



คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนโอเฟ่นริดติงเฟรม 2 ของเชื้อพอร์ไชน์เซอร์โคไวรัสไทป์ 2 ที่สกัดจากวัคซีนด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

สรวรยา อำนพพิศย์¹ ชนาธิป ธรรมการ^{1,*} และกนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์¹

¹ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1 ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการสกัดแยกโปรตีน ORF2 จากวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสไทป์ 2 ในสุรชนิตซ์ยูนิต เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยทำการสกัดโปรตีนออกจากวัคซีนด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันจาก 4 ผู้ผลิต ได้แก่ วัคซีน A: ประกอบด้วยโปรตีน ORF2 ไม่น้อยกว่า 200 ไมโครกรัมและคาร์โบเมอร์ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร วัคซีน B: ประกอบด้วยโปรตีน ORF2 100 ไมโครกรัม และอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร วัคซีน C: ประกอบด้วยโปรตีน ORF2 ไม่น้อยกว่า 1 RP. และคาร์โบเมอร์ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และวัคซีน D: ประกอบด้วยโปรตีน ORF2 ไม่น้อยกว่า 1 RP./2 มิลลิลิตร ใน oil in water emulsion ทำการตรวจสอบโปรตีนหลังการสกัดแยกด้วยวิธี Gel Electrophoresis ชนิด Native Polyacrylamide และ Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide รวมถึงหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford แล้วจึงทำการคัดเลือกโปรตีนจากวัคซีนที่เหมาะสมไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนด้วยวิธี Dot blot และ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ผลที่ได้พบว่าโปรตีน ORF2 ที่สกัดจากวัคซีน B มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการทดสอบทางภูมิคุ้มกัน โปรตีน ORF2 ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนรวมที่สกัดได้สามารถจับกับซีรัมควบคุมผลบวกที่มีระดับภูมิคุ้มกันระดับสูงต่อเชื้อ PCV2 ได้ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี Dot blot และ ELISA โดยสามารถให้ผลต่างระหว่างการทดสอบด้วยซีรัมควบคุมผลบวกและลบมากกว่า 4 เท่า เมื่อใช้โปรตีนที่สกัดได้ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เคลือบลงบน Solid phase ร่วมกับการใช้ Secondary antibody ที่ระดับการเจือจาง 1:80,000 ผลที่ได้นี้สามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจวินิจฉัย หรือกระบวนการทดสอบอื่นๆทางภูมิคุ้มกันสำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้สำหรับประเมินสถานการณ์ของโรคติดเชื้อ PCV2 ภายในฟาร์ม ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันและการควบคุมโรคในระดับฝูงได้

คำสำคัญ: โอเฟ่นริดติงเฟรม 2 พอร์ไชน์เซอร์โคไวรัสไทป์ 2 วัคซีน อัลตราฟิลเตรชัน แอนติเจน

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2565. 17(1): 23-36.

E-mail address: chanathip.th@kmitl.ac.th

Antigenic Properties of Open Reading Frame 2 protein of Porcine Circovirus Type 2 from Vaccines Extracted by Ultrafiltration Method

Sawanya Umphonphison¹, Chanathip Thammakarn^{1,#}, and Kanokrat Srikitsasemwat¹

¹Department of Animal Production Technology and Fisheries, School of Agricultural Technology,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, 1 Chalongkrung Rd., Ladkrabang, Bangkok 10520.

Abstract: The purpose of this study was to determine the feasibility of extracting Open reading frame 2 (ORF2) protein from subunit vaccine against Porcine Circovirus type 2 infection, for the propose using as antigen for immunological testing. Proteins were extracted from vaccines by ultrafiltration from four manufacturers: Vaccine A: contains at least 200 mcg of ORF2 protein and 4 mg of carbomer per 1 ml. Vaccine B: contains 100 mcg of ORF2 protein and 2 mg of Aluminium hydroxide per 1 ml. Vaccine C: contains at least 1 RP. of ORF2 protein and 1 mg of carbomer per ml. Vaccine D: contains at least 1 RP. of ORF2 protein and oil in water emulsion per 2 ml. Total extracted proteins were assayed by gel electrophoresis using Native Polyacrylamide and Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide methods. Then the total proteins were examined by Bradford method. Finally, the extracted proteins from suitable vaccine were further examined for their antigenic properties using dot blot and Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The results revealed that the extracted ORF2 protein from vaccine B is suitable for use in immunological testing. The ORF2 protein which included in total extracted proteins solution able to bind to high immune level positive control serum against PCV2 by dot blot method as well as ELISA test. The difference between the positive and negative control serum was more than 4 times when 2 and 5 µg/ml of extracted proteins applied to the solid phase and 1:80,000 dilution of secondary antibody was used. The obtained results could be further developed into an ELISA assay or other immunological testing procedures for use as in-house testing. The tests can be used for assessing the situation of PCV2 infection disease in the farms, which are important tools to enhance the effectiveness of prevention and control of the disease at the herd level.

Keywords: Open reading frame 2, Porcine Circovirus Type 2, Vaccine, Ultrafiltration, Antigen

[#]Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2022 17(1): 23-36.

E-mail address: chanathip.th@kmitl.ac.th

บทนำ

โรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสไทป์ 2 (Porcine circovirus type 2; PCV2) ถือเป็นสาเหตุหลักของกลุ่มอาการลูกสุกรทรุดโทรมหลังหย่านม (Postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) ปัญหาโรคระบบทางเดินหายใจในสุกรหลังหย่านมและสุกรขุน ความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ในแม่สุกร และกลุ่มอาการผิวหนังอักเสบและไตเสื่อม (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome; PDNS) นอกจากนี้ยังสามารถติดเชื้อร่วมกับโรคติดเชื้อไวรัสอื่น ๆ เช่น Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV), Porcine parvovirus (PPV) และ Pseudorabies disease เป็นต้น ซึ่งจะเพิ่มความรุนแรงของโรคขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนได้ง่าย เกิดเป็นโรคระบบทางเดินหายใจแทรกซ้อนในสุกร (Porcine respiratory disease complex; PRDC) และยังมีส่วนสำคัญในการทำลายระบบภูมิคุ้มกันของสุกรอีกด้วย (Ellis *et al.*, 2003) ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากลุ่มอาการจากโรคติดเชื้อ PCV2 นั้นก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีประสิทธิภาพเพื่อคัดแยกสุกรป่วยออกจากฝูง

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับไวรัสวิทยาและชีววิทยาของโรคติดเชื้อ PCV2 รวมไปถึงการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยถือว่าเป็นสิ่งสำคัญเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นเครื่องมือสำคัญในการประเมินสถานการณ์เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันและการควบคุมโรคในระดับฝูง จึงมีการให้ความสนใจเกี่ยวกับโปรตีนโอเพ่นรีดดิ้งเฟรม 2 (Open reading frame 2; ORF2) เนื่องจากเป็นส่วนของ Capsid protein มีน้ำหนักประมาณ 28-30 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนโครงสร้างเพียงชนิดเดียวที่ห่อหุ้มไวรัสเอาไว้และเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของไวรัส (Nawagitgul *et al.* 2000) และมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด Specific immune

response และยังเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีชนิดกลางฤทธิ์ (Neutralizing antibodies) อีกด้วย (Pogranichnyy *et al.*, 2000) ด้วยคุณสมบัติที่สำคัญเหล่านี้ทำให้วัคซีนป้องกันโรค PCV2 ทางการค้าจำนวนมากที่จำหน่ายอยู่ในท้องตลาดเลือกใช้โปรตีน ORF2 เป็นแอนติเจน (Chae, 2012)

การตรวจการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อโรคติดเชื้อ PCV2 ในปัจจุบันมีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้ในภาคสนามมากที่สุดนั้นได้แก่วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และสามารถตรวจได้จำนวนมากในคราวเดียว ซึ่งปัจจุบันชุดตรวจที่ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้นต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศและมีราคาค่อนข้างสูงทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาวิธีการสกัดแยกโปรตีน ORF2 อย่างง่ายจากวัคซีนเพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาของติดเชื้อ PCV2 ในสุกร ทั้งนี้โปรตีน ORF2 ที่แยกได้นี้อาจนำไปใช้เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจอีไลซ่า หรือกระบวนการตรวจทางด้านภูมิคุ้มกันอื่นๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ ราคาถูกเพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย ควบคุม และการป้องกันโรคในระดับฝูงได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีนที่ใช้ในการสกัดแยกโปรตีน ORF2

การทดลองนี้ใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อ PCV2 ชนิดซบยูนิตที่ประกอบด้วยปริมาณและสื้อที่แตกต่างกันทั้งหมดจำนวน 4 ชนิด ดังนี้

1. วัคซีน A: ส่วนประกอบใน 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย PCV2 ORF2 โปรตีนแอนติเจนไม่น้อยกว่า 200 ไมโครกรัม และคาร์โบเมอร์ (Carbomer) 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
2. วัคซีน B: ส่วนประกอบใน 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย PCV2 ORF2 โปรตีนแอนติเจน 100 ไมโครกรัม และ

อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Aluminium hydroxide)

2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3. วัคซีน C: ส่วนประกอบใน 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย PCV2 ORF2 โปรตีนแอนติเจนไม่น้อยกว่า 1 RP. (1.0–3.75) และคาร์โบเมอร์ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
4. วัคซีน D: ส่วนประกอบใน 2 มิลลิลิตร ประกอบด้วย PCV2 ORF2 โปรตีนแอนติเจนไม่น้อยกว่า 1 RP. ใน oil in water emulsion

การสกัดแยกโปรตีน ORF2 ออกจากวัคซีน

ทำการสกัดแยกโปรตีน ORF2 ออกจากวัคซีน ด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration; UF) โดยการนำวัคซีนทั้ง 4 ชนิด ปริมาณชนิดละ 4 มล. ใส่ลงใน Microsep Advance Centrifugal Devices with Omega Membrane 3K (Microsep 3K; Pall, USA) แล้วทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยแรง 6,500 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนที่กรองผ่านลงมาด้านล่าง (Filtrate) ที่ซึ่งเป็นสารละลายส่วนเกินที่ไม่ต้องการ แล้วทำการเติมสารละลาย PBS (pH 7.2) ลงใน Microsep 3K ด้านบนตัวกรองให้มีปริมาณ 4 มล. (เท่ากับปริมาณเดิม) แล้วทำการปั่นเหวี่ยงและเติมสารละลาย PBS เช่นเดียวกับครั้งแรก โดยทำซ้ำอีกทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อเป็นการชะล้างสารละลายส่วนเกินและสื่อที่ใช้ในการผลิตวัคซีนออกให้มากที่สุด เมื่อปั่นเหวี่ยงครบทั้ง 4 ครั้งแล้วจึงทำการเก็บสารละลายโปรตีนซึ่งเป็นส่วนของแอนติเจนจากส่วนที่กักอยู่ด้านบนตัวกรอง (Retentate) ที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ในวัคซีน

ทำการตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรตีน ORF2 ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของวัคซีนด้วยการใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะคริลาไมด์ 2 ชนิด เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของโปรตีน ORF2 ก่อนและหลังการสกัดแยกด้วย Microsep 3K ได้แก่

1. การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native PAGE)

ใช้ชุดสำเร็จรูป NativePAGE Novex Bis-Tris Gels (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยทำการเตรียมตัวอย่างโดยผสม NativePAGE sample buffer (4X) 2.5 µl กับ NativePAGE 5% G-250 sample additive 1 µl และตัวอย่างโปรตีน 16.5 µl (ไม่ต้องให้ความร้อนกับตัวอย่าง) จากนั้นวางแผ่นเจลสำเร็จรูป (NativePAGE 4-16% bis-tris gel) ลงในอุปกรณ์สำหรับแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Mini gel tank; Thermo Fisher Scientific, USA) และเติม Dark blue cathode buffer ที่ช่องด้านหน้าเจล และ Anode buffer ที่ช่องด้านหลังเจล แล้วจึงทำการหยอดตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในช่องสำหรับใส่ตัวอย่างปริมาณช่องละ 20 µl และ NativeMark unstained protein standard (Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาณ 5 µl เพื่อใช้เป็นแถบโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นทำการต่อเข้ากับแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยตั้งค่าแรงดันไฟฟ้าที่ 150 V เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำแผ่นเจลออกจากแม่พิมพ์และนำมาแช่ในน้ำบริสุทธิ์ (Ultrapure, Type 1) เพื่อทำการล้างแผ่นเจลโดยวิธีการเขย่าด้วย 3D shaker เป็นเวลา 5 นาที ทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเศษเจลและสีหลังจากการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นย้อมสีเจลด้วย Imperial protein stain (Thermo Fisher Scientific; USA) ทิ้งไว้ข้ามคืน (อย่างน้อย 8 ชั่วโมง) เมื่อครบเวลาทำการล้างสีย้อมด้วยน้ำบริสุทธิ์ Type 1 โดยวิธีการเขย่าด้วย 3D shaker และเปลี่ยนน้ำทุกชั่วโมงจนกว่าพื้นหลังจะใสหรือเห็นแถบของโปรตีนได้ชัดเจนตามที่ต้องการ (ประมาณ 8 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จแล้วจึงอ่านผลที่ได้โดยทำการเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานเพื่อดูขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ปรากฏ

2. การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ใช้ชุดสำเร็จรูป NuPAGE Bis-Tris Mini Gels (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยทำการเตรียมตัวอย่างโดยผสม NuPAGE LDS sample buffer (4X) 2.5 μ l กับ NuPAGE reducing agent (10X) 1 μ l และตัวอย่างโปรตีน 11.5 μ l แล้วนำไปให้ความร้อนด้วย Dry bath incubator ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวางแผ่นเจลสำเร็จรูป (NuPAGE 4-12% bis-tris gel) ลงในอุปกรณ์สำหรับแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Mini gel tank; Thermo Fisher Scientific, USA) และเติม 1X SDS running buffer ที่ช่องทั้งด้านหน้าและด้านหลังเจล แล้วจึงทำการหยอดตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในช่องสำหรับใส่ตัวอย่างปริมาณช่องละ 15 μ l และ PageRuler plus prestained protein ladder (Thermo Fisher Scientific; USA) ปริมาณ 5 μ l เพื่อใช้เป็นแถบโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นทำการต่อเข้ากับแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยตั้งค่าแรงดันไฟฟ้าที่ 200 V เป็นเวลา 35 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำเจลออกจากแม่พิมพ์แช่ในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 เพื่อทำการล้างแผ่นเจลโดยวิธีการเขย่าด้วย 3D shaker เป็นเวลา 5 นาที ทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเศษเจลและสีหลังจากการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นย้อมสีเจลด้วย Imperial protein stain (Thermo Fisher Scientific, USA) บน 3D shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้างเจลด้วยน้ำบริสุทธิ์ Type 1 โดยวิธีการเขย่าด้วย 3D shaker และเปลี่ยนน้ำทุกชั่วโมงจนกว่าพื้นหลังจะใสหรือเห็นแถบของโปรตีนได้ชัดเจนตามที่ต้องการ (ประมาณ 8 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จแล้วจึงอ่านผลที่ได้โดยการเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานเพื่อดูขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ปรากฏ

การหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford

นำโปรตีนที่ได้จากการกรองแยกจากวัคซีนด้วย Microsep 3K มาวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) โดยทำตามคู่มือของชุด Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) มีขั้นตอนโดยสังเขปเริ่มจากนำสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA; Thermo Fisher Scientific, USA) เจือจางมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นและโปรตีนที่ต้องการวัดปริมาณเติมลงใน Sterilin clear microtiter plates (Thermo Fisher Scientific, USA) หลุมละปริมาณ 10 μ l แล้วเติม Coomassie (Bradford) protein assay reagent ปริมาณหลุมละ 250 μ l และผสมให้เข้ากันบน Microplate mixer เป็นเวลา 30 วินาที และทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาเข้าเครื่อง Microplate reader (AMR-100; Allsheng, China) เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 595 nm และเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีนเพื่อนำไปใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณโปรตีนรวมที่อยู่ในวัคซีนก่อนและหลังถูกสกัดแยกออกด้วย Microsep 3K ต่อไป

การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot

กำหนดจุดและบริเวณของตัวอย่างบนแผ่น Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Thermo Fisher Scientific, USA) และนำไปแช่ใน 100% methanol เป็นเวลาประมาณ 15 วินาที จากนั้นแช่ในน้ำบริสุทธิ์ Type 1 เป็นเวลา 2 นาที และนำไปแช่ต่อใน PBS-T (0.05% Tween-20 ใน PBS) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปรับสมดุลของ PVDF membrane แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

นำโปรตีนที่สกัดแยกออกจากวัคซีนด้วย Microsep 3K มาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.125-1 μ g/ml แล้วหยดลงบน PVDF membrane

ตำแหน่งละ 2 μ l และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนโปรตีนแห้ง แล้วจึงนำ membrane มาแช่ใน Blocking buffer (5% Skim milk ใน PBS ที่มี 0.1% Tween-20) พร้อมทั้งเขย่าด้วย 3D shaker เป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงเท Blocking buffer ออกแล้วบ่มด้วย Primary antibody ซึ่งเป็นซีรัมที่มีแอนติบอดีสูงต่อเชื้อ PCV2 (Titer = 10,728) ซึ่งผ่านการตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจมาตรฐานที่ผลิตเป็นการค้า (BioChek SK 105, UK) ที่เจือจางด้วย PBS-T ในอัตราส่วน 1:100, 1:200 และ 1:300 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงทำการล้างด้วย PBS-T พร้อมทั้งเขย่าด้วย 3D shaker ทั้งหมด 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วบ่มด้วย Rabbit anti-pig IgG (H+L) secondary antibody HRP (Thermo Fisher Scientific, USA) ที่เจือจางใน PBS-T 1:3,000 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงทำการล้างอีกครั้ง แล้วบ่มด้วย Pierce™ 1-Step Ultra TMB Blotting Solution (37574) (Thermo Fisher Scientific, USA) สังเกตผลบวกจากสีที่เกิดขึ้น ซึ่งจะแสดงว่าเกิดการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ทำการทดสอบ

การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธีอินไดเรกต์ไอโซล่า

ทำการเจือจางโปรตีนด้วย 0.05M bicarbonate-carbonate buffer (pH 9.6) ให้มีความเข้มข้น 1, 2 และ 5 μ g/ml แล้วเคลือบบนไมโครเพลทในปริมาณหลุมละ 100 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย Microplate mixer ประมาณ 30 วินาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง ต่อมาล้างหลุมที่เคลือบไว้ด้วยสารละลาย PBS-T ปริมาณหลุมละ 300 μ l ทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นเติม Blocking buffer ปริมาณหลุมละ 100 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS-T ปริมาณหลุมละ 300 μ l

ทั้งหมด 3 ครั้ง ทำการเจือจางตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวก (มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 สูง; Titer = 10,728) และซีรัมควบคุมผลลบ (ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2; Titer=165) ซึ่งผ่านการตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจมาตรฐานที่ผลิตเป็นการค้า (BioChek SK 105, UK) ด้วย 1% BSA ใน PBS-T ด้วยอัตราส่วน 1:100 และใส่ตัวอย่างลงในหลุมปริมาณหลุมละ 100 μ l โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 3 หลุม เพื่อหาค่าเฉลี่ยจากผลที่ได้ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS-T ปริมาณหลุมละ 300 μ l ทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นเติมคอนจูเกต (Secondary antibody) โดยใช้ Rabbit anti-pig IgG (H+L) secondary antibody HRP (Thermo Fisher Scientific, USA) ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS-T โดยทำการเปรียบเทียบตัวอย่างเดียวกันใน 2 อัตราส่วน ได้แก่ 1:60,000 และ 1:80,000 ปริมาณหลุมละ 100 μ l และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS-T ปริมาณหลุมละ 300 μ l ทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นเติม 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (34028) (Thermo Fisher Scientific; USA) ปริมาณหลุมละ 100 μ l และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม Stop solution (2M H₂SO₄) ปริมาณหลุมละ 100 μ l แล้วนำไปวัดค่า OD ด้วย Microplate reader (AMR-100; Allsheng, China) ที่ความยาวคลื่น 450 nm เพื่อนำค่า OD ที่ได้ของตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกและลบที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 มาเปรียบเทียบและหาผลต่างเพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจที่ทดลองพัฒนาขึ้นในขั้นต้น

ซีรัมควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นซีรัมจากโครงการวิจัยซึ่งผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เลขที่หนังสือรับรอง CC-KMITL-/2021/021

ผลการทดลอง

การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี Native PAGE

เมื่อนำโปรตีนจากวัคซีนก่อนและหลังจากที่ถูกสกัดแยกด้วย Microsep 3K มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยวิธี Native PAGE พบว่าโปรตีนจากวัคซีนทั้ง 4 ชนิดปรากฏเป็นแถบจางๆ ไม่มีขอบเขตที่ชัดเจนที่ระดับเดียวกันทั้งหมด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานแล้ว พบว่าแถบที่ปรากฏอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 20 kDa และ 66 kDa โดยจะพบแถบโปรตีนชัดเจนที่สุดในวัคซีน A ทั้งก่อนและหลังการสกัดแยก และวัคซีน C ก่อนถูกสกัดแยก รองลงมาคือวัคซีน B ก่อนและหลังการสกัดแยก สำหรับวัคซีน C หลังการสกัดแยก และวัคซีน D ทั้งก่อนและหลังการสกัดแยกนั้นพบเพียงแถบจางๆ ไม่เด่นชัด (รูปที่ 1)

