Thesis Title	Cloning and Expression of Haemagglutinin Gene of Avian Influenza A (H5N1) Virus in *Pichia pastoris*
Author	Miss Prapassorn Channoi
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Advisor	Dr. Ronachai Pratanaphon

ABSTRACT

Avian influenza is a highly contagious viral disease of major concern to both the poultry industry and human health; the currently ongoing outbreaks of H5N1 since 1997 have been unprecedented with over 500 million birds destroyed and over 303 humans dead. Hence, rapid and accurate detection of avian influenza virus is a necessary tool for control of outbreaks and surveillance. Haemagglutinin (HA) protein is one of the markers for detection of influenza viral infection, also for monitoring of the antibody response to the virus. This protein is cleaved into two smaller polypeptide chain called HA1 and HA2 when the virus bind to the cellular receptors consisting of sialic acid on the surface of the host cells. Therefore, the recombinant protein of two smaller polypeptide chain of cleaved HA could serve as antigens used in epidemic study.

In this study, HA2 gene was amplified using the cDNA from avian influenza virus CMU H5 (A/Chicken /Chiang Mai/1/2004) as a template. HA1 gene was optimized and synthesized based on sequence of influenza virus CMU H5. The genes were cloned and expressed as 6xHis and Myc epitope tagged protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Only HA2 gene was successfully internal expressed in *P. pastoris* but not secretion. On the other hand, H5N1 HA1 protein could not be detected either internal expression or secretion. The internal H5N1 HA2 protein was successfully purified using nickel affinity chromatography (HisPur Ni-NTA™ Spin Column) under native condition. The purified protein was assessed by SDS-PAGE and western blot. A single band of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

35-40 kDa was observed in SDS gel, which almost double the size and higher molecular weight (MW) than a theoretical molecular mass of 24.724 kDa (by calculation). Western blot study revealed that the protein was detected with His Detector™ and anti Myc antibody, indicating that this was protein of interest. The higher MW may due to the potential of performing post-translational modifications including N-glycosylation of *P. pastoris*. The H5N1 HA2 recombinant protein could react with serum sample from patient recovered from avian influenza infection (PO3, positive serum) who had their HI titer more than 1:40, while it was not react with the non-exposed individual serum (CS, negative serum). This indicates that *P. pastoris* strain could be an efficient expression system for H5N1 HA2 gene of avian influenza A virus CMU strain.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนยีนและการแสดงออกของยีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ A (H5N1) ในยีสต์ *Pichia pastoris*
ผู้เขียน	นางสาวประภัสสร จันทร์น้อย
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. รณชัย ปรารถนาผล

บทคัดย่อ

โรคไข้หวัดนก เป็นโรคติดต่อที่ก่อให้เกิดความกังวลเป็นอย่างมากทั้งในด้านอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์ปีกและด้านสุขภาพอนามัยของมนุษย์ ซึ่งการระบาดของโรคยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 1997 เป็นต้นมา ส่งผลให้มีสัตว์ปีกมากกว่า 500 ล้านตัวถูกทำลาย และมีจำนวนผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมากกว่า 303 ราย ดังนั้นการตรวจสอบโรคไข้หวัดนกที่มีความรวดเร็วและถูกต้องจึงเปรียบเสมือนเครื่องมือที่มีความจำเป็นอย่างมากในการควบคุมการระบาดและการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนก โดยฮีแมกกลูตินินโปรตีน (เอชเอ) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจหาร่องรอยของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และสามารถใช้ในการตรวจวัดการสร้างภูมิต้านทานต่อไวรัสได้อีกด้วย ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจะถูกตัดออกจากกันได้เป็นสองส่วน คือ เอชเอ1 และ เอชเอ2 ในขณะที่เชื้อไวรัสเข้าจับกับกรดไซอะลิกในตัวรับที่อยู่บนพื้นผิวของเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นการผลิตโปรตีนทั้งสองส่วนซึ่งเป็นส่วนที่แยกมาจากเอชเอนี้ สามารถนำมาใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจสอบการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกได้

ในการวิจัยนี้ cDNA ของเชื้อไวรัสไขหวัดนก สายพันธุ์ที่ได้จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (A/Chicken /Chiang Mai/1/2004) จะถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ยีนเอชเอ2 ในขณะที่ยีนเอชเอ1 ถูกปรับปรุงรหัสพันธุกรรมและสังเคราะห์ขึ้นมาโดยใช้เชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ที่ได้จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เป็นแม่แบบ ยีนที่ได้จะถูกนำไปโคลนและแสดงออกในยีสต์ *P. pastoris* โดยโปรตีนที่ได้จะติดฉลากด้วย 6xHis และ Myc epitope มีเพียงยีน H5N1 HA2 เท่านั้นที่สามารถแสดงออกภายในเซลล์ได้ แต่ก็ไม่สามารถแสดงออกโดยการหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์ นำโปรตีน H5N1 HA2 ที่ยีสต์สามารถผลิตขึ้นมาภายในเซลล์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย nickel affinity chromatography (HisPur Ni-NTA™ Spin Column) ภายใต้สภาวะปกติ ซึ่งโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วจะถูกนำไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรวจสอบผลด้วยการทำ SDS-PAGE และ western blot พบว่าขนาดของโปรตีนเอชเอ2 ที่ได้มีขนาดประมาณ 35-40 kDa ขนาดใหญ่เกือบจะสองเท่าของโปรตีนเอชเอ2 ที่ควรจะเป็นตามทฤษฎี คือ 24.724 กิโลดาลตัน (จากการคำนวณ) จากการวิเคราะห์ด้วย western blot พบว่าโปรตีน เอชเอ2 ดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้ด้วย His Detector™ และ anti Myc antibody แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเอชเอ2 ดังกล่าวนี้น่าจะเป็นโปรตีนที่เราสนใจ แต่มวลโมเลกุลของโปรตีนดังกล่าวมีขนาดใหญ่กว่าที่ควรเป็น อาจจะเป็นผลจากกระบวนการ N-glycosylation ใน *P. pastoris* แต่ก็พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนเอชเอ2 สามารถทำปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรั่มที่ได้จากผู้ป่วยไข้หวัดนกที่หายแล้ว (PO3, positive serum) ที่มีค่า HI titer มากกว่า 1:40 ได้ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับซีรั่มของผู้ที่ไม่เคยสัมผัสกับเชื้อไข้หวัดนก (CS, negative serum) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ *P. pastoris* สามารถใช้ในการแสดงออกยีนเอชเอ2 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ที่ได้จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved