



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินประสิทธิภาพของพลาสมิดที่สร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมาในการเหนี่ยวนำ
การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ต่อเชื้อไวรัส
porcine reproductive and respiratory syndrome

โดย นาย วศิน เจริญทัศน์ธนกุล

มกราคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินประสิทธิภาพของพลาสมิดที่สร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมาในการเหนี่ยวนำ
การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ต่อเชื้อไวรัส
porcine reproductive and respiratory syndrome

ผู้วิจัย
นายวศิน เจริญทัศน์ธนกุล

สังกัด
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DIG5180032

ชื่อโครงการ : การประเมินประสิทธิภาพของพลาสมิดที่สร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมาในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ต่อเชื้อไวรัส porcine reproductive and respiratory syndrome

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : วศิน เจริญทัศน์ธนกุล

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Email Address : wasin@mju.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

ไวรัสพอร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) ยับยั้งการสร้างอินเตอร์เฟอรอนแกมมา (interferon gamma; IFN γ) ของสุกร ทำให้สุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสลดลง งานวิจัยนี้ศึกษาการใช้พลาสมิดที่แสดงออกยีน IFN γ ของสุกร (pIFN γ) เพื่อกระตุ้นการสร้าง IFN γ ในโมโนไซต์ (monocyte) ซึ่งบ่มร่วมกับไวรัสพอร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide พร้อมกันนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ pIFN γ ต่อการสร้างไซโตไคน์ (cytokine) อื่นๆ ได้แก่ tumor-necrosis factor alpha (TNF α), interleukin-1 (IL-1), IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ transforming growth factor beta (TGF β) ในระดับ mRNA และ protein ผลการศึกษาพบว่า pIFN γ สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN γ และ TNF α mRNA และ protein และยับยั้งการสร้าง IL-10 mRNA และ protein ได้อย่างมีนัยสำคัญ pIFN γ ไม่มีผลต่อการสร้าง IL-1, IL-12p35, IL-12p40 และ TGF β ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า pIFN γ สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated adaptive immunity) สำหรับวัคซีนป้องกันโรคพอร์อาร์เอสในอนาคต

คำสำคัญ: พลาสมิด, อินเตอร์เฟอรอนแกมมา, porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Abstract

Project Code : DIG5180032

Project Title : Evaluation of plasmids expressing interferon gamma in induction of cell-mediated immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Investigator : Wasin Charentantanakul

Program of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University

Email Address : wasin@mju.ac.th

Project Period : 2 years

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon gamma (IFN γ) production in infected pigs, which leads to reduced innate and adaptive immune responses to the virus. This study evaluates the potential of plasmids expressing porcine IFN γ (pIFN γ) in enhancing IFN γ expression and in modulating other innate and adaptive cytokine responses to PRRSV. Naïve monocytes from eight PRRSV-seronegative pigs were transfected with pIFN γ *in vitro* prior to PRRSV inoculation and lipopolysaccharide stimulation. The effects of pIFN γ on mRNA expression of IFN γ , tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin-1 (IL-1), IL-12p35, IL-12p40, IL-10, and transforming growth factor beta (TGF β) were tested by real-time PCR. The effects of pIFN γ on protein production of IFN γ , TNF α , and IL-10 were tested by ELISA. Compared to the PRRSV-inoculated controls, the levels of IFN γ and TNF α mRNA and protein were significantly increased in pIFN γ -transfected monocytes, while the level of IL-10 mRNA and protein was significantly reduced. The levels of IL-1, IL-12p35, IL-12p40, and TGF β were unchanged. Our results suggest that pIFN γ has the potential to enhance the innate and adaptive immune response to PRRSV infection.

Keywords: interferon gamma, plasmid, porcine reproductive and respiratory syndrome virus

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์พลาสมิดที่สร้าง IFN γ ของสุกร (pIFN γ)
2. เพื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ pIFN γ ต่อการเข้าสู่เซลล์ (transfection) โมโนซัยต์
3. เพื่อศึกษาความสามารถของ pIFN γ ในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IFN γ ในโมโนซัยต์ที่บ่มกับไวรัสพาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)
4. เพื่อศึกษาผลของ pIFN γ ต่อการสร้างไซโตไคน์ TNF α , IL-1, IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ TGF β ในโมโนซัยต์ที่บ่มกับไวรัสพาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วยสาร LPS