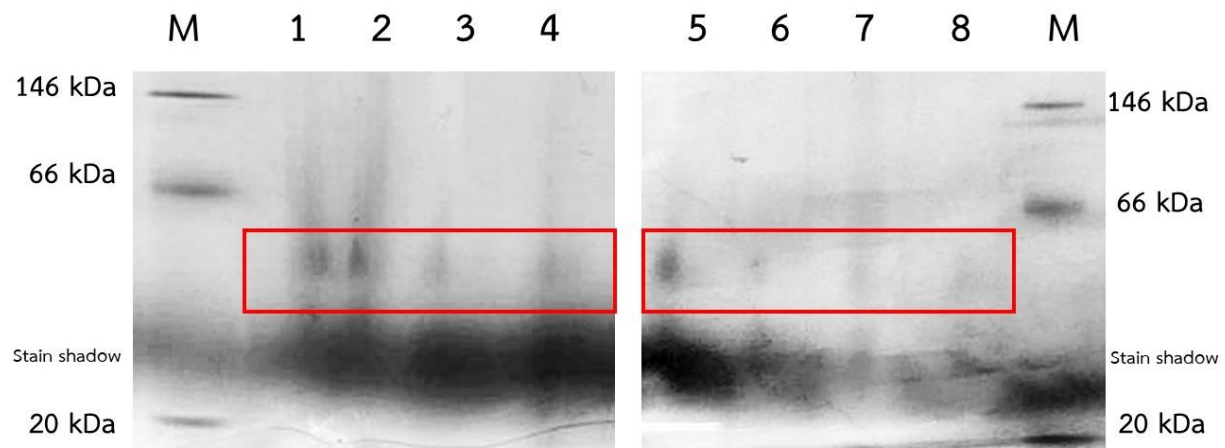
การตรวจสอบโปรตีน ORF2 ด้วยวิธี SDS-PAGE

เมื่อนำโปรตีนจากวัคซีนก่อนและหลังจากที่ถูกสกัดแยกด้วย Microsep 3K มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

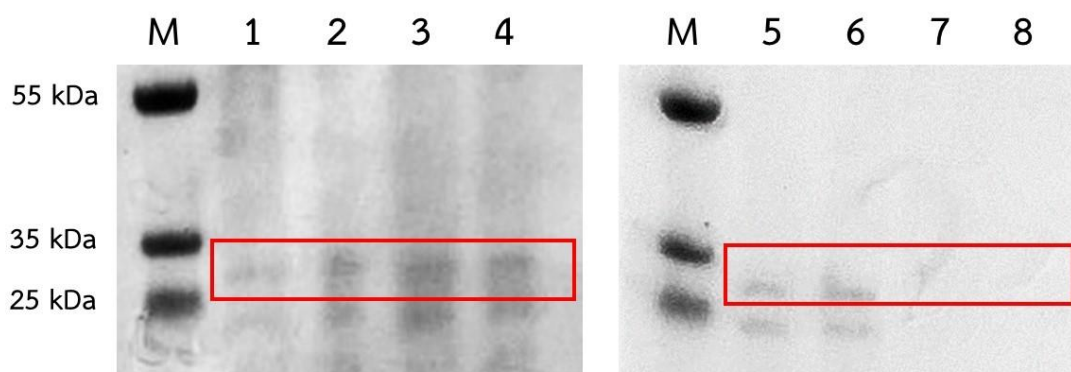
โดยวิธี SDS-PAGE ผลที่ได้พบแถบโปรตีนจากวัคซีนชนิด A, B และ C ระหว่าง 25-35 kDa ซึ่งเป็นช่วงขนาดของโปรตีน ORF2 (ขนาดประมาณ 28-30 kDa) โดยวัคซีน B มีปรากฏแถบโปรตีนชัดที่สุดทั้งก่อนและหลังการสกัดแยก รองลงมาคือวัคซีน A ก่อนและหลังการสกัดแยก และวัคซีน C ก่อนและหลังการสกัดแยกตามลำดับ ส่วนวัคซีนชนิด D นั้นไม่ปรากฏแถบมวลโมเลกุลของโปรตีนใด ๆ (รูปที่ 2)

การหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford

เมื่อทำการการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนทั้ง 4 ชนิดก่อนและหลังการสกัดแยกด้วย Microsep 3K ผลที่ได้พบว่าหลังจากการสกัดแยกปริมาณโปรตีนโดยรวมในวัคซีนวัคซีน A ลดลงมากที่สุดโดยลดลง 58.47 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือวัคซีน B, D และ C โดยมีปริมาณโปรตีนลดลง 53.99, 9.08 และ 7.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงแถบมวลโมเลกุลของโปรตีนจากวัคซีนที่แยกได้ด้วยวิธี Native PAGE ก่อนและหลังถูกสกัดแยกออกจากด้วย Microsep 3K โดยช่อง M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน ช่อง 1 คือวัคซีนชนิด A ก่อนการสกัดแยก ช่อง 2 คือวัคซีนชนิด A หลังการสกัดแยก ช่อง 3 คือวัคซีนชนิด B ก่อนการสกัดแยก ช่อง 4 คือวัคซีนชนิด B หลังการสกัดแยก ช่อง 5 คือวัคซีนชนิด C ก่อนการสกัดแยก ช่อง 6 คือวัคซีนชนิด C หลังการสกัดแยก ช่อง 7 คือวัคซีนชนิด D ก่อนการสกัดแยก และช่อง 8 คือวัคซีนชนิด D หลังการสกัดแยก โดยแถบของโปรตีน ORF2 ปรากฏอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 20 kDa และ 66 kDa (กรอบสี่เหลี่ยม)



รูปที่ 2 แสดงแถบมวลโมเลกุลของโปรตีนจากวัคซีนที่แยกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE ก่อนและหลังถูกสกัดแยกออกจากด้วย Microsep 3K โดยช่อง M คือแถบโปรตีนมาตรฐาน ช่อง 1 คือวัคซีนชนิด A ก่อนการสกัดแยก ช่อง 2 คือวัคซีนชนิด A หลังการสกัดแยก ช่อง 3 คือวัคซีนชนิด B ก่อนการสกัดแยก ช่อง 4 คือวัคซีนชนิด B หลังการสกัดแยก ช่อง 5 คือวัคซีนชนิด C ก่อนการสกัดแยก ช่อง 6 คือวัคซีนชนิด C หลังการสกัดแยก ช่อง 7 คือวัคซีนชนิด D ก่อนการสกัดแยก และช่อง 8 คือวัคซีนชนิด D หลังการสกัดแยก โดยแถบของโปรตีน ORF2ปรากฏอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 25 kDa และ 35 kDa (กรอบสีแดง)

