

การโคลนยีนและการศึกษาลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้าง membrane protein
ของเชื้อไวรัสพิตัสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร จังหวัดราชบุรี ในปีพ.ศ. 2551



นางสาวมนัน วงศ์เสรีพัฒนา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING AND SEQUENCING OF MEMBRANE PROTEIN GENE FROM
PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA (PED) VIRUS INFECTED PIGS
FROM RATCHABURI PROVINCE IN 2008



Miss Manun Wongserepipatana

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

510787

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การโคลนยีนและการศึกษาลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการ
สร้าง membrane protein ของเชื้อไวรัสพิตีดีสายพันธุ์ที่แยก
ได้จากสุกร จังหวัดราชบุรี ในปีพ.ศ. 2551

โดย

นางสาวมนัน วงศ์เสรีพัฒนา

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์สัตวแพทย์

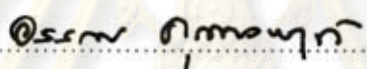
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อธิภู นันทประเสริฐ

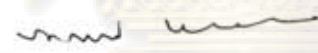
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สุกพล เลื่องยศสิทธิ์ชากุล

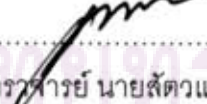
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรถนพ คุณาวงษ์กฤต)

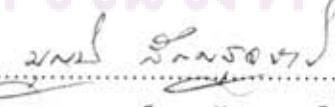
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง รัตนากรณ์ พรหมอาสา)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อธิภู นันทประเสริฐ)

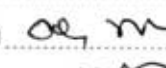


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สุกพล เลื่องยศสิทธิ์ชากุล)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. คณิศกิติ อรวีระกุล)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ บุญมี สัตตัญญูจจาวี)

มนัน วงศ์เสรีพัฒนา : การโคลนยีนและการศึกษาลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้าง membrane protein ของเชื้อไวรัสพิดีตีสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร จังหวัดราชบุรี ในปี พ.ศ. 2551. (CLONING AND SEQUENCING OF MEMBRANE PROTEIN GENE FROM PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA (PED) VIRUS INFECTED PIGS FROM RATCHABURI PROVINCE IN 2008) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.น.สพ.ดร.อริภู นันทประเสริฐ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.น.สพ.ดร.สุพล เลื่องยศสื่อชากุล, 88 หน้า.

เชื้อไวรัสพิดีตีสจัดอยู่ใน family *Coronaviridae* พบว่า full length membrane (M) gene เป็นยีนในอุดมคติที่มีความเหมาะสมในการโคลนและการสร้างโปรตีน เพื่อนำโปรตีนมาพัฒนาเป็นแอนติเจนสำหรับตรวจการสัมผัสเชื้อไวรัสพิดีตีสด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา ในปัจจุบันมีการศึกษา M gene ของเชื้อไวรัสพิดีตีส (PEDV-M gene) สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยไม่มากนัก ผู้วิจัยจึงสนใจการโคลน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพิดีตีสสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ผ่านระบบเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และศึกษาลำดับเบส โดยเริ่มจากการสกัดแยก total RNA ของเชื้อไวรัสพิดีตีสออกจากลำไส้เล็กของลูกสุกรแรกเกิดที่ติดเชื้อจากฟาร์มสุกร จังหวัดราชบุรี เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene ด้วยวิธี RT-PCR และโคลนเข้าสู่ pCR[®] 8/GW/TOPO[®] vector แล้ว subcloned เข้า pGEX-4T-2 expression vector ผลการศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพิดีตีสสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรีได้สำเร็จ และสามารถสร้าง pGEX-4T-2CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pGEX-4T-2CU/VET/MED/006PEDV-M recombinant plasmid ได้จำนวน 6 clones จากทั้งหมด 10 clones จากการศึกษาลำดับเบสของ PEDV-M gene ที่เตรียมจาก RT-PCR และ PEDV-M gene ใน recombinant plasmids ที่ศึกษา พบว่ามีลำดับเบสของยีนดังกล่าวเหมือนกัน คือ มีจำนวน 1 open reading frame ขนาด 681 bp เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสกับ PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพิดีตีสสายพันธุ์ที่มีรายงานใน GenBank พบว่ามีความคล้ายกับสายพันธุ์ในประเทศไทย 96.6-100% สายพันธุ์ในประเทศจีน 97.2-99.1% สายพันธุ์ในประเทศเกาหลีใต้ 97.5-97.9% สายพันธุ์ในประเทศญี่ปุ่น 98.3% และสายพันธุ์ CV777 98.2% จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส และ phylogenetic tree analysis พบว่า PEDV-M gene ของจังหวัดราชบุรีที่รายงานครั้งนี้มีลำดับเบสคล้ายกับ PEDV-M gene ของสายพันธุ์ในประเทศจีนมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของสายพันธุ์ในประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น และ CV777

ภาควิชา อายurvedศาสตร์..... ลายมือชื่อนิลิต มนัน วงศ์เสรีพัฒนา
 สาขาวิชา อายurvedศาสตร์สัตวแพทย์..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก 
 ปีการศึกษา 2551..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม 

5075559331 : MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEYWORDS : PEDV-M GENE, CLONING, SEQUENCING

MANUN WONGSEREPIPATANA : CLONING AND SEQUENCING OF MEMBRANE PROTEIN GENE FROM PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA (PED) VIRUS INFECTED PIGS FROM RATCHABURI PROVINCE IN 2008. ADVISOR : ASSOC. PROF. ATHIPOO NUNTAPRASERT, D.V.M., Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SUPOL LUENGYOSLUECHAKUL, D.V.M., Ph.D., 88 pp.

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) belongs to a member of *Coronaviridae*. The full length membrane (M) gene is an ideal candidate for cloning and protein expression in order to develop recombinant antigens for serological detection of PEDV infected pigs. Recently, there have been a few reports about the study of M gene of PEDV (PEDV-M gene) from Thai field isolate strain. Therefore, the purpose of this study is to clone the PEDV-M gene of Thai isolate PEDV into *E. coli* and to analyze the sequence of this gene. Total RNA of PEDV was isolated from small intestines of infected newborn piglets in a pig farm from Ratchaburi province in January, 2008. The PEDV-M gene was amplified by using Reverse Transcription-PCR (RT-PCR), cloned into PCR[®] 8/GW/TOPO[®] vector, and subcloned into pGEX-4T-2 expression vector. The results of this study showed that PEDV-M gene from Ratchaburi province was successfully detected. Six clones of positive pGEX-4T-2CU/VET/MED/001-006PEDV-M recombinant plasmids were selected from total ten clones. The PEDV-M gene prepared from RT-PCR and PEDV-M gene in six clones of recombinant plasmids were completely sequenced. The PEDV-M sequences showed the similarity of 681 nucleotides. The analysis revealed that PEDV-M gene in this study had a high homology compared to other PEDV strains selected from GenBank at 96.6-100% with Thai isolates, at 97.2-99.1% with China isolates, at 97.5-97.9% with Korea isolates, at 98.3% with Japan strain and at 98.2% with CV777 strains, respectively. As a result, phylogenetic tree of PEDV-M nucleotides in the present study demonstrated the PEDV-M gene in Ratchaburi province had closer relationship to China isolates than Korea isolates, Japan isolate and CV777 strains.

Department : ...Veterinary Medicine..... Student's Signature M. Wongserepipatana
 Field of Study : ...Veterinary Medicine..... Advisor's Signature A. Nuntaprasert
 Academic Year : ...2008..... Co-Advisor's Signature S. Luengyosluechakul

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร.อธิฏ์ นันทประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก และรศ.น.สพ.ดร.สุพล เลื่องยศสิทธากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่
กรุณาให้ความรู้ และให้คำแนะนำในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.สพ.ญ.รัตนภรณ์ พรหมาสา ประธานในการสอบโครงร่าง
วิทยานิพนธ์ และการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รศ.น.สพ.ดร.คณิศศักดิ์ อรวิระกุล กรรมการในการ
สอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ และการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รศ.น.สพ.บุญมี สัญญสุจจารี กรรมการ
ภายนอกมหาวิทยาลัยในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และอ.น.สพ.ดร. พรชลิต อัครวิชัย กรรมการ
ในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ และเจ้าหน้าที่หน่วยชีวเคมี ที่อำนวยความสะดวก
สะดวกด้านเอกสารสำคัญทางราชการ รวมทั้งเครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย อีกทั้งให้ความ
เป็นกันเองมาโดยตลอด

ขอบคุณ สพ.ญ. กุลิสรา มรุตพันธ์ธร น.สพ. วชิรา หุ่นประสิทธิ์ น.สพ.นาวิน ชี้อุทธจิต
สพ.ญ.บุษบา ทองห่อ และสพ.ญ. ปฐมภรณ์ จาระมิชัย รวมทั้งนิสิตปี 6 และ ปี 5 ที่ให้ความ
ช่วยเหลือในการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อ-คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัว ที่ให้ความอนุเคราะห์
และให้คำปรึกษาในด้านต่างๆ เป็นอย่างดีตลอดมา อีกทั้งขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคน ที่เป็นกำลังใจ
ตลอดระยะเวลาในการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

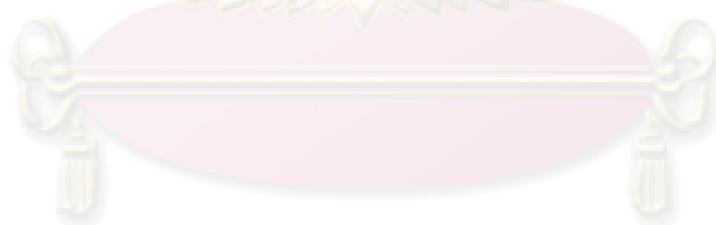
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ลักษณะทั่วไปของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	4
ความสำคัญของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	4
การตรวจวินิจฉัยโรคพีอีดี.....	5
โครงสร้างและหน้าที่ยีนที่สำคัญของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	9
การศึกษาการโคลนยีนที่สำคัญของเชื้อไวรัสพีอีดีและการประยุกต์ใช้.....	13
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
การออกแบบ PEDV-M primers.....	18
ตัวอย่างลำไส้ลูกสุกร.....	18
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	18
1. การเก็บตัวอย่างเชื้อไวรัสพีอีดี.....	20
2. การสกัด total RNA จากตัวอย่าง.....	20
3. การสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี reverse-transcription (RT).....	20

บทที่	หน้า
3	4. การโคลนยีนส่วน PEDV-M gene ผ่านเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> 22
	5. การสร้าง PEDV-M gene expression vector ผ่านเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> 24
	6. การศึกษาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551..... 25
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 27
	1. ผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ด้วยวิธี RT-PCR..... 27
	2. ผลการโคลนยีนส่วน PEDV-M gene ผ่านเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> 29
	3. ผลการสร้าง PEDV-M gene expression vector ผ่านเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> 32
	4. ผลการศึกษาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551..... 38
5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 49
	สรุปผลการวิจัย..... 49
	อภิปรายผลการวิจัย..... 51
	ข้อเสนอแนะ..... 57
	รายการอ้างอิง..... 59
	ภาคผนวก..... 68
	ภาคผนวก ก เครื่องมือ-อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และสารเคมี..... 69
	ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี..... 74
	ภาคผนวก ค ลำดับเบสของ PEDV-M gene สำหรับเตรียม primers..... 76
	ภาคผนวก ง pCR8 [®] /GW/TOPO [®] vector map..... 78
	ภาคผนวก จ pGEX-4T-2 vector map..... 79
	ภาคผนวก ฉ ลำดับเบส และ deduced amino acids ของ CU/VET/MED/001 PEDV-M gene..... 80
	ภาคผนวก ช เปรียบเทียบลำดับเบสส่วน PEDV-M gene จำนวน 24 สายพันธุ์.... 81
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สรุปเทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	8
2.2	จีโนมและยีนที่สำคัญของเชื้อไวรัสพีอีดี.....	12
2.3	ยีนที่นำมาศึกษาทางอณูชีวโมเลกุลด้วยระบบการโคลนยีนต่างๆ และการนำมา ประยุกต์ใช้.....	17
3.1	สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพีอีดีที่นำลำดับเบสส่วน PEDV-M gene มาใช้ร่วมในการ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี phylogenetic tree analysis	26
4.1	ลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่ได้จากตัวอย่าง และ recombinant plasmids ต่างๆ ที่ศึกษา.....	34
4.2	สัดส่วนของ deduced amin acids จากลำดับเบสของ CUVET/MED/001 PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551.....	41
4.3	แสดง identity ของลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ ในประเทศไทย ประเทศจีน ประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น และสายพันธุ์ มาตรฐาน CV777.....	46