วิธีทดลอง

การสังเคราะห์ pIFN γ

กระตุ้น peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ของสุกรด้วย phorbol 12-myristate 13-acetate (Calbiochem) และ ionomycin (Calbiochem) เพื่อกระตุ้นการสร้าง IFN γ mRNA (Charerntantanakul et al., 2006) ใช้ IFN γ mRNA เป็นต้นแบบ (template) สำหรับการสังเคราะห์ IFN γ double-stranded DNA (dsDNA) โดยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ทำการโคลน (clone) IFN γ dsDNA ที่ได้จาก RT-PCR ในพลาสมิด pcDNATM 3.1 Directional TOPO[®] (Invitrogen) ตรวจสอบความถูกต้องของ pIFN γ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Pst I (Fermentas) และทำ DNA sequencing (รูปที่ 1)

การเตรียมโมโนซัยต์

เจาะเก็บ PBMC จากสุกรจำนวน 8 ตัวที่ไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัสพาร์อาร์เอสเมื่อตรวจโดยวิธี ELISA (IDEXX) ทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงโมโนซัยต์ด้วยวิธี plate adherence assay และตรวจยืนยันชนิดของเซลล์ด้วยวิธี direct immunofluorescent assay โดยใช้ primary monoclonal antibody (mAb) clone SWC3 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.สพ.ญ.ดร.สันนิษา สุรทัตต์, คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และ secondary mAb ที่ conjugate ด้วย FITC (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.วัชร กสินฤกษ์, คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ pIFN γ ต่อการเข้าสู่เซลล์โมโนซัยต์

ทำการบ่มโมโนไซต์กับ pIFN γ ที่ปริมาณต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 μ g หรือกับ pcDNA vector ที่ 0.4 μ g นาน 4 ชั่วโมงโดยใช้ IBAfect (IBA GmbH) และ MATra-A (IBA GmbH) เป็น transfection reagents จากนั้นเปิด media ออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI⁺⁺ (ประกอบด้วย RPMI-1640, L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin-amphotericin B) (Gibco) ทำการบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂) ตรวจการมีชีวิตของเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue (Gibco) และทดสอบการสร้าง IFN γ mRNA และ protein ในโมโนไซต์ด้วยวิธี real-time PCR (Royae et al., 2004) และ ELISA (R&D systems) ตามลำดับ

การศึกษาความสามารถของ pIFN γ ในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IFN γ ในโมโนไซต์ที่บ่มกับไวรัสพาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วย LPS

บ่มโมโนไซต์กับ pIFN γ หรือ pcDNA vector ที่ปริมาณ 0.4 μ g นาน 4 ชั่วโมงโดยใช้ IBAfect และ MATra-A เป็น transfection reagents จากนั้นเปิด media ออก แล้วเติมไวรัสพาร์อาร์เอส (10⁶ TCID₅₀/ml) ทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂) จากนั้นเติมสารละลาย LPS (10 μ g/ml) แล้วบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ตรวจการมีชีวิตของเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue และทดสอบการสร้าง IFN γ mRNA และ protein ในโมโนไซต์ด้วยวิธี real-time PCR และ ELISA ตามลำดับ

การศึกษาผลของ pIFN γ ต่อการสร้างไซโตไคน์ TNF α , IL-1, IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ TGF β ในโมโนไซต์ที่บ่มกับไวรัสพาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วย LPS

บ่มโมโนไซต์กับ pIFN γ หรือ pcDNA vector ที่ 0.4 μ g นาน 4 ชั่วโมงโดยใช้ IBAfect และ MATra-A เป็น transfection reagents จากนั้นเปิด media ออก แล้วเติมไวรัสพาร์อาร์เอส (10⁶ TCID₅₀/ml) ทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂) จากนั้นเติมสารละลาย LPS (10 μ g/ml) แล้วบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ทดสอบการสร้าง TNF α , IL-1, IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ TGF β mRNA ด้วยวิธี real-time PCR (Royae et al., 2004) และทดสอบการสร้าง TNF α และ IL-10 protein ด้วยวิธี ELISA (R&D systems) ตามลำดับ

ผลการทดลอง

การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ pIFN γ ต่อการเข้าสู่เซลล์โมโนไซต์

pIFN γ ที่ปริมาณ 0.3 และ 0.4 μ g สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN γ mRNA และ protein ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2 และ 3) pIFN γ ที่ปริมาณ 0.1 และ 0.2 μ g สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN γ mRNA และ protein ได้ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โมโนแซคต์ที่ได้รับ pcDNA vector มีการสร้าง IFN γ mRNA และ protein เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2 และ 3) แต่ระดับที่สร้างขึ้นนั้นต่ำกว่าระดับที่สร้างจาก pIFN γ (ที่ 0.3 และ 0.4 μ g)

ความสามารถของ pIFN γ ในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IFN γ ในโมโนแซคต์ที่บ่มกับไวรัสพรีอาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วย LPS