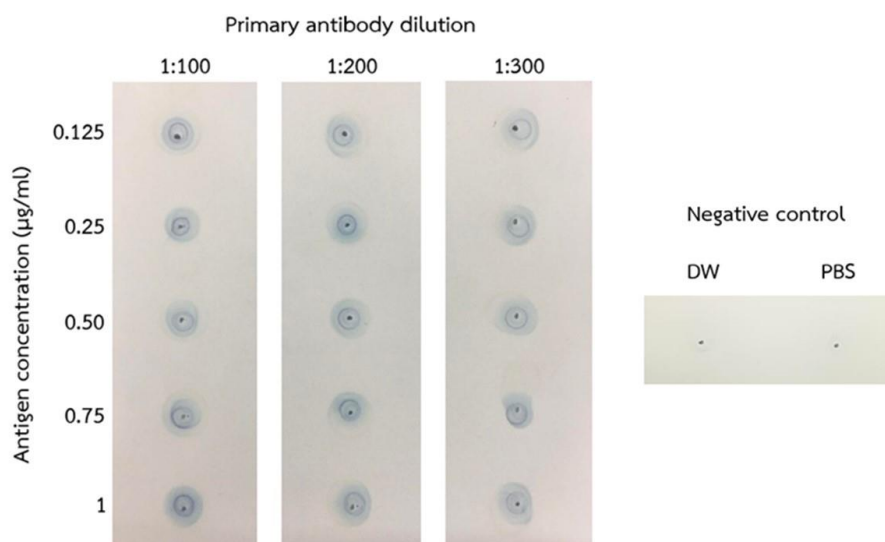
ตารางที่ 1 แสดงปริมาณโปรตีนรวมในวัคซีนทั้ง 4 ชนิดก่อนและหลังการสกัดแยกด้วย Microsep 3K

Vaccine	Protein Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		% Reduction
	Before	After	
Vaccine A	1,077.50	447.50	58.47
Vaccine B	1,389.17	639.17	53.99
Vaccine C	285.83	264.17	7.58
Vaccine D	6,880.83	6,255.83	9.08

การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot

ผลการสกัดแยกโปรตีนด้วย Microsep 3K แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ได้จากวัคซีน A และ B มีโปรตีนถูกคัดกรองออกไปเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้จากผลการแยกโปรตีนวิธี Native PAGE และ SDS-PAGE พบว่าโปรตีนจากวัคซีน B มีความเหมาะสมที่สุดในการเลือกใช้เพื่อเป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน วัคซีน B ที่ถูกสกัดแยกสั้่ออกแล้วจึงถูกนำไปเจือจางให้ได้ปริมาณของโปรตีนที่มีความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5,

0.75 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อทำ Dot blot ผลที่ได้พบว่า Primary antibody จากซีรัมควบคุมผลบวกของสุกรที่มีแอนติบอดีสูงต่อเชื้อ PCV2 สามารถทำปฏิกิริยาที่จำเพาะกับโปรตีนที่สกัดจากวัคซีน B ได้ดี โดยมีแนวโน้มในการทำปฏิกิริยาที่ดี (เกิดสีเข้ม) เมื่อใช้โปรตีนมีความเข้มข้นสูง โดยความเข้มของสีมีแนวโน้มแปรผันตามความเข้มข้นของ Primary antibody ที่ใช้ (1:100>1:200>1:300) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนดังกล่าวยังคงมีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงผลการทำ Dot blot โดยการใส่โปรตีนที่ถูกสกัดแยกออกจากด้วย Microsep 3K ที่ระดับความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 µg/ml ทำปฏิกิริยากับ Primary antibody จากซีรัมของสุกรที่มีแอนติบอดีสูงต่อเชื้อ PCV2 (Titer=10,728) ที่ถูกเจือจางที่ระดับ 1:100, 1:200 และ 1:300 ตามลำดับ และ Negative control ทดสอบด้วยน้ำบริสุทธิ์ Type 1 (DW) และสารละลาย PBS

การนำโปรตีนที่แยกได้ไปใช้เป็นแอนติเจนในการทำอินไดเรคทีไอโซล่า (Indirect ELISA)

เมื่อนำโปรตีนจากวัคซีน B ที่ถูกสกัดแยกสัออกด้วย Microsep 3K มาเคลือบบนไมโครเพลท โดยในเบื้องต้นได้ทำการเจือจางแอนติเจนที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 5 µg/ml เพื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมควบคุมผลบวก (PCV2 Titer=10,728) และซีรัมควบคุมลบ (PCV2 Titer=165) ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:100 ด้วยวิธีอินไดเรคทีไอโซล่าโดยใช้ Secondary antibody

(Conjugated antibody) ที่ระดับถูกเจือจางที่ระดับ 1:60,000 และ 1:80,000 ผลที่ได้พบว่าการใช้โปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง (2 และ 5 µg/ml) เป็นแอนติเจนสำหรับการทำอินไดเรคทีไอโซล่ามีแนวโน้มให้ผลที่ดีเมื่อมีการใช้ Secondary antibody ที่เจือจางระดับ 1:80,000 โดยมีความแตกต่างระหว่าง OD ของซีรัมควบคุมผลบวกและซีรัมควบคุมผลลบ (Fold change) มากกว่า 4 เท่า (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ในการทำอินไดเรคทีไอโซล่าโดยใช้โปรตีนที่สกัดแยกสัออกด้วย Microsep 3K เป็นแอนติเจน

Antigen Concentration (µg/ml)	OD / ซีรัมควบคุม					
	Positive	Negative	Fold change	Positive	Negative	Fold change
1	0.253	0.098	2.58	0.340	0.093	3.66
2	0.227	0.086	2.64	0.309	0.066	4.68
5	0.167	0.055	3.04	0.202	0.045	4.49
2 nd Antibody	1:60,000			1:80,000		

สรุปและวิจารณ์ผล

ORF2 เป็นส่วนโปรตีนโครงสร้างที่มีเอกลักษณ์เฉพาะสำหรับไวรัส PCV2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28-30 kDa ซึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด Specific immune response เป็นอย่างมาก และเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีชนิดกลางฤทธิ์ (Neutralizing antibodies) จึงทำให้มีวัคซีนป้องกันโรคติดต่อ PCV2 ทางการค้าใช้โปรตีนโครงสร้างส่วน ORF2 ในการผลิตเป็นวัคซีนชนิดซับยูนิต (Subunit vaccine) การใช้โปรตีน ORF2 เป็นแอนติเจนสำหรับการทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน จึงเป็นตัวเลือกที่ดีในตรวจหาภูมิคุ้มกันชนิดกลางฤทธิ์ต่อเชื้อ PCV2 เพื่อเป็นการตรวจหาภูมิคุ้มกันโรคที่แท้จริงของสุกร การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดลองสกัดแยกโปรตีน ORF2 ออกจากวัคซีนชนิดซับยูนิตเพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ในสุกร ซึ่งกระบวนการสกัดแยกโปรตีนดังกล่าวนี้ได้ออกใช้ Microsep 3K ซึ่งเป็นการกรองด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันที่มี Molecular weight cut-off (MWCO) ขนาด 3K เพื่อกรองให้อนุภาคของเกลือและสารโมเลกุลเล็กอื่น ๆ ผ่านตัวกรองลงไป แต่กักอนุภาคของโปรตีนที่ต้องการซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า 3 kDa เอาไว้ด้านบนตัวกรอง ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนในส่วน ORF2 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 28 kDa (Liu *et al.*, 2001; Mahe *et al.*, 2000) ไปจนถึง 30 kDa (Nawagitgul *et al.*, 2000) จึงได้เลือกใช้ตัวกรองที่มี MWCO ขนาด 3K ซึ่งถือว่าเป็นขนาดที่แนะนำว่าเหมาะสมกับอนุภาคของโปรตีนที่ต้องการ