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แบบจำลองสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่อิตีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777.....	11
2.2	แผนภาพแสดงคุณสมบัติของระบบที่ใช้ในการผลิต recombinant protein.....	16
3.1	แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	19
4.1	ผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene จากตัวอย่างลำไส้ลูกสุกร จังหวัดราชบุรี ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2551.....	28
4.2	ผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ภายใน pCR [®] 8CU/VET/MED/PEDV-M recombinant plasmids ผ่านเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ One Shot [®] TOP 10 Chemically Competent Cell.....	30
4.3	ผลการตัด PEDV-M gene ออกจาก pCR [®] 8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ด้วย <i>EcoRI</i> restriction enzyme.....	31
4.4	ผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ภายใน pGEX-4T-2CU/VET/MED/PEDV-M recombinant plasmids ผ่านเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ JM109.....	33
4.5	ลำดับส่วนของ nucleotides ที่เป็นองค์ประกอบใน CU/VET/MED/001PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสที่อิตีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551.....	39
4.6	ลำดับส่วนของ deduced amino acids จากลำดับเบสของ CU/VET/MED/001 PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสที่อิตีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551.....	40
4.7	เปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของ recombinant plasmids ต่างๆ ที่ศึกษา.....	43
4.8	phylogenetic tree ของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene และลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสที่อิตีสายพันธุ์ที่มีการรายงานใน GenBank.	48

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	percent
°C	degree celsius
µg	microgram
µl	microlitre
µM	micromolar
bp	base pair
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cfu	colony forming unit
DW	disitilled water
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates
g	gram
kDa	kilodalton
l	litre
LB	Luria-Bertani
M	membrane
ml	milliliter
mM	millimolar
nmole	nanomole
PBS	phosphate buffer solution
PCR	polymerase chain reaction
PED	porcine epidemic diarrhea
PEDV	porcine epidemic diarrhea virus
RNA	ribonucleic acid
rpm	round per minute
RT	reverse transcription
U	unit
UPDW	ultra pure disitilled water

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคท้องร่วงติดต่อของสุกร หรือโรคพีอีดี (porcine epidemic diarrhea, PED) เกิดจากเชื้อไวรัส porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สุกรแสดงอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง และมีการระบาดได้อย่างรวดเร็วในฤดูหนาว มีการรายงานอุบัติการณ์ของโรคพีอีดีในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งทวีปเอเชีย โดยเฉพาะประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น และประเทศจีน (Sueyoshi et al., 1995; Shibata et al., 2001) สำหรับโรคพีอีดีในประเทศไทย กรมปศุสัตว์ได้รายงานการตรวจพบโรคพีอีดีทางห้องปฏิบัติการในปี พ.ศ. 2538-2547 ทั้งหมด 8 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บมาจากฟาร์มสุกรในพื้นที่ภาคใต้ และภาคตะวันตก และมีการรายงานการพบโรคพีอีดีอีกครั้งเมื่อต้นปี พ.ศ. 2551 ที่จังหวัดราชบุรี (กรมปศุสัตว์, 2551¹) และจังหวัดฉะเชิงเทรา (กรมปศุสัตว์, 2551²) ลูกสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอีดีมีอัตราการป่วยด้วยอาการท้องร่วงสูงถึง 90% และลูกสุกรบางตัวตายจากการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นแทรกซ้อน เช่น เชื้อแบคทีเรียอี โคลีย์ (*Escherichia coli*) เชื้อแบคทีเรียคลอสตริเดียม เป็นต้น ส่วนลูกสุกรที่รอดชีวิตได้จะมีสภาพร่างกายที่ผอมแห้ง อ่อนแอ ต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงยาวนานยิ่งขึ้น

จากความสูญเสียที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อไวรัสพีอีดีในสุกรที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้ ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลของเชื้อไวรัสพีอีดี เพื่อเป็นฐานข้อมูลด้านอนุชีวโมเลกุลของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่ก่อปัญหาในประเทศไทย สำหรับพัฒนาวิธีการวินิจฉัย และป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ในปัจจุบันมีการศึกษาลำดับยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนของเชื้อไวรัสพีอีดี และพบว่า โปรตีนหลักของเชื้อไวรัสพีอีดีที่สามารถการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันร่างกายของสุกรได้มี 3 ชนิด คือ spike (S) protein, nucleocapsid (N) protein และ membrane (M) protein แต่ N protein มีข้อเสีย คือ มีการรายงานถึงการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันของแอนติบอดีต่อ N protein ของเชื้อไวรัสพีอีดีกับเชื้อไวรัส feline infectious peritonitis virus (FIPV) (Yaling et al., 1988) อีกทั้ง N protein เป็นโปรตีนโครงสร้างที่อยู่ด้านในของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส (Sturman et al., 1980) N protein จึงเป็นแอนติเจนที่ด้อยกว่าเมื่อเทียบกับ S protein ซึ่ง Knuchel และคณะ (1992) รายงานถึงความเข้มข้นของแอนติเจนที่ด้อยของ S protein เนื่องจาก S protein มีหน้าที่ในกระบวนการยึดเกาะของเชื้อไวรัส (viral attachment) เพื่อเข้าสู่เซลล์ลำไส้เล็ก (Duarte and Laude, 1994) อย่างไรก็ตาม M protein เป็น glycoprotein ที่พบได้มาก และมีส่วนที่อยู่ภายนอกเปลือกหุ้มอนุภาคของไวรัส นอกจากนี้ M protein ยังมีความคงตัวสูงกว่า S protein ดังนั้น M protein จึงน่าจะเป็น

แอนติเจนที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสที่อิตาลีในสุกรได้ดีกว่า N protein และ S protein (Shenyang et al., 2007)

การโคลนยีนผ่านระบบแบคทีเรีย *E. coli* เป็นระบบที่สามารถผลิต recombinant protein ได้ปริมาณสูงภายในระยะเวลาสั้น อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายไม่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิต recombinant protein โดยผ่านระบบอื่น เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เพาะเลี้ยงได้ง่าย และมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการประยุกต์ใช้ recombination technique เพื่อโคลนยีนที่ควบคุมการสร้าง M protein ของเชื้อไวรัสที่อิตาลี (PEDV-M gene) ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างลำไส้ลูกสุกรป่วยอายุ 1-3 วัน ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ จากจังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในการโคลนยีนส่วน PEDV-M gene ผ่านเชื้อแบคทีเรียในครั้งนี้ สามารถนำ PEDV-M gene ที่ได้จากการโคลนมาศึกษาลำดับเบส เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานทางด้านอนุชีวโมเลกุลส่วน M protein ของเชื้อไวรัสที่อิตาลีที่มีการระบาดในประเทศไทย เมื่อเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2551 อีกทั้งยังสามารถนำไปศึกษาเพิ่มเติมถึงการกระตุ้นการผลิต recombinant PEDV-M proteins เพื่อผลิตเป็นแอนติเจน และใช้ในการตรวจสอบการสัมผัสเชื้อไวรัสที่อิตาลีด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ได้ต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

รับตัวอย่างลำไส้ลูกสุกรอายุ 1-3 วัน ที่แสดงอาการท้องร่วง เพื่อสกัด total RNA และสังเคราะห์เป็น cDNA เพื่อเป็นต้นแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ full length PEDV-M gene และโคลนยีนเข้าสู่ pCR[®] 8/GW/TOPO[®] vector และ pGEX-4T-2 vector ซึ่งเป็น expression vector ตามลำดับ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เป็น competent cell สำหรับการผลิต recombinant plasmid ศึกษาลำดับเบสของ PEDV-M gene โดยส่งตรวจหาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่ผลิตได้จาก RT-PCR technique และ recombinant PEDV-M plasmids จากการโคลนยีนเข้าสู่ pCR[®] 8/GW/TOPO[®] vector และ pGEX-4T-2 vector วิเคราะห์ลำดับเบส และเปรียบเทียบลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสที่อิตาลีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสที่อิตาลีสายพันธุ์ในประเทศไทย ประเทศจีน ประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น และสายพันธุ์ CV777 ที่มีการรายงานใน GenBank ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.0.9. (Hall, 1999) และโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Version 4.1 (Beta) (Tamura et al., 2007)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. โคลนยีนส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพื้อติสสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร ในจังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*
2. รายงาน และศึกษาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพื้อติสสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร ในจังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถโคลนยีนส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพื้อติสสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร ในจังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 เข้าสู่ expression vector ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อประโยชน์ในการผลิต recombinant PEDV-M protein ต่อไป
2. สามารถรายงาน และวิเคราะห์ลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพื้อติสสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร ในจังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปของเชื้อไวรัสพืธีติ

เชื้อไวรัสพืธีติจัดอยู่ใน family *coronaviridae* และ genus *coronavirus* เป็นเชื้อไวรัสที่มีสายพันธุกรรมแบบ single-stranded ribonucleic acid (ssRNA) มีขนาดสายพันธุกรรม 28,033 bp (GenBank accession number NC_003436) (Kocherhans et al., 2001) เชื้อไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ใน *coronavirus* กลุ่ม 1 ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัส feline coronavirus (FeCoV) และเชื้อไวรัส feline infectious peritonitis virus (FIPV) ที่ก่อโรคในแมว เชื้อไวรัส canine coronavirus (CCoV) และเชื้อไวรัส rabbit coronavirus (RCoV) ที่ก่อโรคในสุนัข และกระต่าย ตามลำดับ รวมทั้งจัดเป็นเชื้อไวรัสกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัส transmissible gastroenteritis virus (TGEV) ซึ่งก่อโรคที่จิวในสุกร เชื้อไวรัสพืธีติจัดอยู่ในกลุ่มย่อย (subgroup) 1b เช่นเดียวกับ *coronavirus* ที่ก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ เชื้อไวรัส human coronavirus สายพันธุ์ 229E (HCoV-229E) (Kocherhans et al., 2001; Saif, 2004; Zheng et al., 2005) และสายพันธุ์ NL63 (HCoV-NL63) (Vijaykrishna et al., 2007)

ความสำคัญของเชื้อไวรัสพืธีติ

สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพืธีติจะแสดงอาการท้องร่วง มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ส่วนอัตราการตายขึ้นอยู่กับช่วงอายุของสุกรที่ป่วย เชื้อไวรัสชนิดนี้มีการแพร่กระจายตัวได้ดีในช่วงที่มีสภาพอากาศหนาวเย็น มีการรายงานถึงการระบาดของเชื้อไวรัสพืธีติในทวีปยุโรป (Pensaert and De Bouck, 1978; Carvajal et al., 1995) และทวีปเอเชีย เช่น ประเทศจีน ประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น (Sueyoshi et al., 1995; Shibata et al., 2001) โดยมีการรายงานเชื้อไวรัสพืธีติครั้งแรกที่ประเทศอังกฤษ เมื่อปี พ.ศ. 2514 (Pospischil et al., 2002) สำหรับประเทศไทย มีการรายงานจากห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ พบโรคพืธีติจากตัวอย่างสุกรที่สุ่มตรวจ ในช่วงปี พ.ศ. 2538-2547 ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง คือ มีการรายงานในปี พ.ศ. 2538 จำนวน 1 ตัวอย่าง ต่อมา มีการรายงานพบโรคพืธีติจากตัวอย่างสุกรที่สุ่มตรวจในปี พ.ศ. 2539 และ พ.ศ. 2540 ปีละ 3 ตัวอย่าง และมีการรายงานการพบโรคนี้อีกครั้งเมื่อปี พ.ศ. 2547 จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างสุกรทั้งหมดได้รับมาจากฟาร์มสุกรที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ และภาคตะวันตก มีการรายงานพบโรคพืธีติอีกครั้ง ที่จังหวัดราชบุรี ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 (กรมปศุสัตว์, 2551¹) และมีการรายงานการพบโรคพืธีติที่จังหวัดฉะเชิงเทรา ในเดือนเมษายนของปีเดียวกัน (กรมปศุสัตว์, 2551¹) สรุปการ

รายงานโรคพืชิตีสะสมตั้งแต่ เดือนมกราคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2551 จากสุกรในฝูงจำนวน 1,480 ตัว มีสุกรป่วยจำนวน 500 ตัว และสุกรตายจำนวน 400 ตัว (กรมปศุสัตว์, 2551¹)

เซลล์เป้าหมายหลักของเชื้อไวรัสพืชิตี คือ เซลล์ส่วนวิลไลของลำไส้ โดยเชื้อไวรัสใช้โปรตีนส่วน S protein จับกับ aminopeptidase N ซึ่งเป็นตัวรับ (receptor) (Li et al., 2007) และปล่อยสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์วิลไลของลำไส้ จึงสามารถตรวจพบการติดเชื้อ และการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพืชิตีที่บริเวณลำไส้เล็ก เมื่อตรวจวินิจฉัยขึ้นเนื้อตัวอย่างจากลำไส้เล็กของสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสพืชิตีโดยอาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาและชีวเคมี พบการฝ่อของเซลล์ส่วนวิลไลปานกลางถึงรุนแรง และมีการรวมตัวกันของเซลล์ที่ลำไส้เล็กส่วนกลาง และลำไส้เล็กส่วนปลาย ด้วยสาเหตุดังกล่าวจึงทำให้ประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารของลำไส้ลดลง และมีอาการท้องร่วงตามมา (Kim and Chae, 2003) สุดท้ายสภาพร่างกายสุกรจะเกิดภาวะแห่งน้ำ ร่วมกับอาการแสดงอื่นๆ ได้แก่ ชีมี อ่อนแรง และความอยากอาหารลดลง (Carvajal et al., 1995; Kim and Chae, 2003) อย่างไรก็ตาม พบว่าอายุของสุกรมีผลต่อการแสดงความรุนแรงของอาการที่ปรากฏจากการติดเชื้อไวรัสพืชิตี หากมีการติดเชื้อในลูกสุกรที่อายุน้อยกว่า 1 สัปดาห์ และลูกสุกรไม่เคยสัมผัสเชื้อไวรัสชนิดนี้มาก่อน ลูกสุกรจะแสดงอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงหลังจากได้รับเชื้อไวรัสพืชิตีเพียง 1 วัน พบว่ามีการอาเจียนบ้างใน 1-3 วันหลังได้รับเชื้อ และตายภายใน 3-4 วัน หลังจากได้รับเชื้อ ขณะที่ลูกสุกรอายุ 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ แสดงอาการท้องร่วงใน 1-4 และ 3-5 วันหลังได้รับเชื้อ ตามลำดับ โดยอาจพบอาการซึม และเบื่ออาหารเล็กน้อยร่วมด้วย แต่ไม่พบการตายของสุกรที่ป่วยในช่วงอายุนี้อัน ส่วนสุกรอายุ 8-12 สัปดาห์ อาจไม่พบอาการป่วย รวมถึงอาการท้องร่วง (Shibata et al., 2000)

การตรวจวินิจฉัยโรคพืชิตี

การวินิจฉัยแยกโรคพืชิตีออกจากโรคอื่นๆ ที่ก่อปัญหาในระบบทางเดินอาหารของสุกร โดยอาศัยเพียงอาการป่วยเพื่อวินิจฉัยโรคทำได้ค่อนข้างยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวินิจฉัยแยกการติดโรคพืชิตีออกจากโรคที่จีอี (Jackson and Cockcroft, 2007) ปัจจุบันสามารถตรวจวินิจฉัยโรคพืชิตีได้หลายวิธี ซึ่งสามารถแบ่งวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพืชิตีออกเป็น การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสพืชิตี และการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพืชิตี (ตารางที่ 2.1)

การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสพืชิตีมีหลายวิธี การตรวจหาอนุภาคของเชื้อไวรัส สามารถทำได้โดยการตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดอิเล็กตรอน (electron-microscopy) (Pensaert and De Bouck, 1978) หรือการแยกเชื้อไวรัสพืชิตีจากลำไส้เล็ก หรืออุจจาระของสุกรที่ติดเชื้อ และเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสพืชิตีในเซลล์เพาะเลี้ยง (viral isolation and cultivation) ซึ่งเชื้อ

ไวรัสพีอีดีสามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells (Hofmann and Wyler, 1989; Shibata et al., 2000) โดยหลังจากที่เซลล์เพาะเลี้ยงได้รับเชื้อไวรัสพีอีดีเป็นเวลา 9 ชั่วโมง เซลล์เพาะเลี้ยงจะปรากฏรอยโรค (cytopathic effect) มีลักษณะแบบ syncytial formation คือมีการรวมตัวของไซโตพลาสซึม (cell fusion) และนิวเคลียสของเซลล์ โดยที่บริเวณส่วนกลางรอยโรคของเซลล์เพาะเลี้ยงมีลักษณะคล้าย plaque (Shibata et al., 2000) เซลล์เพาะเลี้ยงจะรวมตัวกันอย่างสมบูรณ์ภายใน 18 ชั่วโมงหลังจากที่เซลล์ได้รับเชื้อไวรัสพีอีดี และเซลล์เพาะเลี้ยงจะหลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงในที่สุด (Hofmann and Wyler, 1989) นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสพีอีดีได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SB1 ที่เตรียมจากเยื่อบุกระเพาะปัสสาวะลูกสุกรที่ปลอดเชื้อ และยังไม่ได้รับนมแม่เหลือง (bladder epithelial cells of cesarean-derived colostrum-deprived; CDCD piglets) และเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK (Shibata et al., 2000) ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสพีอีดีจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ สามารถทำได้โดยอาศัยความรู้พื้นฐานทางภูมิคุ้มกันร่วมกับจุลพยาธิวิทยา เพื่อตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry วิธีดังกล่าวนี้สามารถตรวจสอบแอนติเจนของเชื้อไวรัสพีอีดีได้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังจากสุกรได้รับเชื้อไวรัส (Kim and Chae, 2003) ส่วนการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี สามารถตรวจได้ด้วยวิธี in situ hybridization ซึ่งตรวจหาสารพันธุกรรมพบได้ตั้งแต่ช่วงแรกของการติดเชื้อคือ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อไวรัสพีอีดี การตรวจด้วยวิธี in situ hybridization มีความไวในการตรวจพบสูงกว่าการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry (Kim and Chae, 2003) แต่มีใช้ค่าใช้จ่ายสูง และใช้ระยะเวลาในการตรวจนานกว่า ในกรณีที่ต้องการตรวจตัวอย่างมีปริมาณสารพันธุกรรมต่ำ สามารถตรวจได้โดยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสพีอีดีด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) วิธีนี้เป็นการตรวจที่ให้ผลรวดเร็ว ผลการตรวจมีความไวและความจำเพาะสูง การตรวจด้วยวิธี RT-PCR จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจวินิจฉัยโรคพีอีดี (Ishikawa et al., 1997) ต่อมา Song และคณะ (2006) ได้พัฒนาการตรวจด้วยวิธี multiplex RT-PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยแยกเชื้อไวรัสพีอีดีออกจากเชื้อไวรัสทีจีอี และเชื้อไวรัสโรตา (porcine group A rotavirus, GAR) จากตัวอย่างอุจจาระ และลำไส้จากลูกสุกรช่วงแรกเกิดที่ป่วยด้วยอาการท้องร่วง

ส่วนการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพีอีดี สามารถตรวจได้ด้วยวิธี ELISA ซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติบอดีที่เกิดจากการตอบสนองของร่างกายสุกร กรรมวิธีในการตรวจไม่ยุ่งยาก ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว สามารถอ่านผลการตรวจได้ง่าย ผลการตรวจโรคพีอีดีด้วยวิธีนี้ที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่าการตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยการตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดอิเล็กตรอน โดยให้ผลการตรวจใกล้เคียงกับการตรวจด้วยวิธี serum neutralization (SN) (Oh et al., 2005) ซึ่งมี

ความจำเพาะ และความไวมากกว่าการตรวจด้วยวิธี indirect immunofluorescence test (IIFT) (Hofmann and Wyler, 1990) การด้วยวิธี ELISA สามารถตรวจการติดเชื้อไวรัสพีอีดีในสุกรได้ ตั้งแต่ช่วงที่แสดงอาการเฉียบพลัน และช่วงที่มีการขับเชื้อไวรัส (Callebaut et al., 1982) วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมในการนำไปประเมินสภาพฝูงสุกรภายในฟาร์ม และใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสพีอีดีในสุกรที่นำเข้าทดแทนภายในฝูง เพื่อประเมินสภาพการติดเชื้อของสุกร ซึ่งใช้ในการวางแผนควบคุม และป้องกันโรคพีอีดีภายในฟาร์มสุกร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 สรุปเทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของเชื้อไวรัสฮีดี

การตรวจหาแอนติเจน	การตรวจหาแอนติบอดี
<ul style="list-style-type: none"> ▪ electron-microscopy¹ ▪ viral isolation and cultivation² ▪ immunohistochemistry³ ▪ in situ hybridization³ ▪ RT-PCR⁴ 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SN⁵ ▪ ELISA⁶ ▪ IFA/IFA⁷

1. Pensaert and De Bouck, 1978

2. Hofmann and Wyler, 1989; Shibata et al., 2000

3. Kim and Chae, 2003

4. Ishikawa et al., 1997; Song et al., 2006

5. Oh et al., 2005

6. Callebaut et al., 1982; Hofmann and Wyler, 1990; Oh et al., 2005

7. Hofmann and Wyler, 1990

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงสร้างและหน้าที่สำคัญของเชื้อไวรัสพือดี

สายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพือดีประกอบด้วยยีนต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.2 โดยยีนที่สำคัญของเชื้อไวรัสพือดีแบ่งเป็นส่วน non-structural gene และส่วน structural gene แสดงดังภาพที่ 2.1

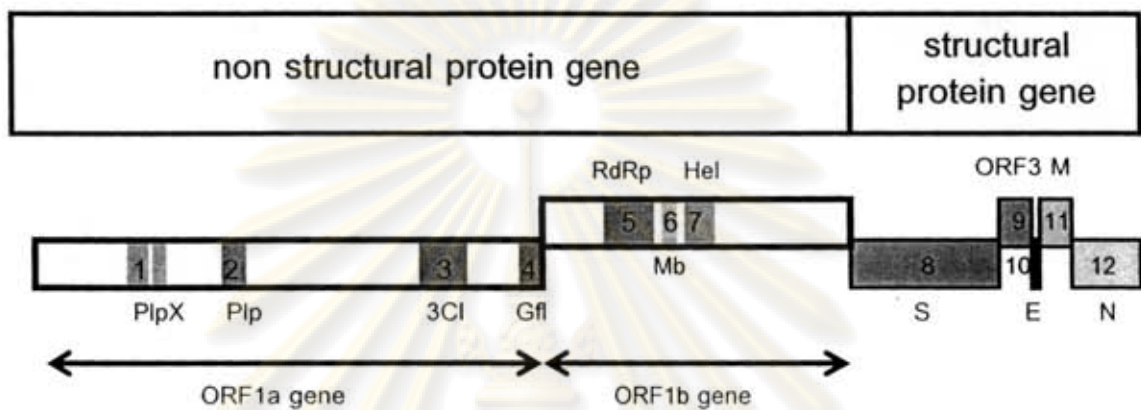
ในส่วนของ non-structural gene เป็น open reading frame 1ab (ORF1ab) gene สามารถแบ่งย่อยออกเป็น ORF1a gene และ ORF1b gene โดยที่ ORF1a gene อยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 297-12,605 ประกอบด้วย papain-like proteinase X domain (PlpX) gene, papain-like proteinase (Plp) gene, poliovirus 3C-like proteinase (3Cl) gene และ growth factor-like domain (Gfl) gene โดย PlpX gene, Plp gene และ 3Cl gene มีหน้าที่ผลิตโปรตีนที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรม (Sittidilokratna et al., 2008) ส่วน ORF1b gene อยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 12,605-20,638 ประกอบด้วย RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, metal ion-binding-domain (Mb) gene และ helicase (Hel) gene มีการรายงานที่ ORF1a gene มีความคงรูป (conserved) น้อยกว่า ORF1b gene โดย Kocherhans และคณะ (2001) พบว่า ORF1a gene ของเชื้อไวรัสพือดีมีลำดับเบสที่ตรงกับ ORF1a gene ของเชื้อไวรัส HCoV-E229 และเชื้อไวรัสที่จีซีเพียง 59.4% และ 52.1% ตามลำดับ ในขณะที่ ORF1b gene ของเชื้อไวรัสพือดีมีลำดับเบสที่ตรงกับ ORF1b gene ของเชื้อไวรัส HCoV-E229 และเชื้อไวรัสที่จีซีมากกว่า คือ 83.2% และ 80.3% ตามลำดับ

สายพันธุกรรมในส่วนปลายของเชื้อไวรัสพือดีเป็นส่วนของ structural protein gene ประกอบด้วย S gene อยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 20,638-24,789 เป็นรหัสพันธุกรรมของ S protein ซึ่งเชื้อไวรัสพือดีใช้ในขบวนการยึดเกาะเพื่อเข้าสู่เซลล์วิลไลของส่วนลำไส้ (Duarte and Laude, 1994) S protein จึงจัดเป็นแอนติเจนหลัก (major antigen) ของเชื้อไวรัสกลุ่มนี้ ต่อมาในช่วงลำดับเบสที่ 24,789-25,463 เป็นตำแหน่งของ ORF3 gene สามารถอาศัยสายพันธุกรรมส่วนนี้เพื่อจัดกลุ่มย่อยของเชื้อไวรัสกลุ่ม coronavirus นอกจากนี้มีการรายงานถึงความเกี่ยวข้องของ ORF3 gene กับความสามารถของเชื้อไวรัสพือดีในการทำให้สุกรติดเชื้อ (infectivity) และความสามารถในการก่อโรคในสุกรที่ติดเชื้อ (pathogenicity) (Woods, 2001; Song et al., 2003; Park et al., 2008) ส่วน envelope (E) gene อยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 25,444-25,674 เชื้อไวรัสพือดีใช้ในการสร้าง E protein ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็ก อยู่บนเปลือกหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส ลำดับเบสช่วง 25,682-26,362 เป็นส่วนของ M gene ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส (phylogenetic analysis) (Chen et al., 2008) มีหน้าที่สร้าง M protein ซึ่งอยู่ที่เปลือกหุ้มอนุภาคของไวรัส M protein มีลักษณะ triple-spanning transmembrane protein แบ่งออกเป็น 3 ส่วน