โมโนแซคต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพรีอาร์อาร์เอสและ LPS มีการสร้าง IFN γ mRNA และ protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนแซคต์ที่บ่มร่วมกับ LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4 และ 5) โมโนแซคต์ที่ได้รับการ transfect ด้วย pIFN γ (0.4 μ g) ก่อนบ่มร่วมกับไวรัสพรีอาร์อาร์เอสและ LPS มีระดับการสร้าง IFN γ mRNA และ protein ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนแซคต์ที่ไม่ได้รับ pIFN γ (รูปที่ 4 และ 5) pcDNA vector มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ IFN γ protein แต่ผลนั้นน้อยกว่า pIFN γ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลของ pIFN γ ต่อการสร้างไซโตไคน์ TNF α , IL-1, IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ TGF β ในโมโนแซคต์ที่บ่มกับไวรัสพรีอาร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วย LPS

โมโนแซคต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพรีอาร์อาร์เอสและ LPS มีการสร้าง TNF α mRNA และ protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีการสร้าง IL-10 mRNA และ protein เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนแซคต์ที่บ่มร่วมกับ LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4 และ 5) โมโนแซคต์ดังกล่าวไม่มีการสร้าง IL-1, IL-12p35, IL-12p40 และ TGF β mRNA แตกต่างจากโมโนแซคต์ของกลุ่มควบคุม

โมโนแซคต์ที่ได้รับการ transfect ด้วย pIFN γ (0.4 μ g) ก่อนบ่มร่วมกับไวรัสพรีอาร์อาร์เอส และ LPS มีระดับการสร้าง TNF α mRNA และ protein เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีการสร้าง IL-10 mRNA และ protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนแซคต์ที่ไม่ได้รับ pIFN γ โมโนแซคต์ดังกล่าวไม่มีการสร้าง IL-1, IL-12p35, IL-12p40 และ TGF β mRNA แตกต่างจากโมโนแซคต์ที่ไม่ได้รับ pIFN γ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ไวรัสพีอาร์อาร์เอสยับยั้งการสร้าง IFN γ และ TNF α mRNA และ protein แต่กระตุ้นการสร้าง IL-10 mRNA และ protein ในโมโนไซต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนไซต์ของกลุ่มควบคุม ไวรัสไม่มีผลต่อการสร้าง IL-1, IL-12p35, IL-12p40 และ TGF β mRNA

pIFN γ สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN γ และ TNF α และยับยั้งการสร้าง IL-10 mRNA และ protein ในโมโนไซต์ของสุกรซึ่งบ่มร่วมกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสและ LPS อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลต่อการสร้าง IL-1, IL-12p35, IL-12p40 และ TGF β mRNA

การที่ pIFN γ สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN γ และ TNF α และยับยั้งการสร้าง IL-10 บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของ pIFN γ ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated adaptive immunity) ต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยในอนาคตควรศึกษาประสิทธิภาพของ pIFN γ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันใน *in vivo* เมื่อใช้ร่วมกับวัคซีนป้องกันโรคพีอาร์อาร์เอส

เอกสารอ้างอิง

- Charerntantanakul W, Platt R, Roth JA. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. *Viral Immunol.* 2006; 19(4), 646-661.
- Royae AR, Husmann RJ, Dawson HD, Calzada-Nova G, Schnitzlein WM, Zuckermann FA, Lunney JK. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 102:199-216.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 Charerntantanakul W. Evaluation of plasmids expressing interferon gamma in induction of cell-mediated immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

Manuscript in preparation.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 เชิงวิชาการ

งานวิจัยนี้ใช้เป็นส่วนหนึ่งในการเรียนการสอนในระดับบัณฑิตศึกษาของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ (วิชา ทช 534 ไวรัสวิทยาในสัตว์ และวิชา ทช 535 ภูมิคุ้มกันวิทยาในสัตว์) ในด้านเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ไวรัสวิทยา และภูมิคุ้มกันวิทยาในสัตว์

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

3.1 Charerntantanakul W. Evaluation of plasmids expressing interferon gamma in induction of cell-mediated immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **งานประชุมวิชาการสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.** (กำหนดจัดในเดือน พฤษภาคม 2554)