ในส่วนของการนำโปรตีนที่ได้จากการสกัดแยกได้มาหามวลโมเลกุลของโปรตีนเพื่อพิสูจน์และยืนยันว่าโปรตีนที่สกัดแยกได้ยังคงมีโปรตีน ORF2 ที่ต้องการหรือไม่ ทางผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธี Native PAGE และ SDS-PAGE โดยได้ทำการเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลของโปรตีนผลที่ได้จากวิธี Native PAGE นั้น จะเห็นว่าแถบมวลโมเลกุลของโปรตีนทั้งก่อนและหลังสกัดแยกด้วย

Microsep 3K จากวัคซีนทั้ง 4 ชนิด ไม่ได้ปรากฏเป็นแถบที่มีขอบเขตชัดเจน (รูปที่ 1) แต่พบปรากฏที่บริเวณเดียวกันทั้งหมด ซึ่งอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 20 kDa และ 66 kDa จึงคาดว่าแถบล่างกล่าวนี้มีมวลโมเลกุลของโปรตีน ORF2 อยู่ในช่วงดังกล่าวนี้ โดยการที่แถบที่ปรากฏไม่มีขอบเขตที่ชัดเจนก็เนื่องจากวิธี Native PAGE เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกโปรตีนที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (Non-denatured) ทำให้โครงสร้างของโปรตีนยังคงประกอบด้วยทั้งประจุบวกและลบ เมื่อใช้สนามไฟฟ้าในการแยก ประจุลบก็จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกในขณะที่ประจุบวกก็จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ ส่งผลให้แถบที่ปรากฏไม่มีขอบเขตที่ชัดเจน (Boyer, 2012) ซึ่งวัคซีน A และ B ปรากฏแถบโปรตีนดังกล่าวชัดเจนทั้งก่อนและหลังการกรองแยกโปรตีน แสดงให้เห็นการคงอยู่ของกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดระหว่าง 20-66 kDa (ขนาดค่อนข้าง 66 kDa) ส่วนวัคซีน C นั้นปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจนก่อนการสกัดแยกเท่านั้น หลังการสกัดแยกไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวที่ชัดเจนทำให้เกิดเป็นข้อสงสัยถึงการคงอยู่โปรตีนในรูปแบบที่ไม่มีการทำให้เสียสภาพในช่วงขนาดดังกล่าว แต่สำหรับวัคซีน D นั้นไม่พบแถบโปรตีนปรากฏให้เห็นชัดเจนทั้งก่อนและหลังการสกัดแยก ทั้งนี้เนื่องจากวัคซีนมีการใช้สื่อที่เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water emulsion; O/W) ซึ่งมีความหนืดกว่าสื่อของวัคซีนชนิดอื่นๆค่อนข้างมากจึงอาจไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของอนุภาคโปรตีน และอาจส่งผลให้ NativePAGE 5% G-250 sample additive ที่ใช้ในการย้อมสีของตัวอย่างแอนติเจนไม่สามารถเข้าถึงอนุภาคของโปรตีน ส่งผลให้ไม่เห็นแถบของโปรตีนปรากฏ โดยพบว่าแม้จะนำไปผ่านการกรองแยกด้วย Microsep 3K แล้วก็ตาม ลักษณะของของเหลวที่พบก็ยังมีลักษณะขาวขุ่นจากสื่อที่ใช้ ซึ่งแตกต่างจากวัคซีน A, B และ C อย่างชัดเจนที่มีลักษณะค่อนข้างใสเมื่อผ่านการสกัดแยกด้วย Microsep 3K ทั้งนี้การที่ Native PAGE พบแถบของโปรตีนเพียงบริเวณแถบเดียวแต่เป็นช่วงกว้างนั้นเป็นเพราะจากโปรตีนที่มีน้ำหนัก

โมเลกุลต่างกันอาจเคลื่อนที่ได้เท่ากันในลักษณะเกาะกลุ่มกันไปขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุล (Bollag *et al.*, 1996) สำหรับการหามวลโมเลกุลของแอนติเจนด้วยวิธี SDS-PAGE (รูปที่ 2) นั้นพบว่าวัคซีนชนิด A, B และ C ปรากฏแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 25-35 kDa ซึ่งเป็นขนาดโปรตีนของ ORF2 แต่จะเห็นว่าไม่มีแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอื่นปรากฏขึ้นด้วย ทั้งนี้พบแถบโปรตีนอื่นนอกเหนือจากแถบโปรตีน ORF2 นั้นสอดคล้องกับผลการหาปริมาณโปรตีนรวมซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีโปรตีนอื่นนอกเหนือจาก ORF2 เป็นองค์ประกอบในวัคซีน ซึ่งอาจเป็นองค์ประกอบที่เกิดจากกระบวนการผลิตโดยใช้ Baculovirus expression system ซึ่งคาดว่าในขั้นตอนของการสกัด Recombinant protein หรืออาจจะเป็นองค์ประกอบของ Excipients ที่ใช้ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องโปรตีนมีความบริสุทธิ์ถึง 100% แต่ยังคงมีประสิทธิภาพและไม่กระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ส่วนวัคซีน D ไม่พบแถบของโปรตีนปรากฏเช่นเดียวกับในวิธี Native PAGE ซึ่งคาดว่า เป็นผลมาจากสื่อที่เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของอนุภาคโปรตีนหรือการย้อมติดสีของโปรตีนเช่นกัน

จากผลการวัดปริมาณโปรตีนโดยรวมด้วยวิธี Bradford (ตารางที่ 1) พบว่าหลังการสกัดแยกจะมีความเข้มข้นของโปรตีนที่น้อยกว่าก่อนการสกัดแยกในทุกวัคซีน ทั้งที่โดยหลักการแล้วเมื่อมีการปั่นแยกสื่อและของเหลวออกไปบางส่วนแล้วของเหลวที่เหลืออยู่ควรจะมี ความเข้มข้นของโปรตีนมากขึ้น การที่ความเข้มข้นของโปรตีนโดยรวมที่ลดลงนี้เป็นผลมาจากการที่โปรตีนที่มีขนาดเล็กจะถูกกรองผ่านระบบกรองเหลือไว้แต่โปรตีนขนาดใหญ่ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการสกัดแยก อาจมีโปรตีนบางส่วนติดอยู่ที่หลอดและตัวกรองของ Microsep 3K ซึ่งไม่สามารถเก็บโปรตีนที่ปนอยู่กับสื่อที่ติดอยู่กับตัวกรองมาได้ปริมาณครบถ้วนทั้งหมด สื่อของวัคซีนที่มีส่วนผสมของเจลหรือน้ำมันก็มีความสามารถผ่านตัวกรองลงไปได้มากน้อยต่างกันขึ้นกับปริมาณและ