คือ ส่วนปลายด้าน NH₂-terminus ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนช่วงสั้นที่อยู่ด้านนอกของอนุภาคไวรัส ปลายโปรตีนส่วนที่สองพับซ้อนกัน 3 ชั้น อยู่ในเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส และส่วนสุดท้ายเป็นปลายด้าน COOH-terminus อยู่ภายในอนุภาคของเชื้อไวรัสพื้ติ (Utiger et al., 1995) M protein เป็นโปรตีนหลักของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสในช่วงที่มีการประกอบตัวของอนุภาค (assembly) และทำหน้าที่ร่วมกับ E protein ในการ budding ของเชื้อไวรัส M protein มีความคงตัวสูง และมีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน (Hofmann and Wyler, 1990) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการเหนี่ยวนำในการสร้างสารอินเตอร์เฟอรอน อัลฟา ซึ่งช่วยในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ จึงถือเป็นแอนติเจนที่ดีสำหรับใช้ในการวินิจฉัยโรค (Shenyang et al., 2007) สำหรับสุดท้าย คือ nucleocapsid (N) gene ซึ่งมีตำแหน่งลำดับเบสที่ 26,374-27,699 เป็นรหัสพันธุกรรมที่เชื้อไวรัสพื้ติใช้เป็นแม่แบบในการสร้าง N protein โปรตีนดังกล่าวจับกับสายพันธุกรรม RNA เป็นลักษณะ helical ribonucleoprotein core (Sturman et al., 1980) เพื่อเพิ่มความคงตัวของสายพันธุกรรม และมีส่วนช่วยในการประกอบอนุภาคของไวรัส (Vennemal et al., 1996)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



non structural protein gene

ORF1a gene

1. papain-like proteinase X domain gene
2. papain-like proteinase gene
3. poliovirus 3C-like proteinase gene
4. growth factor-like domain gene

ORF1b gene

5. RNA-dependent RNA polymerase gene
6. metal ion-binding-domain gene
7. helicase gene

structural protein gene

8. spike protein gene

9. open reading frame 3 gene

10. envelope protein gene

11. membrane protein gene

12. nucleocapsid protein gene

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ภาพที่ 2.1 แบบจำลองสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพื้ดมาตรฐานสายพันธุ์ CV777

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 จีโนมและยีนที่สำคัญของเชื้อไวรัสที่อิตาลี

ลำดับเบสที่	ชื่อยีน	ผลิตภัณฑ์จากยีน
297..626	PEDVgp1	putative leader protein (PL1-PRO cleavage)
2982..7847	PEDVgp1	putative coronavirus nsp1 <ul style="list-style-type: none"> ▪ papain-like proteinase 1 domain (PL1-PRO) ▪ papain-like proteinase 2 domain (PL2-PRO) ▪ predicted phosphoesterase (similar to the Appr-1'-p processing enzyme) ▪ putative metal- and membrane binding Y domain
9288..10193	PEDVgp1	putative coronavirus nsp2 (3CL-PRO)
10194..11033	PEDVgp1	putative coronavirus nsp3 (HD2) (hydrophobic domain)
11034..11282	PEDVgp1	putative coronavirus nsp4
11283..11867	PEDVgp1	putative coronavirus nsp5
11868..12191	PEDVgp1	putative coronavirus nsp6
12192..12596	PEDVgp1	putative coronavirus nsp7 (growth-factor-like protein)
12597..12605, 12605..15376	PEDVgp1	putative coronavirus nsp9 (RNA-dependent RNA polymerase (RdRp))
15377..17167	PEDVgp1	putative coronavirus nsp10 (metal-binding (MB) domain, NTPase/helicase (NTPase/HEL) domain)
17168..18718	PEDVgp1	putative coronavirus nsp11
18719..19735	PEDVgp1	putative coronavirus nsp12
19736..20638	PEDVgp1	putative coronavirus nsp13
20638..24789	PEDVgp2	spike protein
24789..25463	PEDVgp3	hypothetical protein (ORF3)
25444..25674	PEDVgp4	envelope protein
25682..26362	PEDVgp5	membrane protein
26374..27699	PEDVgp6	nucleocapsid protein

ดัดแปลงจาก GenBank accession number NC_003436

การศึกษาการโคลนยีนที่สำคัญของเชื้อไวรัสพือดีและการประยุกต์ใช้

ปัจจุบันมีการใช้ recombination technique เพื่อศึกษาทางอณูชีวโมเลกุลหลายด้าน เช่น การศึกษาลำดับเบสของยีนต่างๆ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบสของยีนด้วยวิธี phylogenetic analysis การศึกษาโครงสร้างโปรตีน การวิเคราะห์การทำงานของโปรตีน และการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein interaction) การผลิตแอนติบอดี เป็นต้น สำหรับการผลิตโปรตีนจาก recombination technique โดยการโคลนยีนมีหลายระบบ ซึ่งมีข้อเด่น-ข้อด้อยแตกต่างกัน แสดงดังภาพที่ 2.2

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับยีน โดยการผลิตโปรตีนผ่านระบบแบคทีเรีย มีข้อเด่นเรื่องความสามารถในการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการ และการผลิต recombinant protein ได้ในปริมาณสูง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเพาะเลี้ยงง่าย และมีการเพิ่มจำนวนที่รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการผลิต recombinant protein ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับระบบอื่น สามารถนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้เพื่อระบุเชื้อ (identification) ศึกษาในในด้าน gene mapping และการศึกษาลำดับเบส (Frengen et al., 1999; Al-Hasani et al., 2003) อีกทั้ง recombinant protein ที่ผลิตได้ยังสามารถนำไปใช้ศึกษาการทำงานของโปรตีนและปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Yuan et al., 2006; Amin et al., 2007; Nakasako et al., 2008) และใช้ในการผลิตแอนติบอดี เช่นเดียวกับการผลิต recombinant protein ผ่านระบบยีสต์ ในขณะที่การผลิต recombinant protein ผ่านระบบเซลล์แมลง และระบบเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะมีความยุ่งยากในเรื่องของการปรับสภาพเซลล์เพาะเลี้ยงให้เหมาะสม และมีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการผลิต recombinant protein ผ่านระบบแบคทีเรีย และระบบยีสต์ อย่างไรก็ตาม recombinant protein ที่ผลิตขึ้นโดยผ่านระบบเซลล์แมลง และระบบเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีโครงสร้าง และรูปร่างที่ซับซ้อนมากกว่าโปรตีนที่ผลิตผ่านระบบแบคทีเรีย และระบบยีสต์ เนื่องจากในการผลิตโปรตีนของระบบเซลล์แมลง และระบบเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีการ post-translational modifications ต่างๆ เช่น glycosylation phosphorylation รวมทั้งยังมีความสามารถในการม้วนพับสายโปรตีน (protein folding) (Dukkipati et al., 2008) นอกจากนี้โปรตีนที่ผลิตโดยผ่านระบบเซลล์แมลงยังอาจปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ ซึ่งทำให้ง่ายต่อการแยกโปรตีนที่ต้องการ ในขณะที่ระบบแบคทีเรียจะผลิตโปรตีนและเก็บอยู่ภายในเซลล์ จึงนิยมผลิต recombinant protein ผ่านระบบเซลล์แมลง และระบบเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้าง การทำงานของโปรตีน และใช้ในการผลิตแอนติบอดี นอกจากนี้ยังมีระบบการผลิต recombinant protein อื่นๆ ที่สามารถเลือกใช้ได้ตามความแตกต่างของวัตถุประสงค์ในการนำโปรตีนไปใช้งาน เช่น การผลิต recombinant protein ผ่านระบบเซลล์พืช เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัคซีนที่นำเข้าสู่ร่างกายสัตว์โดยการกิน เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิดเยื่อเมือก เป็นต้น (Bae

et al., 2003; Kang et al., 2006) ซึ่งวัคซีนที่นำเข้าสู่ร่างกายสัตว์โดยการกินนี้ มีประโยชน์ในด้านช่วยลดต้นทุนค่าวัสดุการแพทย์ และไม่ทำให้สัตว์เครียด จึงน่าจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี ที่ผ่านมามีการศึกษาทางด้านอนุชีวโมเลกุลในเชิงวิเคราะห์ลำดับเบส และโปรตีนที่สำคัญ อีกทั้งมีการโคลนยีนเพื่อเพิ่มจำนวนโปรตีนที่ต้องการเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านชีวโมเลกุลต่างๆ ของเชื้อไวรัสพีอีดีดังแสดงในตารางที่ 2.3

สำหรับการศึกษาทางอนุชีวโมเลกุลของ S protein โดยการใช้ recombination technique เพื่อศึกษาในด้านต่างๆ เช่น การศึกษาลำดับเบส (Yeo et al., 2003; Kang et al., 2005^b) ศึกษาโครงสร้างของโปรตีน (Cruz et al., 2006) ศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับเบสของยีนชนิดเดียวกันจากเชื้อไวรัสชนิดอื่นด้วยเทคนิค phylogenetic analysis (Park et al., 2007) การพัฒนารีคอมบิแนนท์วัคซีนสำหรับป้องกันโรคติดเชื้อไวรัส โดยผลิตส่วน neutralizing epitope ที่เรียกว่า COE ของ S protein ผ่านเซลล์พืชชนิด *Nicotiana tabacum* หรือใบยาสูบ (tobacco) (Bae et al., 2003; Kang et al., 2004) ซึ่งต่อมา มีการพัฒนาระบบการผลิตโปรตีนโดยใช้ใบยาสูบให้มีประสิทธิภาพในการผลิต recombinant S protein ที่มีปริมาณมากขึ้น (Kang et al., 2005^a) และเมื่อมีการศึกษาถึงชนิดของภูมิคุ้มกันที่เหมาะสมในการป้องกันการติดเชื้อมากขึ้น จึงเริ่มมีการประยุกต์ใช้ B subunit heat-labile enterotoxin (LBT) ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อใช้เป็นสื่อในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดเยื่อเมือก (mucosal immunity) ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสพีอีดี โดยการแทรกยีนที่ควบคุมการสร้าง LBT พร้อมกับยีนที่ควบคุมการสร้าง S-COE เข้าไปยัง vector และผลิต recombinant S protein โดยผ่านเซลล์พืช (Kang et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีการปรับระบบการผลิตโปรตีนโดยใช้เซลล์มันฝรั่งเพื่อผลิต S-COE และใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA (Kim et al., 2005)

ส่วน N protein มีการวิจัยค้นคว้าเพื่อศึกษาลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีน (Bridgen et al., 1993; Junwei et al., 2006) และศึกษาโครงสร้างของโปรตีนที่ผลิตจากการใช้ recombination technique (Lee and Yeo, 2003) มีการผลิต recombinant N protein สำหรับใช้ในชุดตรวจสอบการสัมผัสเชื้อด้วยวิธี ELISA (Hou et al., 2007^a) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตอบสนองของร่างกายต่อแอนติเจนที่เป็น recombinant S protein และ recombinant N protein โดยใช้วิธี ELISA พบว่าสามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีนทั้งสองได้ตั้งแต่ 2 สัปดาห์หลังการสัมผัสเชื้อ โดยแอนติบอดีต่อ recombinant S protein สามารถคงอยู่ในกระแสเลือดได้ยาวนานกว่าแอนติบอดีต่อ recombinant N protein (Knuchel et al., 1992) นอกจากนี้มีการศึกษาโดยใช้ recombinant N protein ในการพัฒนารีคอมบิแนนท์วัคซีนโดยใช้ระบบ surface antigen display system โดยระบบนี้เป็นการติดต่อสารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างโปรตีนส่วน

poly- γ -glutamate synthetase A protein (pgsA) ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เชื่อมเข้ากับสารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้าง N protein ใน pHEC1LB vector แล้วนำ plasmid เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ 525 และเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว เพื่อผลิตวัคซีน ซึ่งนำมาใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสพืชิตีโดยนำเข้าสู่ร่างกายสัตว์ โดยการกินเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ 525 จากการศึกษาของ Hou และคณะ (2007^b) พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตขึ้นได้มีคุณสมบัติในการทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และมีการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันแบบทั่วทั้งร่างกาย (systemic immune response) และภูมิคุ้มกันชนิดเยื่อเมือก (mucosal immune system) อย่างไรก็ตาม พบว่าภูมิคุ้มกันดังกล่าวยังไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (Hou et al., 2007^b)

โปรตีนอีกชนิดที่มีการนำมาศึกษาคุณลักษณะต่างๆ เพื่อใช้งานโดยการอาศัย recombination technique คือ M protein ซึ่งที่ผ่านมามีการศึกษาลักษณะทางอนุชีวโมเลกุลของ M protein สายพันธุ์ต่างๆ ที่เกิดการระบาดในสุกร (Utiger et al., 1995; Jinghui and Yijing, 2005; Chen et al., 2008) และมีการพัฒนา recombinant M protein ขึ้นเพื่อผลิตแอนติเจนสำหรับชุดตรวจสอบ ELISA โดยใช้เฉพาะ M protein ส่วนที่อยู่ด้านนอกของอนุภาคไวรัส (Shenyang et al., 2007)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



- ความเร็ว.....plant << mammalian << yeast << bacteria
- ค่าใช้จ่าย.....bacteria << yeast << plant << mammalian
- glycosylation.....bacteria << yeast << plant << mammalian
- folding.....bacteria << yeast << plant << mammalian

ภาพที่ 2.2 แผนภาพแสดงคุณสมบัติของระบบที่ใช้ในการผลิต recombinant protein

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 ยีนที่นำมาศึกษาทางอณูชีวโมเลกุลด้วยระบบการโคลนยีนต่างๆ และการนำมาประยุกต์ใช้