ภาคผนวก

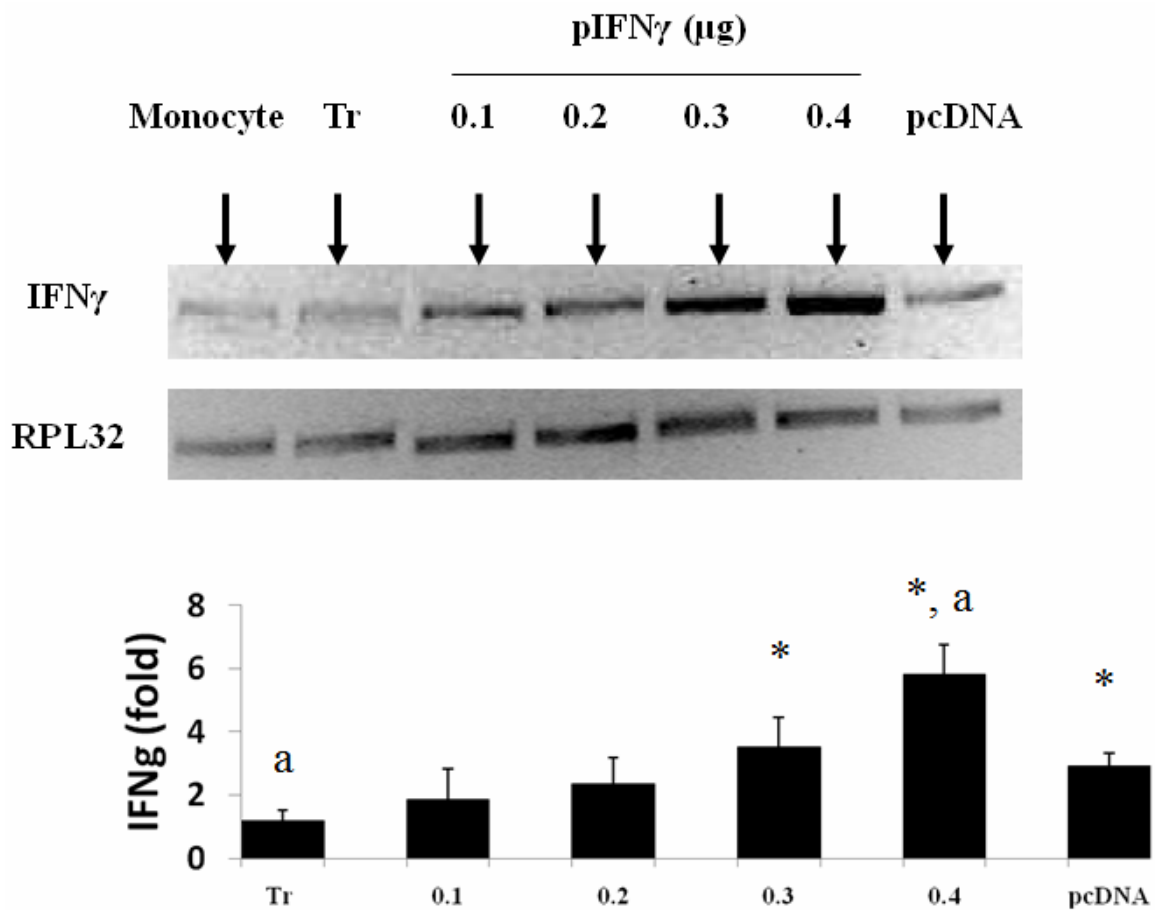
>1st_Base_295131_wasin_T7_Promoter

NTGCTGTAGCTTGGTACGAGCTCGGATCCAGTACCCCTTCACCATGGGTTATACAAC TTATTT
CTTAGCTTTTCAGCTTTGCGTGACTTTGTGTTTTCTGGCTCTTACTGCCAGGCGCCCTTTT
TAAAGAAATAACGATCCTAAAGGACTATTTTAATGCAAGTACCTCAGATGTACCTAATGGTGG
ACCTCTTTTCTTAGAAATTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAAAAAATAATTCAGAG
CCAAATTGTCTCCTTCTACTTCAAATCTTTGAAATCTTCAAAGATAACCAGGCCATTCAAAG
GAGCATGGATGTGATCAAGCAAGACATGTTTCAGAGGTTCTTAAATGGTAGCTCTGGGAAAC
TGAATGACTTCGAAAAGCTGATTAATTTCCGGTAGATAATCTGCAGATCCAGCGCAAAGCC
ATCAGTGAACATCAAAGTGATGAATGATCTGTCACCAAGGTCTAACCTAAGAAAGCGGAA
GAGAAGTCAGACTATGTTCCAAGGCCAGAGAGCATCAAATAAAAGGGTCAAGACAATTCTG
CAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTCAAGGTAAGC
CTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCAT
TGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG
CCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAA
ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGGTGG
GGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGT
GGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGC
GCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGGGGTGGGGGGTTACCCCGCAGCGTGACCG
CTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCCCTT

