที่ 2) M: protein standard marker (kDa)

### วิจารณ์

โรคนและงอยปากผิดปกติ มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติ นกที่ติดเชื้อจะมีอาการขนร่วงงอยปากยื่นยาวไม่สวยงาม เป็นสาเหตุการตายในนกติดเชื้อที่มีอายุน้อยซึ่งระบบภูมิคุ้มกันไม่ดี และมักพบโรคนในนกสวยงามตระกูลนกปากขอทั้งที่เป็นสายพันธุ์พื้นถิ่นไทยและสายพันธุ์ต่างประเทศ (Banlunara et al., 2002; Rahaus and Wolff, 2003; Heath et al., 2004; Bert et al., 2005; Sariya et al., 2011) และเนื่องจากเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติสามารถติดต่อโดยผ่านทางฝุ่นขนของนกที่ติดเชื้อ ดังนั้นถ้ามีการควบคุมโรคไม่ก็จะทำให้มีการแพร่กระจายของโรคในวงกว้าง ทำให้นกตระกูลนกปากขอที่มีอายุน้อยเกิดการตายมากขึ้นส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจการเลี้ยงนกสวยงามเป็นอย่างมากและอาจส่งผลให้นกตระกูลนกปากขอสายพันธุ์พื้นถิ่นไทยสูญพันธุ์ได้ในที่สุด เนื่องจากการเพาะ

เลี้ยงเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติในห้องปฏิบัติการยังไม่ประสบความสำเร็จทำให้การพัฒนาวัคซีนและการตรวจวินิจฉัยโรคนนี้เป็นไปอย่างล่าช้าและเนื่องจากโปรตีนเปลือกนอกของไวรัสเป็นโปรตีนส่วนที่มีการชักนำให้คนที่ติดเชื้อสร้างแอนติบอดีมากที่สุด ดังนั้นจึงมีการพัฒนาคอมบีแนนท์โปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสเพื่อใช้ในการผลิตวัคซีนและการตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อนำไปสู่การควบคุมโรคอย่างยั่งยืน ซึ่งการทดลองนี้ได้ผลิตรีคอมบีแนนท์โปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติโดยให้มีการแสดงออกในระบบยีสต์ โดยข้อดีของระบบยีสต์ คือ จะได้รับคอมบีแนนท์โปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสในธรรมชาติ และนอกจากนี้ในระบบของยีสต์มีขบวนการหลังการสร้างโปรตีนเช่นเดียวกันกับการเพิ่มจำนวนของไวรัสในโฮสต์ธรรมชาติ ทำให้รีคอมบีแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้มีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสในธรรมชาติจากผลการวิจัยในครั้งนี้ พบว่ารีคอมบีแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 38 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติมีขนาดประมาณ 28-32 kDa (Bassami et al., 2001, Stewart et al., 2007) และเมื่อทำรีคอมบีแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA พบว่าได้โปรตีนปริมาณมากถึง 15.4 mg/L ซึ่งการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง และจากการทำ Western blotting พบว่ารีคอมบีแนนท์โปรตีนสามารถจับแบบจำเพาะกับซีรัมคนที่ติดเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติแสดงให้เห็นว่ารีคอมบีแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ในการทดลองนี้มีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนคล้ายคลึงกับโปรตีนเปลือกนอกของเชื้อไวรัสในธรรมชาติ

แม้จะยังไม่มียารักษาการพบความแตกต่างทางซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติ แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าลำดับสารพันธุกรรมของยีนโปรตีนเปลือกนอกนี้มีความแตกต่างกันค่อนข้างสูงในเชื้อที่แยกได้จากนกแต่ละสายพันธุ์และในแต่ละพื้นที่อีกด้วย (Bassami et al., 2001; Kloet and Kloet, 2004; Sariya et al., 2011) ซึ่งการทดลองนี้ได้ใช้ไวรัสที่แยกได้จากนกที่ติดเชื้อไวรัสโรคนและงอยปากผิดปกติในประเทศไทยและเป็นตัวแทนเชื้อไวรัสกลุ่มที่พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น (Sariya et al., 2011) ดังนั้นโปรตีนเปลือกนอกที่ได้จากการทดลองนี้จึง