ยีน	ระบบ	วัตถุประสงค์	ที่มา
nucleocapsid	แบคทีเรีย	sequence analysis	Bridgen et al., 1993
membrane	เซลล์แมลง	identification	Utiger et al., 1995
nucleocapsid	แบคทีเรีย	sequence and structural analysis	Lee and Yeo, 2003
spike	แบคทีเรีย	sequence analysis	Yeo et al., 2003
spike	พืช	vaccine	Bae et al., 2003
S-COE	พืช	vaccine	Kang et al., 2004
S-COE	พืช	sequence analysis and develop vaccine	Kang et al., 2005 ^b
S-COE	พืช	vaccine	Kang et al., 2005 ^a
S-COE	พืช	vaccine	Kim et al., 2005
membrane	แบคทีเรีย	sequence analysis	Jinghui and Yijing, 2005
nucleocapsid	แบคทีเรีย	sequence analysis	Junwei et al., 2006
S-COE	แบคทีเรีย	structural analysis	Cruz et al., 2006
S-COE	พืช	vaccine	Kang et al., 2006
spike	แบคทีเรีย	phylogenetic analysis	Park et al., 2007
nucleocapsid	แบคทีเรีย	ELISA	Hou et al., 2007 ^a
nucleocapsid	แบคทีเรีย	vaccine	Hou et al., 2007 ^b
exterior	แบคทีเรีย	ELISA	Shenyang et al., 2007
membrane	แบคทีเรีย	molecular characterization and phylogenetic analysis	Chen et al., 2008
ORF3	แบคทีเรีย	Pathogenicity	Park et al., 2008

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การออกแบบ PEDV-M primers

เตรียม forward primer และ reverse primer สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วนที่ควบคุมการสร้าง M protein ทั้งหมด (full length PEDV-M gene) เพื่อใช้ในการศึกษาการโคลนยีน และการศึกษาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene โดยผู้วิจัยได้ออกแบบ PEDV-M primers ซึ่งอ้างอิงมาจากลำดับสารพันธุกรรมส่วน membrane protein gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ M_NIAH100542_08 (GenBank accession number EU542418) ที่เคยมีรายงานจากประเทศไทย และสายพันธุ์ Chinju99 (GenBank accession number DQ845249) ที่เคยรายงานจากประเทศเกาหลีใต้

PEDV-M-F: 5' ATG TCT AAC GGT TCT ATT CCC GTT 3' (T_m 61.2°C)

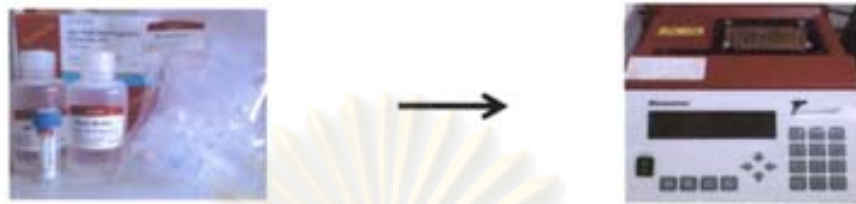
PEDV-M-R: 5' TTA GAC TAA ATG AAG CAC TTT 3' (T_m 52.8°C)

ตัวอย่างลำไส้ลูกสุกร

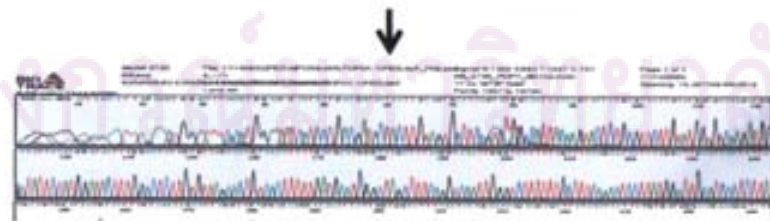
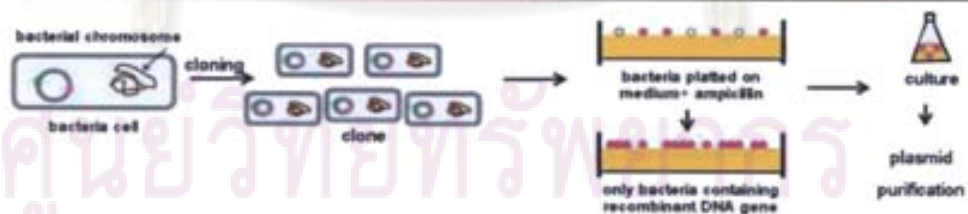
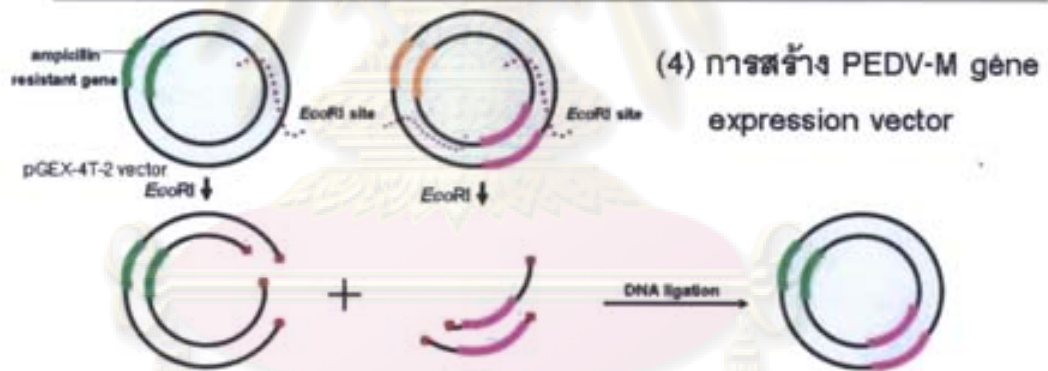
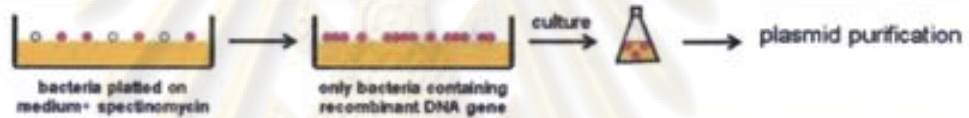
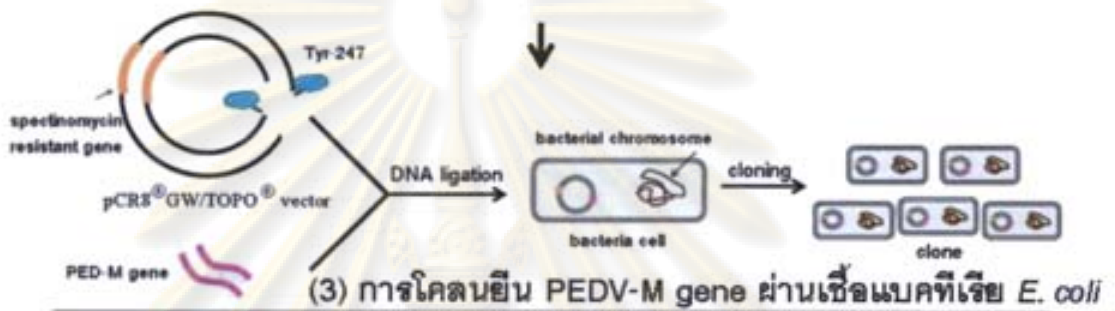
รับตัวอย่างซากลูกสุกรอายุ 1-3 วัน จำนวน 10 ตัว จากฝูงสุกรที่มีประวัติอาการป่วยสอดคล้องกับอาการป่วยด้วยเชื้อไวรัสพีอีดีจากสัตว์บาลประจำฟาร์ม โดยได้รับความยินยอมจากเจ้าของฟาร์ม ฟาร์มสุกรที่ส่งตัวอย่างตั้งอยู่ในจังหวัดราชบุรี ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีการรายงานพบโรคพีอีดี ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 (กรมปศุสัตว์, 2551¹⁾) ตัวอย่างลำไส้ดังกล่าวต้องมาจากลูกสุกรที่มีสภาพร่างกายผอม เหง้าน้ำ แสดงอาการท้องร่วง และ/หรืออาเจียน และตัวอย่างลำไส้ต้องได้มาจากลูกสุกรที่เสียชีวิตเองในฟาร์มภายใน 2 ชั่วโมง และขนส่งตัวอย่างภายใต้อุณหภูมิ 4°C

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็น 4 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การเก็บตัวอย่างลำไส้ลูกสุกร และสกัด total RNA ออกจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ (2) การเพิ่มจำนวน PEDV-M gene โดยวิธี RT-PCR (3) การโคลนยีน PEDV-M gene ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (4) การสร้าง PEDV-M gene expression vector และ (5) การศึกษาและวิเคราะห์ลำดับเบสของ PEDV-M gene ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี RT-PCR และลำดับเบสส่วน PEDV-M gene จาก recombinant plasmids ต่างๆ ที่ศึกษา แสดงดังภาพที่ 3.1



(1) การเก็บตัวอย่าง และสกัด total RNA (2) การเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ด้วยวิธี RT-PCR



(5) การศึกษาและวิเคราะห์ลำดับเบส

ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อไวรัสพีอีดี

ระบุตำแหน่งที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างจากซากลูกสุกร คือ ลำไส้เล็กทั้งหมดที่พบว่าผนังลำไส้บาง โป่งพองด้วยแก๊ส และมีของเหลวสีเหลืองในลำไส้ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีเชื้อไวรัสปริมาณมาก ล้างทำความสะอาดลำไส้ด้วย PBS ตัดและปั่นชิ้นเนื้อตัวอย่างบริเวณนั้นใน PBS ให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น เก็บรักษาตัวอย่างลำไส้ปั่นที่ได้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C

2. การสกัด total RNA จากตัวอย่าง

สกัดแยก total RNA จากตัวอย่างลำไส้ปั่น และเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 จากวัคซีน โดยอาศัยชุดสกัด RNA สำเร็จรูป Total RNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan) โดยการบด และย่อยตัวอย่างเนื้อเยื่อลำไส้ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใสมาตกตะกอน RNA ด้วย 70% ethanol และกรองผ่าน RNA binding column ล้าง RNA ที่แยกได้จาก column ด้วย elution buffer เก็บตัวอย่าง total RNA ที่สกัดได้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C

3. การสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี reverse-transcription (RT)

นำ total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างลำไส้ปั่น และเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 จากวัคซีน มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยชุดสำเร็จรูป SuperScript™ III First-Strand (Invitrogen, USA) ด้วยวิธี RT เริ่มจากผสม total RNA 5 μl เข้ากับ RT mixture1 ได้เป็น RT mixture2 โดย RT mixture1 ประกอบด้วย 50 μM Oligo (dT), 10 mM dNTP mix และเติม DEPC-treated water จนได้ปริมาตรสุทธิ 10 μl อุณหภูมิละลายทั้งหมดที่อุณหภูมิ 65°C 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาในน้ำแข็ง เตรียม RT mixture3 ซึ่งประกอบด้วย 2X RT buffer, 6.5 mM MgCl_2 , 0.2 M DTT, RNase OUT™ 1 μl และ Superscript™ III RT 1 μl แล้วผสม RT mixture2 เข้ากับ RT mixture3 ได้เป็น RT mixture4 แล้วจึงอุ่น RT mixture4 อีกครั้งที่อุณหภูมิ 50°C 50 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 5 นาที ใส่ RNase H 1 μl แล้วบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที การสังเคราะห์ cDNA จึงเสร็จสมบูรณ์ และเก็บรักษา cDNA ที่สังเคราะห์ได้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C

4. การเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

4.1. เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากตัวอย่างลำไส้ของลูกสุกร และเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 จากวัคซีน ปริมาตร 5 μl ผสมเข้ากับ PCR mixture ปริมาตร 45 μl ซึ่งประกอบด้วย 2X *Pfu* DNA polymerase buffer, 7.5 mM MgCl_2 , 400 μM dNTPs, 300 nmole PEDV-M primers (PEDV-M-F และ PEDV-M-R), 1 U

Pfu DNA polymerase (Invitrogen, USA) และ DW จนได้ปริมาตรสุทธิ 45 μ l เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยมีสภาวะการทำ PCR ดังนี้

preheating	95°C	5 นาที	1 รอบ
denature	95°C	2 นาที	} 35 รอบ
annealing	58°C	2 นาที	
extension	72°C	2 นาที	
last extension	72°C	5 นาที	1 รอบ

4.2. ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene จากวิธี RT-PCR ใน 2% agarose gel electrophoresis และ ethidium bromide ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบโดยการมองผ่าน UV transilluminator และเปรียบเทียบตำแหน่งแถบสารพันธุกรรมของ RT-PCR product จากตัวอย่างกับตำแหน่งแถบสารพันธุกรรมของ PEDV-M gene ที่เพิ่มจำนวนได้จากเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 ในวัคซีน ซึ่งเป็นตัวควบคุม