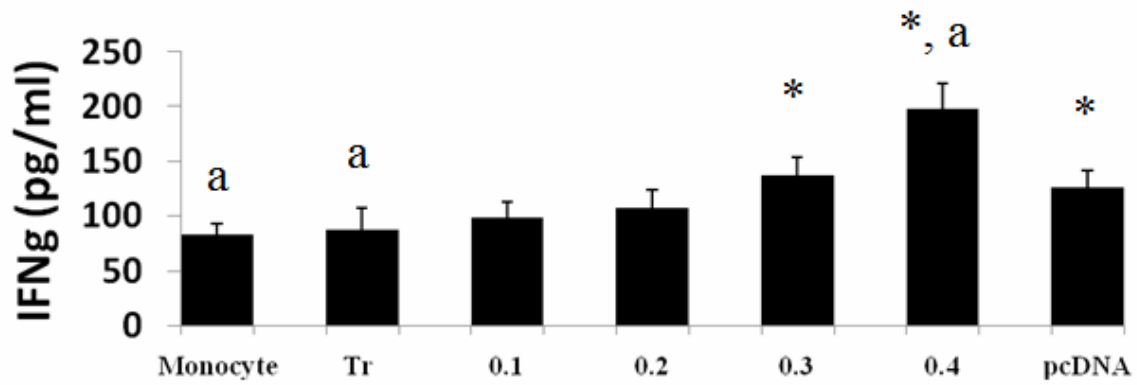
>1st_Base_295132_wasin_BGH-rev

NGTGGTACTCAATGGTGTGGTGTGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGG
GTTAGGGATAGGCTTACCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTG
CTGGATATCTGCAGAATTGTCTTGACCCTTTTATTTTGATGCTCTCTGGCCTTGGAACATAGT
CTGACTTCTCTTCGCTTTCTTAGGTTAGACCTTGGTGACAGATCATTCACTACTTTGATGAG
TTCCTGATGGCTTTGCGCTGGATCTGCAGATTATCTACCGGAATTTAATCAGCTTTTCGAA
GTCATTCAGTTTCCCAGAGCTACCATTTAGGAACCTCTGAAACATGTCTTGCTTGATCACATC
CATGCTCCTTTGAATGGCCTGGTTATCTTTGAAGATTTCAAAGAATTTGAAGTAGAAGGAGAC
AATTTGGCTCTGAATTATTTTTTGTCACTCTCCTCTTTCCAATTCCTTCAAATTTCTAAGAAAA
GAGGTCCACCATTAGGTACATCTGAGGTACTTGCAATTAATAAGTCCTTTAGGATCGTTATTT
CTTTAAAAAAGGGCGCCTGGCAGTAAGAGCCAGAAAAACACAAAGTCACGCAAAGCTGAAA
AGCTAAGAAATAAGTTGTATAACCCATGGTGAAGGGTACTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGC
TTAACTAGCCAGCTTGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTCGATAAGCCAGTAAGCA
GTGGGTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTACC
GCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGAAAGTCCCGTTGATTTTGGT
GCCAAAACAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGAAATCCCCGTGAGTCAAA
CCGCTATCCACGCCCATTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGATGACTA
ATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCATAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAG
GCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAAAAGGGGGCCGT

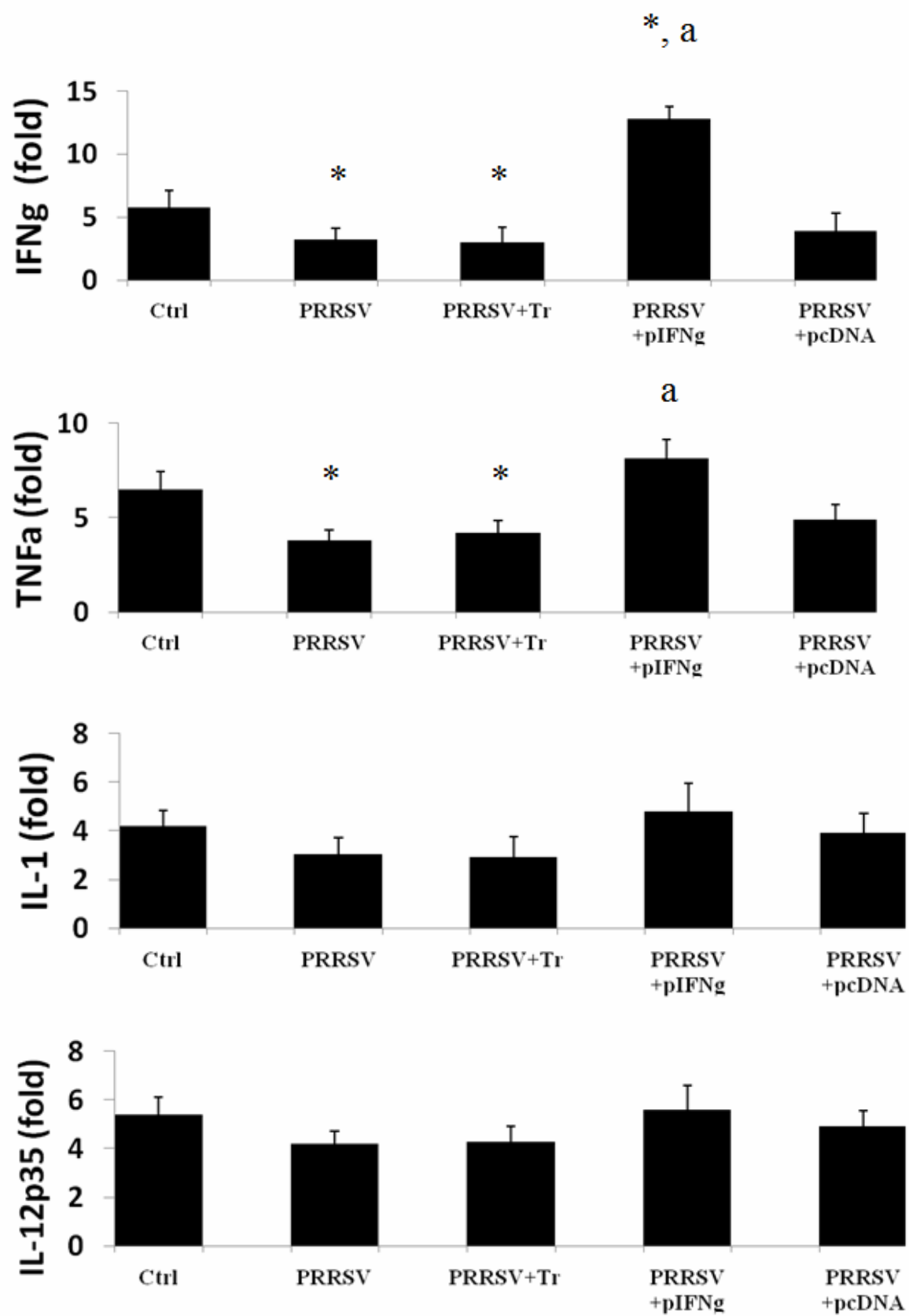
รูปที่ 1 (ต่อ) ผลการทำ DNA sequencing ของ pIFN γ โดยใช้ BGH reverse primer