น่าจะมีความเหมาะสมในการพัฒนาใช้เป็นวัคซีนสำหรับนกในประเทศไทยและนอกจากนี้ยังสามารถนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปเป็นแอนติเจนในเทคนิคต่างๆ เช่น Hemagglutination test, Hemagglutination inhibition test หรือ Enzyme-linked immunosorbent assay ในการตรวจหาแอนติบอดีในนกที่ติดเชื้อในประเทศไทยต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหิดล

### เอกสารอ้างอิง

- Adair BM. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Devel Comp Immun.* 2000; 24(2-4): 247-55.
- Banlunara WK, Tantileartcharoen R, Katayana K, Suzuki K, Lekdumrogsak T, Nakayama H, et al. Psittacine Beak and Feather Disease in Three Captive Sulphur-Crested Cockatoos (*Cacatuagalerita*) in Thailand. *J Vet Med Sc.* 2002; 64(6): 527-9.
- Bassami MR, Ypelaar I, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR. Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in Psittacine species in Australia. *Virology.* 2001; 279(2): 392-400.
- Bert E, Tomassone L, Peccati C, Navarrete MG Sola SC. Detection of Beak and Feather Disease Virus (BFDV) and Avian Polyomavirus (APV) DNA in Psittacine Birds in Italy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52(2): 64-8.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 2000; 16(1): 23-52.
- Duvenage L, Hitzeroth II, Meyers AE, Rybicki EP. Expression in tobacco and purification of beak and feather disease virus capsid protein fused to elastin-like polypeptides. *J Virol Methods.* 2013; 191(1): 55-62.
- Heath L, Martin DP, Warburton L, Perrin M, Horsfield W, Kingsley C, et al. Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in southern Africa. *J Viro.* 2004; 78(17): 9277-84.
- Heath L, Williamson AL, Rybicki EP. The capsid protein of beak and feather disease virus binds to the viral DNA and is responsible for transporting the replication-associated protein into the nucleus. *J Virol.* 2006; 80(14): 7219-25.
- Kloet E de, Kloet SR de. Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity. *Arch Virol.* 2004; 149(12): 2393-412.
- Niagro FD, Forsthoefel AN, Lawther RP, Kamalanathan L, Ritchie BW, Latimer KS, et al. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol.* 1998; 143(9): 1723-44.
- Pass DA, Perry RA. The pathology of psittacine beak and feather disease. *Aust Vet J.* 1984; 61(3): 69-74.
- Patterson EI, Swarbrick CM, Roman N, Forwood JK, Raidal SR. Differential expression of two isolates of beak and feather disease virus capsid protein in *Escherichia coli*. *J Virol Methods.* 2013; 189(1): 118-24.
- Rahaus M, Wolff MH. Psittacine Beak and Feather Disease: a First Survey of the Distribution of Beak and Feather Disease Virus Inside the Population of Captive Psittacine Birds in Germany. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003; 50(8): 368-71.
- Ritchie BW, Niagro FD, Latimer KS, Steffens WL, Pesti DMS, Ancona JMS, et al. Routes of prevalence of shedding of psittacine beak and feather disease virus. *Am J Vet Res.* 1991; 52(11): 1804-9.
- Sariya L, Prompiram P, Khocharin W, Tangsudjai S, Phonarknguen R, Rattanakorn P, et al. Genetic analysis of beak and feather disease virus isolated from captive psittacine birds in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011; 42(4): 851-8.

Schoemaker NJ, Dorrestein GM, Latimer KS, Lumeij JT, Kik MJ, van der Hage MH, et al. Severe leucopenia and liver necrosis in young African grey parrots (*Psittacineerithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. *Avian Dis.* 2000; 44(2): 470-8.

Stewart ME, Bonne N, Shearer P, Khalesi B, Sharp M, Raidal S. Baculovirus expression of beak and feather disease virus (BFDV) capsid protein capable of self-assembly and haemagglutination. *J Virol Methods.* 2007; 141(2): 181-7.