4.3. สกัดแยก PEDV-M gene ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี RT-PCR ให้บริสุทธิ์โดยการตัด RT-PCR product ในตำแหน่งที่ปรากฏแถบของสารพันธุกรรมบนแผ่น agarose gel ที่ตำแหน่งประมาณ 681 bp และสกัดแยก RT-PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดเจลสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) โดยการละลาย agarose gel ที่ตัดออกมาแล้วใน QG buffer ปริมาตรเป็น 3 เท่าของน้ำหนักของ agarose gel ที่อุณหภูมิ 50°C ใน heat box ที่อุ่นเครื่องไว้เรียบร้อยแล้ว เพื่อให้ agarose gel ละลาย และ RT-PCR product ออกมาอยู่ใน buffer ตกตะกอน RT-PCR product ด้วย isopropanol ปริมาตรเป็น 1 เท่าของน้ำหนักเจล ใส่สารละลายทั้งหมดลงใน spin column และกรองสารละลายอื่นออกด้วยการปั่นด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที ล้าง column ด้วย PE buffer 750 μ l แล้วปั่นเพื่อให้ column แห้ง เป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วสูงสุด สุดท้ายใส่ EB buffer หรือ DW ปริมาตร 30 μ l เพื่อ elute RT-PCR product ออกจาก column โดยทิ้งไว้ 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ column ซับ elution buffer แล้วปั่นสารละลายทั้งหมดออกจาก column ที่ความเร็วสูงสุด 1 นาที ได้ purified RT-PCR product

4.4. ยืนยันผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene จาก RT-PCR technique และการสกัด PEDV-M gene ออกจากเจลให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดเจลสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) โดยการส่ง purified RT-PCR product ตรวจหาลำดับเบสที่บริษัท First

BASE Laboratories (Singapore) และเก็บ purified RT-PCR product ของ PEDV-M gene ที่เพิ่มจำนวนได้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ศึกษาการโคลนยีนต่อไป

5. การโคลนยีนส่วน PEDV-M gene ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

5.1. นำ PEDV-M gene ซึ่งได้จาก purified RT-PCR product ที่ผ่านการตรวจหาลำดับเบสและยืนยันแน่ชัดแล้วว่าเป็น PEDV-M gene เข้า pCR[®]8/GW/TOPO[®] vector โดยใช้ชุดโคลนนิ่งสำเร็จรูป pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning Kit (Invitrogen, USA) ด้วยวิธี ligation ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที และ transform เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell (Invitrogen, USA) ใน centrifuge tube ด้วยวิธี chemical transformation ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที แล้วแช่ centrifuge tube บนน้ำแข็งทันที

5.2. เพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell (Invitrogen, USA) ที่ผ่านขบวนการ transformation แล้วใน SOC medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในชุดโคลนนิ่งสำเร็จรูป โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ในอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึง spread เชื้อลงบน Luria-Bertani (LB agar) ที่มียาปฏิชีวนะชนิด spectinomycin dihydrochloride (Sigma-Aldrich[®], USA) ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็น selective media เพาะบ่มเชื้อแบคทีเรียในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยเรียกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้งหมดที่สามารถเจริญได้ใน selective media นี้ว่า library

5.3. ตรวจสอบ transformant ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมี pCR[®]8PEDV-M recombinant plasmid ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell ด้วยวิธี PCR โดยสุ่มเลือกเชื้อแบคทีเรียโคลนนี้เดี่ยวจาก library เพื่อผสมลงใน PCR mixture และเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ PEDV-M gene ภายใต้สภาวะการทำ PCR ดังที่แสดงข้างต้น

5.4. ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวน PEDV M gene ใน pCR[®]8PEDV-M recombinant plasmid ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบผลภายใต้ UV transilluminator และเก็บ transformant ที่ให้ผลบวกต่อ PCR เป็น stock ของ transformant ใน 1.5% glycerol ที่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C

5.5. เพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell ที่ประสบความสำเร็จในขบวนการ transformation จำนวน 1 clone ใน LB broth ปริมาตร 100 ml โดยใส่ยาปฏิชีวนะชนิด spectinomycin dihydrochloride (Sigma-

Aldrich[®], USA) ความเข้มข้น 100 µg/ml เพาะบ่มเชื้อแบคทีเรียในตู้บ่มชนิด shaking incubator โดยเซย่าที่ความเร็ว 250 rpm ในอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

5.6. สกัด recombinant plasmid ด้วยชุดสกัด plasmid สำเร็จรูป Quick Plasmid Midiprep Kit (Qiagen, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยปั่นตกตะกอนเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรีย และใส่ resuspension buffer เพื่อละลายตะกอน ย่อยเปลือกของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วย lysis buffer ในปริมาณที่เท่ากับ resuspension buffer เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นสมบูรณ์แล้ว ซึ่งปรากฏสารละลายที่มีลักษณะใส จึงใส่ neutralizing buffer ในปริมาณที่เท่ากันเพื่อหยุดปฏิกิริยา และปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็ว 10,000 rpm นำเฉพาะส่วนใสที่ได้มารองผ่าน QIAGEN-Tip 100 ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย QBT buffer เรียบร้อยแล้ว ล้างด้วย QC buffer 2 ครั้ง แล้วจึง elute ด้วย QF buffer นำ elution ที่ได้มาตกตะกอนด้วย isopropanol โดยใส่ปริมาณเป็น 0.7 เท่าของ elution ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็ว 15,000 rpm และละลายตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol หลังจากปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็ว 15,000 rpm แล้ว จึงละลายตะกอนด้วย UPDW ด้วย vertical shaking สุดท้าย spin down สารละลาย และเก็บรักษา pCR[®] 8PEDV-M recombinant plasmid ที่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 °C

5.7. ตัด pCR[®] 8PEDV-M recombinant plasmid ที่สกัดได้ด้วย *EcoRI* restriction enzyme (Promega, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยผสมสารละลายซึ่งประกอบด้วย restriction enzyme 10X buffer 2 µl, acetylated bovine serum albumin 2 µg, recombinant plasmid 1 µg, *EcoRI* restriction enzyme 5 U และ DW จนได้ปริมาตรสุทธิ 20 µl แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

5.8. ตรวจสอบผลการตัด PEDV-M gene ออกจาก pCR[®] 8/GW/TOPO[®] vector ด้วย *EcoRI* ใน 2% agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ และตรวจดูผลภายใต้ UV transilluminator

5.9. สกัด PEDV-M gene ที่ปลายทั้งสองข้างมีตำแหน่งของ *EcoRI* ออกจากแผ่น agarose gel ด้วยชุดสกัดเจลสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

5.10. ส่งตรวจหาลำดับเบสของ PEDV-M gene บริสุทธิ์ที่ปลายทั้งสองข้างมีตำแหน่งของ *EcoRI* ที่สกัดได้ เพื่อยืนยันผลการโคลน PEDV-M gene ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell ที่บริษัท First BASE Laboratories

(Singapore) และเก็บ PEDV-M gene บริสุทธิ์ที่ปลายทั้งสองข้างมีตำแหน่งของ *EcoRI* ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C เพื่อใช้ในการโคลนยีนเข้าสู่ expression vector ต่อไป

6. การสร้าง PEDV-M gene expression vector ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

6.1 ย้าย PEDV-M gene ที่ปลายทั้งสองข้างมีตำแหน่งของ *EcoRI* เข้าสู่ pGEX-4T-2 (Pharmacia, USA) expression vector ที่ตัดด้วย *EcoRI* restriction enzyme แล้วเชื่อมกันเชื่อมต่อกับ PEDV-M gene กับ pGEX-4T-2 vector ด้วย Ligase 10X buffer 1 μl , PEDV-M gene ที่ปลายทั้งสองข้างมีตำแหน่งของ *EcoRI* ปริมาณ 17 ng, T4 DNA ligase 3 U, pGEX-4T-2 vector (Pharmacia, USA) ที่ตัดด้วย *EcoRI* restriction enzyme แล้ว 2 μl และ DW จนได้ปริมาตรสุทธิ 10 μl แล้วจึง transform pGEX-4T-2PEDV-M recombinant vector เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี chemical transformation ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที

6.2 เพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียใน SOC medium ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C ภายใต้การเขย่าด้วยความเร็ว 220 rpm จึง spread เชื้อแบคทีเรียเพื่อเพาะบ่มลงบน LB agar ที่มียาปฏิชีวนะชนิด ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็น selective media

6.3 ยืนยัน PEDV-M gene ใน pGEX-4T-2PEDV-M recombinant plasmid ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 โดยวิธี PCR โดยเลือกเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวจาก library ผสมกับ PCR mixture และเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ภายใต้สภาวะการทำ PCR ดังที่แสดงข้างต้น

6.4 ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ใน 2% agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ และตรวจดูผลภายใต้ UV transilluminator เพื่อคัดเลือก transformant และเก็บเชื้อแบคทีเรียที่โคลนสำเร็จเป็น transformant stock ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ใน 1.5% glycerol ที่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C

6.5 เพิ่มจำนวน transformant ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ทั้งหมดที่โคลนสำเร็จ โดยการเพาะบ่มเชื้อใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะชนิด ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C ภายใต้การเขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

6.6 สกัด pGEX-4T-2PEDV-M recombinant plasmid ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Quick Plasmid Midiprep Kit (Qiagen, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

6.7 ยืนยันผลการโคลนยีนส่วน PEDV-M gene เข้าสู่ pGEX-4T-2PEDV-M recombinant plasmid ที่เพิ่มจำนวนผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 โดยส่งตรวจหาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่บริษัท First BASE Laboratories (Singapore)

7. การศึกษาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551

ศึกษาข้อมูลลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี RT-PCR โดยมี RNA จากลูกสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพีอีดีในฟาร์มสุกร จังหวัดราชบุรี เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 และลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่เตรียมจากการเพิ่มจำนวน recombinant plasmids ต่างๆ ที่ศึกษา ซึ่งได้รับผลจากการตรวจหาลำดับเบสที่บริษัท First BASE Laboratories (Singapore) โดยวิเคราะห์ลำดับเบส PEDV-M gene ดังกล่าวเปรียบเทียบกับข้อมูลของ PEDV-M gene จากเชื้อไวรัสพีอีดีจำนวน 23 สายพันธุ์ ที่มีการรายงานใน GenBank ได้แก่ สายพันธุ์ของประเทศไทยจำนวน 7 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ต่างประเทศจำนวน 16 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากประเทศจีนจำนวน 10 สายพันธุ์ สายพันธุ์จากประเทศเกาหลีใต้จำนวน 3 สายพันธุ์ สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์มาตรฐาน CV777 จำนวน 2 สายพันธุ์ แสดงดังในตารางที่ 3.1 ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.0.9. (Hall, 1999) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Version 4.1 (Beta) (Tamura et al., 2007)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพีอีดีที่นำลำดับเบสส่วน PEDV-M gene มาใช้ร่วมในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี phylogenetic tree analysis

ชื่อย่อ	สายพันธุ์	ประเทศ	ปีที่รายงาน	GenBank accession number
Th/1	M_NIAH1795_04	ไทย (ราชบุรี)	2008 ³	EU542415
Th/2	M_NIAH100541	ไทย (ราชบุรี)	2008 ³	EU542416
Th/3	M_NIAH116099_07	ไทย (ราชบุรี)	2008 ³	EU542417
Th/4	M_NIAH100542_08	ไทย (ราชบุรี)	2008 ³	EU542418
Th/5	M_NIAH116913_07	ไทย (นครปฐม)	2008 ³	EU542419
Th/6	M_NIAH2013_95	ไทย (ราชบุรี)	2008 ³	EU581711
Th/7	M_NIAH380_98	ไทย	2008 ³	EU581712
Ch/1	JS-2004-2	จีน	2004 ⁴	AY653205
Ch/2	LJB/03	จีน	2003 ⁴	AY608890
Ch/3	LZC	จีน	2007 ³	EF185992
Ch/4	DX	จีน	2007 ³	EU031893
Ch/5	CH/IMB/06	จีน	2006 ⁴	EU033962
Ch/6	CH/HNCH/06	จีน	2006 ⁴	EU033963
Ch/7	CH/HLJH/06	จีน	2006 ⁴	EU033964
Ch/8	CH/IMT/06	จีน	2006 ⁴	EU033965
Ch/9	CH/SHH/06	จีน	2006 ⁴	EU033966
Ch/10	CH/JSX/06	จีน	2006 ⁴	EU033967
Ko/1	KPEDV-9F ¹	เกาหลีใต้	1997 ³	AF019893
Ko/2	KPEDV-9 ²	เกาหลีใต้	2000 ³	AF015888
Ko/3	Chinju99	เกาหลีใต้	2007 ³	DQ845249
Ja/1	JMe2	ญี่ปุ่น	2007 ³	D89752
CV/1	CV777	เบลเยียม	2001 ³	AF353511
CV/2	CV777	-	2008 ³	NC_003436