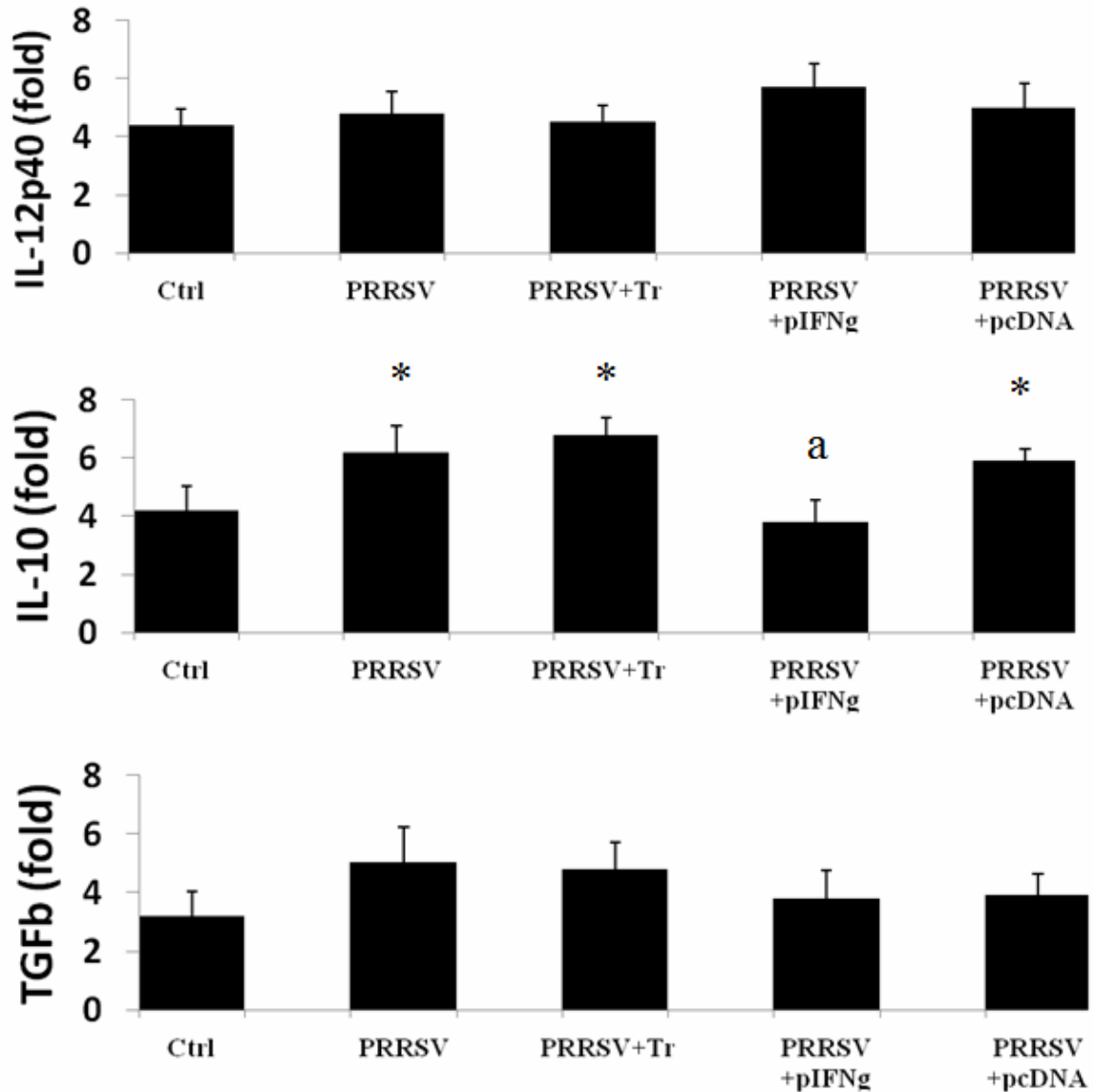
รูปที่ 2 (บน) การแสดงออกของยีน IFN γ และ ribosomal protein large 32 (RPL32) ในโมโนไซต์ของสุกร (Monocyte) โมโนไซต์ที่ได้รับ transfection reagent เพียงอย่างเดียว (Tr) หรือได้รับ pIFN γ ที่ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 μ g และโมโนไซต์ที่ได้รับ pcDNA vector ที่ปริมาณ 0.4 μ g (ล่าง) ระดับการแสดงออกของยีน IFN γ ที่ถูก normalized ด้วย RPL32 ในกลุ่มทดลองต่างๆ อักษร a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ pcDNA (ทดสอบด้วยวิธี one-way ANOVA และ Dunnett's t test) สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Tr control (ทดสอบด้วยวิธี one-way ANOVA และ Dunnett's t test)