ชนิดของสื่อที่ใช้ ดังจะเห็นได้จากวัคซีน A ที่มี ส่วนประกอบของสื่อเป็นชนิดคาร์โบเมอร์ มีปริมาณโปรตีนหลังการกรองลดลงไป 58.47% เนื่องจากมีส่วนประกอบของคาร์โบเมอร์สูงถึง 4 มก./มล. หลังการปั่นเหวี่ยงจะพบของเหลวมีลักษณะของเจลติดอยู่กับตัวกรองค่อนข้างมาก ทำให้โปรตีนจำนวนมากติดอยู่กับของเหลวดังกล่าวด้วย จึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างโปรตีนในส่วนนั้นมาได้ เช่นเดียวกับวัคซีน B ที่มีส่วนประกอบของสื่อเป็นชนิดอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจลในปริมาณค่อนข้างสูงอยู่ที่ 2 มก./มล. ทำให้มีปริมาณโปรตีนหลังการกรองลดลงไป 53.99% เนื่องจากมีส่วนที่เป็นเจลติดอยู่กับตัวกรองหลังการปั่นเหวี่ยงค่อนข้างมากเช่นกัน สำหรับวัคซีน C ที่มีส่วนประกอบของสื่อเป็นชนิดคาร์โบเมอร์เช่นเดียวกับวัคซีน A แต่มีความเข้มข้นเพียง 1 มก./มล. หลังการกรองมีปริมาณโปรตีนลดลงเพียง 7.58% เท่านั้น เนื่องจากแทบจะไม่มีของเหลวที่มีลักษณะเป็นเจลติดอยู่กับตัวกรองเลย จึงสามารถเก็บตัวอย่างโปรตีนมาได้เกือบทั้งหมด สำหรับวัคซีน D นั้น จะเห็นว่าปริมาณโปรตีนหลังการกรองลดลงเพียง 9.08% เท่านั้น เนื่องจากวัคซีนมีการใช้สื่อที่เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลัก เมื่อกรองส่วนประกอบอื่นและโปรตีนที่มีขนาดเล็กออกไปในขณะที่สื่อและโปรตีนที่ได้ด้านบนตัวกรองนั้นยังคงมีคุณสมบัติเป็นของเหลวไม่ใช่เจล จึงสามารถเก็บตัวอย่างบนตัวกรองมาได้เกือบจะทั้งหมด ทำให้มีการสูญเสียโปรตีนไปในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ทั้งนี้จากการที่ไม่สามารถตรวจสอบมวลโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในวัคซีนด้วยวิธี SDS-PAGE ได้ จึงทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าโปรตีนขนาดต่างๆที่มีอยู่ในวัคซีนมีความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการสกัดแยกอย่างไร

เมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบมวลโมเลกุล หลังจากการสกัดแยกโปรตีนด้วย Microsep 3K ด้วยวิธี Native PAGE และ SDS-PAGE ร่วมกับการหาปริมาณโปรตีนรวมในวัคซีนพบว่าวัคซีน D ไม่มีความเหมาะสมใน

การนำไปใช้เพื่อเป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบทางภูมิคุ้มกันเนื่องจากไม่สามารถแยกส่อกออกจากวัคซีนได้ดีพอ สำหรับวัคซีน C นั้น แม้ว่าจะสามารถแยกส่อกออกจากวัคซีนได้ดีพอสมควร แต่เมื่อวัดปริมาณโปรตีนโดยรวมหลังจากสกัดแยกแล้วพบว่าโปรตีนที่ได้มีความเข้มข้นน้อยกว่าวัคซีน A และ B และเมื่อพิจารณาผลร่วมกับความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่ถูกแยกด้วย SDS-PAGE พบว่าในปริมาณ 11.5 µl (ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE) ที่เท่ากันแถบของโปรตีนที่พบระหว่าง 25-35 kDa ของวัคซีน C มีความเข้มข้นน้อยกว่าวัคซีน A และ B มาก และเมื่อพิจารณาผลที่ได้นี้ร่วมกับลักษณะของแถบโปรตีนที่พบเมื่อถูกแยกด้วย Native PAGE ที่ไม่พบแถบโปรตีนที่ชัดเจนในรูปแบบที่ไม่เสียสภาพเมื่อวัคซีนถูกสกัดแยก จึงเป็นเหตุให้พิจารณาได้ว่าวัคซีน C อาจไม่เหมาะในการนำไปใช้งานต่อ เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพของวัคซีน A เปรียบเทียบกับวัคซีน B แล้ว พบว่าวัคซีน A ซึ่งมีความเข้มข้นของส่อกชนิดคาร์โบเมอร์ในปริมาณสูงซึ่งอาจเป็นอุปสรรคในการแยกด้วย SDS-PAGE ทำให้แถบพบของโปรตีนก่อนการสกัดแยกที่พบระหว่าง 25-35 kDa งามกว่าแถบของวัคซีน B ทั้งที่มีปริมาณโปรตีน ORF2 ต่อ มิลลิลิตรสูงกว่า และเมื่อผ่านกระบวนการสกัดแยกส่อกออกจากวัคซีนยังพบของเหลวหนืดคล้ายเจลติดอยู่บริเวณด้านบนของตัวกรองทำให้มีความยากลำบากในการเก็บโปรตีนที่ต้องการไว้ใช้งาน คณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าวัคซีน B มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบทางภูมิคุ้มกัน ดังนั้นวัคซีน B ที่ผ่านกระบวนการสกัดแยกโปรตีนออกจากส่อกแล้วจึงถูกนำไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนโดยวิธี Dot blot ผลที่ได้พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากวัคซีน B มีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนสามารถปฏิกิริยาได้ดีกับซีรัมที่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัส PCV2 โดยพบแนวโน้มการเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโปรตีนที่สกัดได้กับซีรัมได้ดีขึ้นเมื่อมีการใช้โปรตีนดังกล่าวในปริมาณสูงขึ้นเพื่อเคลือบลงบน Solid phase

เมื่อนำโปรตีนที่สกัดจากวัคซีน B มาทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของโปรตีนที่เคลือบบน Solid phase ที่เพิ่มขึ้นจากที่ทดสอบด้วยวิธี Dot blot ผลที่ได้พบว่าโปรตีนที่สกัดได้มีศักยภาพในการนำไปใช้ในการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ PCV2 โดยมีค่าความแตกต่างระหว่างซีรัมควบคุมผลบวกและลบมากกว่า 4 เท่า ที่ระดับโปรตีนที่ใช้เคลือบ Solid phase 2-5 µg/ml ร่วมกับการใช้ Secondary antibody ที่มีการเจือจางระดับสูง (1:80,000) ซึ่งเมื่อเทียบจากผลการทดสอบจากโปรตีนชนิด A และ C แล้วพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเดียวกันนั้นโปรตีนที่สกัดจากวัคซีน A มีความแตกต่างระหว่างซีรัมควบคุมผลบวกและลบน้อยกว่า 4 เท่า ในขณะที่โปรตีนที่สกัดจากวัคซีน C ต้องใช้ในความเข้มข้นสูงถึง 5 µg/ml ร่วมกับการเจือจางของ Secondary antibody ที่ระดับ 1:80,000 จึงจะให้ผลต่างดังกล่าวมากกว่า 4 เท่า (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของโปรตีนที่สกัดจากวัคซีน B ในการนำไปใช้เพื่อเป็นแอนติเจนสำหรับทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน โดยเบื้องต้นพบว่ามีศักยภาพในการนำไปใช้เพื่อเป็นแอนติเจนสำหรับเคลือบบน Solid phase สำหรับการทดสอบด้วยวิธี ELISA