¹ The field virus

² The live virus vaccine

³ ปีที่รายงานใน GenBank

⁴ ปีที่แยกสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ด้วยวิธี RT-PCR

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสกัด total RNA การสังเคราะห์ cDNA และการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งเตรียมจากตัวอย่างลำไส้ลูกสุกรในจังหวัดราชบุรี เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 โดยมีเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 จากเวียดนามเป็นตัวควบคุมบวก โดยเมื่อวิเคราะห์ผลจากตัวอย่างลำไส้ลูกสุกรที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัสพีอีดีจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ได้รับจากจังหวัดราชบุรี เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ตรวจพบ PEDV-M gene โดยวิธี RT-PCR จำนวน 9 ตัวอย่าง คือ CU/VET/MED/001PEDV-M gene ถึง CU/VET/MED/009PEDV-M gene แสดงดังภาพที่ 4.1 โดยมีลำดับเบสของ PEDV-M gene ประมาณ 681 bp ซึ่งคาดว่าเท่ากับลำดับเบสที่เพิ่มจำนวนได้จากเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 จากเวียดนาม สำหรับผลการตรวจหาลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene แสดงดังตารางที่ 4.1



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.1 ผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene จากตัวอย่างลำไส้ลูกสุกร จังหวัดราชบุรี ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ด้วยวิธี RT-PCR และตรวจสอบใน 2% agarose gel electrophoresis

Lane M	คือ	100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada)
Lane 1	คือ	PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสที่ชื่อมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 ที่เตรียมจากวัคซีน (ผลบวกควบคุม)
Lane 2	คือ	ผลลบควบคุม (DW)
Lane 3	คือ	PEDV-M gene จากตัวอย่างลำไส้ลูกสุกรที่ให้ผลลบ
Lane 4-12	คือ	PEDV-M gene จากตัวอย่างลำไส้ลูกสุกรที่ให้ผลบวก (CU/VET/MED/001PEDV-M gene ถึง CU/VET/MED/009PEDV-M gene)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

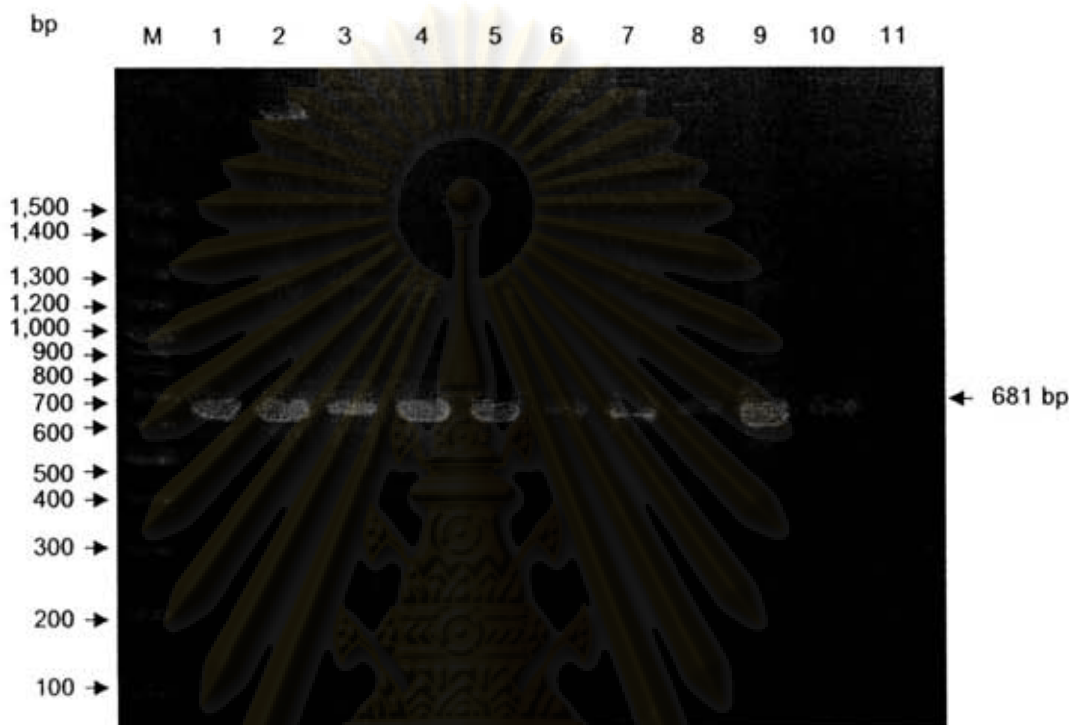
2. ผลการโคลนยีนส่วน PEDV-M gene ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

เมื่อเพาะบ่มเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell ที่ผ่านขบวนการ ligation และ transformation เรียบร้อยแล้ว ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะชนิด spectinomycin dihydrochloride ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 37°C พบว่า เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตใน selective media และเมื่อสุ่มตรวจเชื้อแบคทีเรียโคลนเดี่ยวใน library จำนวน 10 clones เพื่อคัด transformants ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ใน pCR[®] 8CU/VET/MED/PEDV-M recombinant plasmid ด้วยวิธี PCR โดยใช้ PCR mixture และสภาวะการทำ PCR สำหรับเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมใน 2% agarose gel electrophoresis พบว่า ให้ผลบวกต่อการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene ที่ขนาดประมาณ 681 bp ทั้งหมดจำนวน 10 clones คือ ได้ pCR[®] 8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pCR[®] 8CU/VET/MED/010PEDV-M recombinant plasmid ดังแสดงในภาพที่ 4.2

เมื่อเพิ่มจำนวน pCR[®] 8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ผ่านเชื้อแบคทีเรียโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อลงใน LB broth ปริมาตร 100 ml ที่มียาปฏิชีวนะชนิด spectinomycin dihydrochloride ความเข้มข้น 100 µg/ml ภายใต้อุณหภูมิ 37°C ซึ่งเขย่าด้วยความเร็ว 220 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สกัด pCR[®] 8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid และตัด recombinant plasmid ดังกล่าวด้วย *EcoRI* restriction enzyme ได้ pCR[®] 8CU/VET/MED/001 PEDV-M gene ที่ปลายทั้งสองข้างมีตำแหน่งของ *EcoRI* ซึ่งมีขนาดประมาณ 703 bp เมื่อตรวจสอบใน 2% agarose gel electrophoresis แสดงดังภาพที่ 4.3

จากการสกัดแยก pCR[®] 8CU/VET/MED/001PEDV-M gene ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ และส่งตรวจหาลำดับเบส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

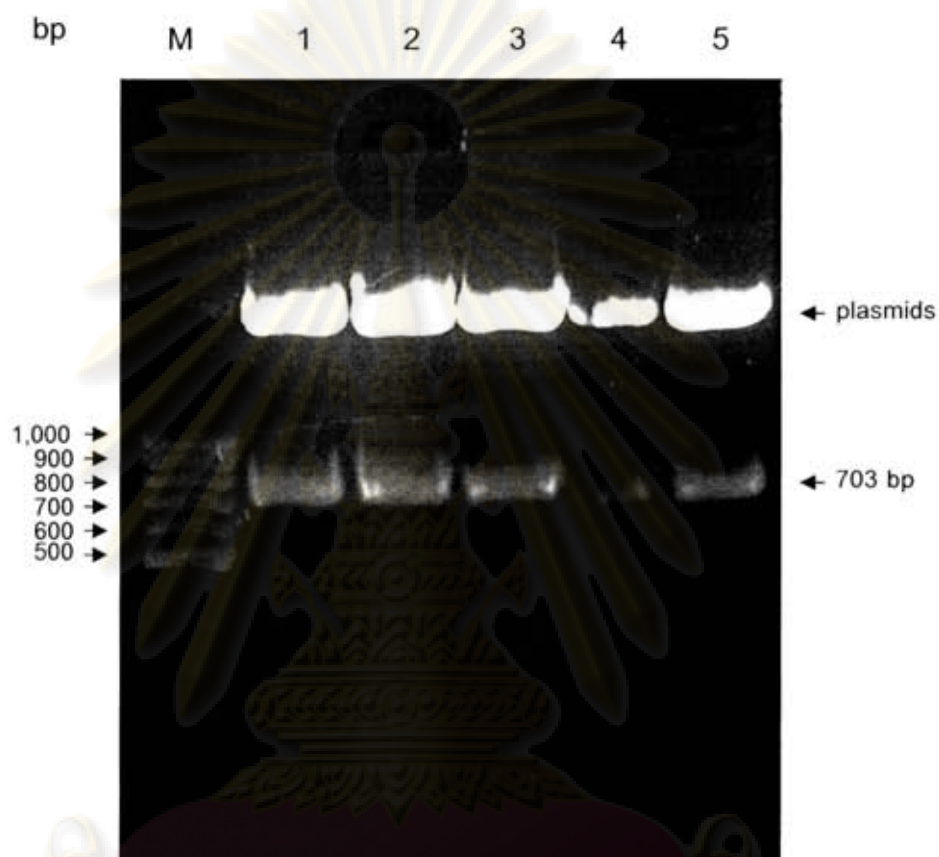


ภาพที่ 4.2 ผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ภายใน pCR[®] 8CU/VET/MED/PEDV-M recombinant plasmids ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell โดยการสุ่มตรวจเชื้อแบคทีเรียโคลนเดี่ยวที่ได้จากการโคลน PEDV-M gene จำนวน 10 clones ด้วยวิธี PCR และตรวจสอบใน 2% agarose gel electrophoresis

Lane M คือ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Canada)

Lane 1-10 คือ PEDV-M gene ภายใน pCR[®] 8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pCR[®] 8CU/VET/MED/010 PEDV-M recombinant plasmid ที่ให้ผลบวกจำนวน 10 clones ขนาดประมาณ 681 bp

Lane 11 คือ ผลลบควบคุม (pCR[®] 8/GW/TOPO[®] vector)



ภาพที่ 4.3 ผลการตัด PEDV-M gene ออกจาก pCR[®]8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ด้วย *EcoRI* restriction enzyme และตรวจสอบผลใน 2% agarose gel electrophoresis

Lane M คือ 100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada)

Lane 1-5 คือ pCR[®]8CU/VET/MED/001PEDV-M gene ที่ถูกตัดด้วย *EcoRI* restriction enzyme ขนาดประมาณ 703 bp

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการสร้าง PEDV-M gene expression vector ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ผ่านการ ligation และ transformation สามารถเจริญเติบโตได้ใน LB agar ที่มียาปฏิชีวนะชนิด ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml ซึ่งเป็น selective media เมื่อเพาะบ่มในอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากการส่องตรวจเชื้อแบคทีเรียโคลนนี้เดี่ยวใน library จำนวน 10 clones เพื่อคัด transformant ของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี PCR โดยใช้ PCR mixture และสภาวะการทำ PCR สำหรับเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ใน pGEX-4T-2CU/VET/MED/PEDV-M recombinant plasmid และตรวจสอบผลใน 2% agarose gel electrophoresis พบว่า ประสบความสำเร็จในการสร้าง PEDV-M gene expression vector ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยได้ผลบวกจากการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ใน pGEX-4T-2CU/VET/MED/PEDV-M recombinant plasmid ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี PCR ที่ขนาดประมาณ 681 bp จำนวน 6 clones ดังแสดงในภาพที่ 4.4 คือได้ pGEX-4T-2CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pGEX-4T-2CU/VET/MED/006PEDV-M recombinant plasmid

ผลการตรวจหาลำดับเบสของ recombinant plasmids ทั้งหมดจำนวน 6 clones คือ pGEX-4T-2CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pGEX-4T-2CU/VET/MED/006PEDV-M recombinant plasmid ที่เพิ่มจำนวนผ่านเชื้อแบคทีเรีย ใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะชนิด ampicillin ความเข้มข้น 100 µl/ml แสดงดังตารางที่ 4.1



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.4 ผลการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ภายใน pGEX-4T-2CU/VET/MED/PEDV-M recombinant plasmids ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 โดยการส่องตรวจเชื้อแบคทีเรียโคลนเดี่ยวที่ได้จากการโคลน PEDV-M gene จำนวน 10 clones ด้วยวิธี PCR และตรวจสอบผลใน 2% agarose gel electrophoresis

Lane M	คือ	100 bp DNA ladder (Fermentas, Canada)
Lane 4-8 และ 10	คือ	PEDV-M gene ที่ให้ผลบวกภายใน pGEX-4T-2CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pGEX-4T-2CU/VET/MED/006PEDV-M recombinant plasmid จำนวน 6 clones มีขนาดประมาณ 681 bp
Lane 1-3 และ 9	คือ	PEDV-M gene ที่ให้ผลลบภายใน pGEX-4T-2CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid
Lane 11	คือ	ผลลบควบคุม (pGEX-4T-2 vector)

ตารางที่ 4.1 ลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่ได้จากตัวอย่าง และ recombinant plasmids ต่างๆ ที่ศึกษา