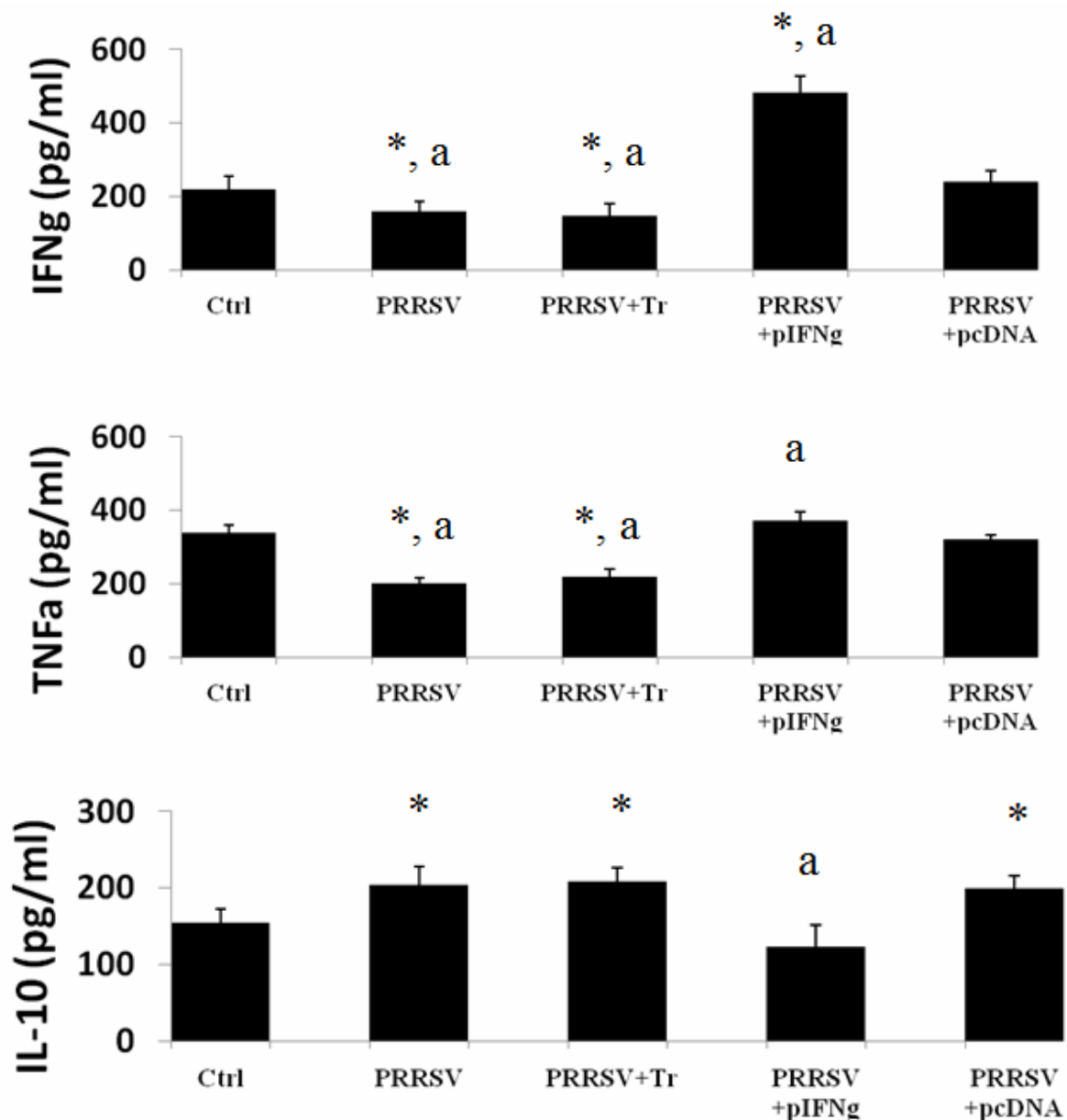
รูปที่ 3 ปริมาณ IFN γ ใน cell culture supernatant ของโมโนไซต์ (Monocyte) โมโนไซต์ที่ได้รับ transfection reagent เพียงอย่างเดียว (Tr) หรือได้รับ pIFN γ ที่ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 μ g และโมโนไซต์ที่ได้รับ pcDNA vector ที่ปริมาณ 0.4 μ g อักษร a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ pcDNA (ทดสอบด้วยวิธี one-way ANOVA และ Dunnett's t test) สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Monocyte (ทดสอบด้วยวิธี one-way ANOVA และ Dunnett's t test)



รูปที่ 4



รูปที่ 4 (ต่อ) ระดับการแสดงออกของยีน $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-1, IL-12p35, IL-12p40, IL-10 และ $TGF\beta$ ที่ถูก normalized ด้วย RPL32 ในโมโนซัยต์ที่กระตุ้นด้วย LPS (Ctrl) โมโนซัยต์ที่ได้รับไวรัสพาร์อาร์เอสและ LPS (PRRSV) โมโนซัยต์ที่ได้รับไวรัสพาร์อาร์เอส, transfection reagent และ LPS (PRRSV+Tr) โมโนซัยต์ที่ได้รับไวรัสพาร์อาร์เอสและ pIFN γ ที่ปริมาณ 0.4 μ g (PRRSV+pIFN γ) และ โมโนซัยต์ที่ได้รับไวรัสพาร์อาร์เอสและ pcDNA vector ที่ปริมาณ 0.4 μ g (PRRSV+pcDNA) อักษร a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ PRRSV+pcDNA (ทดสอบด้วยวิธี one-way ANOVA และ Dunnett's t test) สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Ctrl (ทดสอบด้วยวิธี one-way ANOVA และ Dunnett's t test)



รูปที่ 5 ปริมาณ IFN γ , TNF α และ IL-10 ใน cell culture supernatant ของโมโนไซต์ที่กระตุ้นด้วย LPS (Ctrl) โมโนไซต์ที่ได้รับไวรัสพาร์อาร์เอสและ LPS (PRRSV) โมโนไซต์ที่ได้รับไวรัสพาร์อาร์เอส, transfection reagent และ LPS (PRRSV+Tr) โมโนไซต์ที่ได้รับไวรัสพาร์อาร์เอสและ pIFN γ ที่ปริมาณ 0.4 μ g (PRRSV+pIFN γ) และโมโนไซต์ที่ได้รับไวรัสพาร์อาร์เอสและ pcDNA vector ที่ปริมาณ 0.4 μ g (PRRSV+pcDNA) อักษร a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ PRRSV+pcDNA (ทดสอบด้วยวิธี one-way ANOVA และ Dunnett's t test) สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Ctrl (ทดสอบด้วยวิธี one-way ANOVA และ Dunnett's t test)