

บทคัดย่อ

Project Code: MRG5280055

Project Title: การพัฒนาชุดทดสอบ Antigen ELISA เพื่อตรวจหาการติดเชื้อ Pestivirus ชนิดพิเศษสายพันธุ์ Th/04_KhonKaen

Investigator: ผศ.สพ.ญ.ดร.จารุวรรณ คำพา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: Jaruwana.kampa@gmail.com Jarpat@kku.ac.th

Project Period: 15 มีนาคม 2552 – 15 มีนาคม 2555 (รวมระยะขยายเวลา 1 ปี)

ไวรัสเพสติโคกโรคที่สำคัญคือโรคไวรัสโตอะเรีย (บีวีดี) ส่งผลสำคัญทางเศรษฐกิจต่อการผลิตโคทั่วโลก เมื่อแบ่งตามความเป็นแอนติเจนและพันธุกรรมแล้วไวรัสเพสติที่ก่อโรคในโค จะแบ่งเป็น ไวรัสบีวีดี-1, ไวรัสบีวีดี-2 และไวรัสเพสติชนิดพิเศษ ซึ่งในประเทศไทยได้มีการค้นพบไวรัสเพสติชนิดพิเศษสายพันธุ์ Th/04_KhonKaen จึงได้ถูกใช้เป็นไวรัสต้นแบบในการพัฒนาชุดทดสอบแอนติเจนอีไลซ่า โปรตีนอีอาร์เอนเอสของไวรัสดังกล่าว ถูกแยกสกัดและนำไปฉีดให้หนูขาวเล็ก BALB/c เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลต่อโปรตีนนี้ได้ โมโนโคลนอลที่ได้ถูกใช้ยัดบนผิวเพลทเพื่อจับจับแอนติเจนอีอาร์เอนเอสของไวรัสเพสติ โพลีโคลนอลที่ใช้จับไวรัสถูกผลิตในกระต่ายโดยการฉีดไวรัสเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี เพลทที่ใช้ทดสอบเป็นโพลีสไตรีนขนาด 96 หลุม เคลือบผิวเพลทด้วยโมโนโคลนอลขนาด 5 ไมโครแกรมต่อไมโครลิตรของคาร์บอนเนตบัพเฟอร์ที่ผสมบีเอสเอ 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ในระหว่างขั้นตอนการเติมสารล้างเพลทด้วย 0.05%TPBS ไวรัสถูกจับอีกชั้นด้วยโพลีโคลนอลที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรในสารละลาย 1%บีเอสเอ ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นถูกตรวจจับโดยอิมมูโนกลอบบูลินแพะที่มีต่อกระต่ายคอนจูเกทกับเอนไซม์ฮอรัราดิซเปอร์ออกซิเดส ใช้สารละลายทีเอ็มบีเป็นตัวแสดงปฏิกิริยาที่เป็นบวก ในการพัฒนาชุดทดสอบนี้ได้ทดลองใช้สารเคลือบผิวเพลท สารป้องกัน สารปิดผิวเพลทเพื่อลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ และสารทำลายชนิดต่างๆ ถึงแม้ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถแยกตัวอย่างที่มีและไม่มีไวรัสจากกันได้ แต่ไม่สามารถลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะลง จึงไม่สามารถตรวจวัดประสิทธิภาพที่แท้จริงของชุดทดสอบได้

คำสำคัญ: ไวรัสเพสติชนิดพิเศษ, ชุดทดสอบแอนติเจนอีไลซ่า, โปรตีน อีอาร์เอนเอส

Abstract

Project Code : MRG 5280055

Project Title : Development of an antigen capture ELISA for detection of an atypical Pestivirus, Th/04_KhonKaen

Investigator : Assit.Prof.Dr. Jaruwan Kampa
Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University

E-mail Address : Jaruwan.kampa@gmail.com Jarpat@kku.ac.th

Project Period : 15 March 2009 – 15 March 2012 (including 1 year extension)

An important pathogenic pestivirus, Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), cause a significant economic impact on cattle production worldwide. Based on antigenic and genetic differences, cattle pestivirus isolates can be classified into BVDV-1 and BVDV-2, and an atypical group. A Thai-isolate atypical pestivirus, designated Th/04_KhonKaen, was used as principal virus for developing an antigen-capture ELISA test. A monoclonal antibody to the E^{ms} protein of the Th/04_KhonKaen was produced by immunization into BALB/c mice and production of antibody positive- hybridoma clone. The monoclonal antibody was used as a capture antibody. The detection antibody was a polyclonal antibody which was raised by immunized rabbits with the whole Th/04_KhonKaen. The 96-well polystyrene microplate was use as a solid phase for the ELISA. The plates were coated with 5 ug/ml of the monoclonal antibody in carbonate buffer with 10 ug/ml BSA. After 3 times washes with 0.05%TPBS, the plates were added with 25 ug polyclonal antibody in 1%BSA in PBS. The positive reaction was detected by goat anti-rabbit immunoglobulin-HRP and TMB. The test results were read at 450 nm. Different coating buffers, blocking solutions and reagents diluents were formulated and tested for the best ELISA performance. Although the developed test could differentiate virus positive sample from virus negative ones, however, the test still showed high background signals that could not be eliminated neither by any blocking solutions and methods. Because the unsolvable problem of background signals, the ELISA was unable to evaluate its efficiency.

Keywords: Atypical pestivirus, antigen ELISA, E^{ms} protein