การใช้โปรตีน ORF2 เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจอีไลซานั้นมีความเหมาะสมเนื่องจากโปรตีนดังกล่าวนี้มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด Specific immune response (Truong *et al.*, 2001) จากการศึกษาของ Sun *et al.* (2010) ซึ่งได้มีการพัฒนาชุดตรวจอินโดเร็คอีไลซ่าโดยใช้วิธีการผลิตแอนติเจนจากโปรตีนส่วน Antigenic domain (113-147AA) ของโปรตีน ORF2 ด้วยกระบวนการ Baculovirus expression system เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zepeda-Cervantes *et al.* (2019) ที่ใช้วิธีการ Baculovirus Bac-to-Bac™ system ในการผลิตโปรตีน ORF2 (PH(1-110)PCV2 NPs) ด้วยเซลล์ Sf9 ก่อนนำมาตรวจด้วยวิธีอินโดเร็คอีไลซ่า ซึ่งทั้งสองงานวิจัยต่างก็พบว่าแอนติเจนที่ได้จากกระบวนการ

ดังกล่าวมีความบริสุทธิ์และสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธีอิลซ่าได้ ในการศึกษาค้างนี้เมื่อโปรตีนถูกกรองแยกด้วย Microsep 3K จะได้โปรตีนโดยรวมที่มีโปรตีน ORF2 เป็นองค์ประกอบที่ยังคงมีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่สะดวก และประหยัด หลังการแยกแต่ละครั้งได้ปริมาณแอนติเจนค่อนข้างมากกว่าการสกัดโปรตีนออกจากเจลโพลีอะคริลามัด สำหรับวิธี Native PAGE นั้นแม้จะเป็นวิธีที่ใช้ในการแยกโปรตีนที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ ไม่เกิดการเสียสภาพของโปรตีน แต่เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้จำแนกชนิดของโปรตีนมากกว่าการแยกน้ำหนักรวมของโปรตีน เนื่องจากจะไม่สามารถแยกความแตกต่างทางรูปร่างและขนาดได้ ดังนั้นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันจึงอาจเคลื่อนที่ได้เท่ากัน (Bollag *et al.*, 1996) อีกทั้งแถบโปรตีนที่ได้ก็ไม่มีคมชัดเจน จึงไม่สามารถนำโปรตีนที่ผ่านการทำวิธี Native PAGE มาใช้ต่อได้ ส่วนแอนติเจนที่ผ่านการทำวิธี SDS-PAGE นั้น แม้ว่าวิธีนี้จะใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนได้ และยังใช้ในการหาน้ำหนักของโปรตีนหรือหน่วยย่อย (Subunit) ของโปรตีน แต่ด้วยวิธีนี้มีการทำให้โปรตีนเสียสภาพ (Seelapai, 2016) จึงอาจส่งผลต่อรูปแบบของแอนติเจนหากจะนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาในวิธีอิลซ่าต่อไปได้

การเลือกใช้แอนติเจนที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 5 µg/ml เพื่อเคลือบบน Solid phase สำหรับการทำ ELISA นั้นมีแนวคิดมาจากการศึกษาของ Sun *et al.* (2010) ที่ใช้ปริมาณแอนติเจน 0.5 µg/ml และ Buapijit (2015) ที่ใช้ปริมาณแอนติเจน 1.87 µg/ml เพื่อนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมควบคุมผลบวกและลบที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ PCV2 ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:100 ซึ่งพบว่าเมื่อดูจากผลของค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบมีความแตกต่างกันอยู่ในช่วง 0.078-0.26 ดังนั้นการเลือกใช้แอนติเจนที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 5 µg/ml ในการทดลองนี้ก็เพื่อหวังผลให้มีช่วงความแตกต่างของซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบมากขึ้น

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือกวัคซีนที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแยกโปรตีน ORF2 และให้ผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA เป็นที่น่าพอใจแม้ว่าโปรตีนที่สกัดได้จะไม่ได้มีความบริสุทธิ์ 100% ก็ตาม แต่วิธีการสกัดแยกดังกล่าวเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการได้มาซึ่งแอนติเจน โดยแนวทางการศึกษาในอนาคตนั้นจะได้มีการนำโปรตีนที่สกัดได้จากวิธีนี้ไปพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจอินไโดเรคทีอิลซ่าหรือกระบวนการทดสอบอื่นๆทางภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมและได้มาตรฐานต่อไป โดยจะทำการศึกษาเพิ่มเติมด้านปริมาณแอนติเจนที่ใช้และอัตราส่วนในการเจือจางทั้ง Primary antibody (ซีรัมที่ต้องการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกัน) และ Secondary antibody (Conjugated antibody) รวมถึงปัจจัยต่างๆ ให้มีความสอดคล้องกัน เพื่อให้ชุดตรวจดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการประเมินสถานการณ์ของโรคติดต่อ PCV2 ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันและการควบคุมโรคในระดับฝูงได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในการสนับสนุนทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้งานห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพระดับเซลล์และอุปกรณ์ต่างๆ ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bollag, D. M. E., S. J. Rozycki, M. D. Bollag, M. D. Rozycki, and S. J. Edelstein. 1996. Protein methods. (No. 547.96 BOL).
- Boyer, R. F. 2012. Biochemistry laboratory: modern theory and techniques. 2nded. Prentice Hall. New Jersey. 166-175.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buapijit, K. 2015. Development of indirect PCV2b-based ELISA for detection PCV2 antibodies. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.
- Chae, C. 2012. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Vet. J.* 194: 151–157.
- Ellis, J., M. Spinato, C. Yong, K. West, F. McNeilly, B. Meehan, S. Kennedy, E. Clark, S. Krakowka, and G. Allan. 2003. Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15(4): 364-368.
- Liu, Q., S. K. Tikoo, and L. A. Babiuk. 2001. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *J. Virol.* 285: 91-99.
- Mahe, D., P. Blanchard, C. Truong, C. Arnault, P. Le Cann, R. Cariolet, F. Madec, E. Albina, and A. Jestin. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 81: 1815-1824.
- Nawagitgul, P., I. Morozov, S. R. Bolin, P. A. Harms, S. D. Sorden, and P. S. Paul. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81: 2281-2287.
- Pogranichnyy, R. M., K. J. Yoon, P. A. Harms, S. L. Swenson, J. J. Zimmerman, and S. D. Sorden. 2000. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral. Immunol.* 13(2): 143-153.
- Seelapai, J. 2016. Screening, partial purification and characterization of cellulolytic enzyme from Actinomycetes. Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University. (In Thai).
- Sun, S. Q., H. C. Guo, D. H. Sun, S. H. Yin, Y. J. Shang, X. P. Cai, and X. T. Liu. 2010. Development and validation of an ELISA using a protein encoded by ORF2 antigenic domain of porcine circovirus type 2. *Virol. J.* 7: 274.
- Truong, C., D. Mahe, P. Blanchard, M. Le Dimna, F. Madec, A. Jestin, and E. Albina. 2001. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch. Virol.* 146(6): 1197-1211.
- Zepeda-Cervantes, J., A. Cruz-Reséndiz, A. Sampieri, R. Carreón-Nápoles, J. I. Sánchez-Betancourt, and L. Vaca. 2019. Incorporation of ORF2 from porcine circovirus type 2 (PCV2) into genetically encoded nanoparticles as a novel vaccine using a self-aggregating peptide. *Vaccine.* 37: 1928–1937.