CU/VET/MED/001 PEDV-M gene	<p>ATGTCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAAA CTGGAATTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTC AGTATGGCCATTACAAGTACTCTGCGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCT ATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTAGCACTGTCACCTTTTTGATGCA TGGGCTAGCTTTCAGGTCAATTGGGTCTTTTTTGGCTTTCAGCATCCTTAT GGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATTG GGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTCAATCCTGAAACAGA CGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCAGTG CTTGGAGCACCAACTGGTGTAAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGC TTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC TAATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGT GTTGGTCGTTCAAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGT CCGGTCCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTTCGGT TCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA</p>
pCR [®] 8CU/VET/MED/ 001PEDV-M gene	<p>ATGTCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAAA CTGGAATTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTC AGTATGGCCATTACAAGTACTCTGCGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCT ATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTAGCACTGTCACCTTTTTGATGCA TGGGCTAGCTTTCAGGTCAATTGGGTCTTTTTTGGCTTTCAGCATCCTTAT GGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATTG GGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTCAATCCTGAAACAGA CGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCAGTG CTTGGAGCACCAACTGGTGTAAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGC TTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC TAATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGT GTTGGTCGTTCAAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGT CCGGTCCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTTCGGT TCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA</p>

pGEX-4T-2	ATGTCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAAA
CU/VET/MED/	CTGGAATTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTC
001PEDV-M	AGTATGGCCATTACAAGTACTCTGCGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCT
recombinant plasmid	ATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTAGCACTGTCACITTTTGTATGCA TGGGCTAGCTTTTCAGGTCAATTGGGTCTTTTTTGGCTTTCAGCATCCTTAT GGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATTCC GGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTTCAATCCTGAAACAGA CGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCAGTG CTTGGAGCACCAACTGGTGTAAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGC TTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC TAATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGT GTTGGTCGTTTCAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGT CCGGTCCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTTCGGT TCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA
pGEX-4T-2	ATGTCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAAA
CU/VET/MED/	CTGGAATTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTC
002PEDV-M	AGTATGGCCATTACAAGTACTCTGCGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCT
recombinant plasmid	ATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTAGCACTGTCACITTTTGTATGCA TGGGCTAGCTTTTCAGGTCAATTGGGTCTTTTTTGGCTTTCAGCATCCTTAT GGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATTCC GGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTTCAATCCTGAAACAGA CGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCAGTG CTTGGAGCACCAACTGGTGTAAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGC TTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC TAATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGT GTTGGTCGTTTCAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGT CCGGTCCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTTCGGT TCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA

pGEX-4T-2	ATGTCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAAA
CU/VET/MED/	CTGGAATTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTC
003PEDV-M	AGTATGGCCATTACAAGTACTCTGCGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCT
recombinant plasmid	ATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTAGCACTGTCACCTTTTGTATGCA TGGGCTAGCTTTCAGGTCAATTGGGTCTTTTTTGTCTTCAGCATCCTTAT GGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATT GGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTCAATCCTGAAACAGA CGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCAGTG CTTGGAGCACCAACTGGTGTAAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGC TTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC TAATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGT GTTGGTCGTTCAAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGT CCGGTCCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTTCGGT TCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA

pGEX-4T-2	ATGTCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAAA
CU/VET/MED/	CTGGAATTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTC
004PEDV-M	AGTATGGCCATTACAAGTACTCTGCGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCT
recombinant plasmid	ATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTAGCACTGTCACCTTTTGTATGCA TGGGCTAGCTTTCAGGTCAATTGGGTCTTTTTTGTCTTCAGCATCCTTAT GGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATT GGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTCAATCCTGAAACAGA CGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCAGTG CTTGGAGCACCAACTGGTGTAAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGC TTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC TAATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGT GTTGGTCGTTCAAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGT CCGGTCCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTTCGGT TCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA

pGEX-4T-2	ATGTCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAAA
CU/VET/MED/	CTGGAATTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTC
005PEDV-M	AGTATGGCCATTACAAGTACTCTGCGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCT
recombinant plasmid	ATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTAGCACTGTCACCTTTTTGATGCA TGGGCTAGCTTTCAGGTCAATTGGGTCTTTTTTGCTTTCAGCATCCTTAT GGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATTG GGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTTCAATCCTGAAACAGA CGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCAGTG CTTGGAGCACCAACTGGTGTAAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGC TTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC TAATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGT GTTGGTCGTTCAAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGT CCGGTCCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTTCGGT TCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA

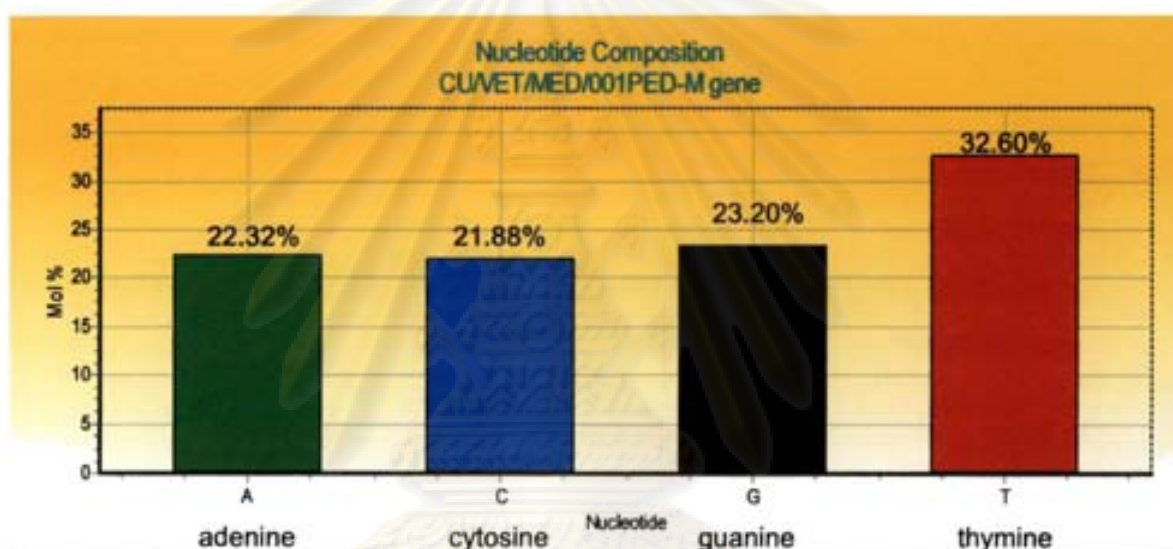
pGEX-4T-2	ATGTCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAAA
CU/VET/MED/	CTGGAATTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTC
006PEDV-M	AGTATGGCCATTACAAGTACTCTGCGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCT
recombinant plasmid	ATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTAGCACTGTCACCTTTTTGATGCA TGGGCTAGCTTTCAGGTCAATTGGGTCTTTTTTGCTTTCAGCATCCTTAT GGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATTG GGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTTCAATCCTGAAACAGA CGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCAGTG CTTGGAGCACCAACTGGTGTAAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGC TTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC TAATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGT GTTGGTCGTTCAAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGT CCGGTCCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTTCGGT TCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA

4. ผลการศึกษาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพืดิสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพืดิสายพันธุ์ที่แยกได้จากลำไส้ของลูกสุกร ในฟาร์มสุกรที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ของจังหวัดราชบุรี เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.0.9. (Hall, 1999) พบว่า มีสัดส่วนของ guanine (G) และ cytosine (C) หรือ G-C content 45.08% และสัดส่วนของ adenine (A) และ thymine (T) หรือ A-T content 54.92% ซึ่งประกอบด้วย adenine 152 ตัว (22.32%) cytosine 149 ตัว (21.88%) guanine 158 ตัว (23.20%) และ thymine 222 ตัว (32.60%) แสดงดังภาพที่ 4.5 และเมื่อวิเคราะห์ deduced amino acids จากลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene พบว่ามี deduced amino acids ที่เป็นองค์ประกอบหลักของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene คือ leucine 28 ตัว (12.33%), valine 27 ตัว (11.89%), serine 21 ตัว (9.25%), threonine 18 ตัว (7.93%), alanine 15 ตัว (6.61%) และ glycine 14 ตัว (6.17%) ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.6 และตารางที่ 4.2

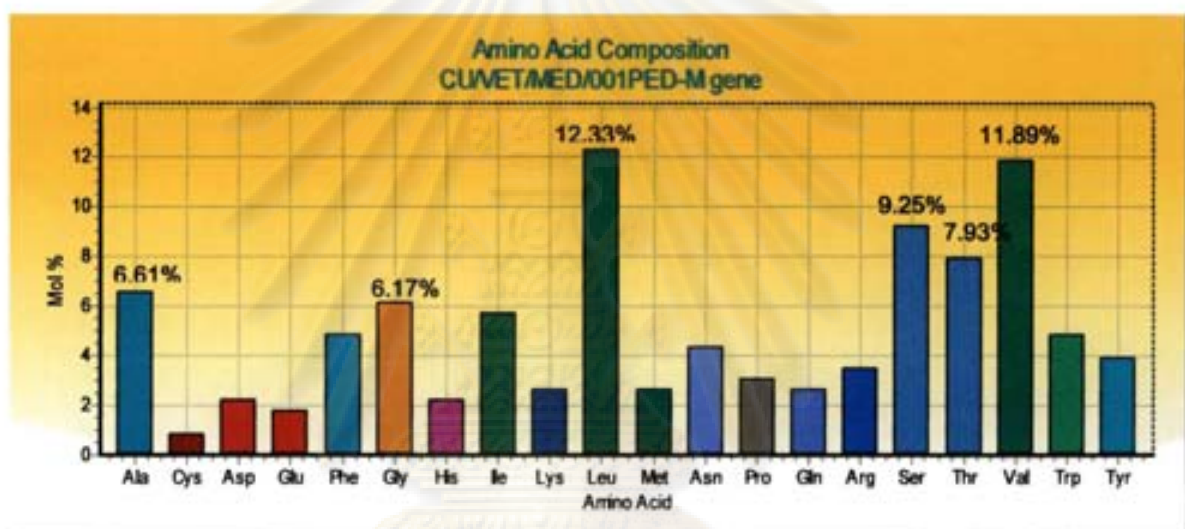


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.5 สัดส่วนของ nucleotides ที่เป็นองค์ประกอบใน CUVET/MED/001PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสที่อิตาลีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551 ประกอบด้วย adenine 152 ตัว (22.32%) cytosine 149 ตัว (21.88%) guanine 158 ตัว (23.20%) และ thymine 222 ตัว (32.60%)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.6 สัดส่วนของ deduced amino acids จากลำดับเบสของ CUVET/MED/001PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพิดีคัสลายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551 โดยมี deduced amino acids 6 ตัวแรกที่มีปริมาณมากที่สุดของ CUVET/MED/001PEDV-M gene คือ leucine 28 ตัว (12.33%), valine 27 ตัว (11.89%), serine 21 ตัว (9.25%), threonine 18 ตัว (7.93%), alanine 15 ตัว (6.61%) และ glycine 14 ตัว (6.17%) ตามลำดับ

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 สัดส่วนของ deduced amino acids จากลำดับเบสของ CUVET/MED/001 PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2551

กรดอะมิโน	ชื่อย่อ	จำนวน (ตัว)	สัดส่วน (%)
alanine	(Ala, A)	15	6.61
arginine	(Arg, R)	8	3.528
asparagine	(Asn, N)	10	4.41
aspartate	(Asp, D)	5	2.20
cysteine	(Cys, C)	2	0.88
glutamate	(Glu, E)	4	1.76
glutamine	(Gln, Q)	6	2.64
glycine	(Gly, G)	14	6.17
histidine	(His, H)	5	2.20
isoleucine	(Ile, I)	13	5.73
leucine	(Leu, L)	28	12.33
lysine	(Lys, K)	6	2.64
methionine	(Met, M)	6	2.64
phenylalanine	(Phe, F)	11	4.85
proline	(Pro, P)	7	3.08
serine	(Ser, S)	21	9.25
threonine	(Thr, T)	18	7.93
tryptophan	(Trp, W)	11	4.85
tyrosine	(Tyr, Y)	9	3.96
valine	(Val, V)	27	11.89

* deduced amino acids 6 ตัวหลัก จากลำดับเบสของ CUVET/MED/001PEDV-M gene

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001 PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของ pCR[®]8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid และลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของ pGEX-4T-2CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pGEX-4T-2CU/VET/MED/006PEDV-M recombinant plasmid ซึ่งได้เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell จำนวน 1 clone และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 จำนวน 6 clones ตามลำดับ พบว่ามีลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ตรงกันตลอดทั้ง 681 bp (100%) แสดงดังภาพที่ 4.7

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพื้อดีสายพันธุ์อื่นที่มีการรายงานใน GenBank ได้แก่ เชื้อไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ที่แยกจากประเทศไทย ประเทศจีน ประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น และเชื้อไวรัสพื้อดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 พบว่า มีลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่ใกล้เคียงกัน แสดงดังตารางที่ 4.4 โดยเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่แยกได้จากประเทศไทย ซึ่งรายงานใน GenBank เมื่อปี พ.ศ. 2551 พบว่า เชื้อไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ M_NIAH1795_04, M_NIAH100541, M_NIAH116099_07, M_NIAH100542_08, M_NIAH116913_07, M_NIAH2013_95 และ M_NIAH380_98 มีร้อยละของความเหมือนกับลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene คือ 96.769%, 100.000%, 100.000%, 99.853%, 100.000%, 96.916% และ 96.623% ตามลำดับ และเมื่อได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศจีนคือ เชื้อไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ JS-2004-2, LJB/03, LZC, DX, CH/IMB/06, CH/HNCH/06, CH/HLJH/06, CH/IMT/06, CH/SHH/06 และ CH/JSX/06 ซึ่งพบว่า มีลำดับเบสที่ตรงกันเท่ากับ 99.119%, 97.651%, 97.210%, 98.532%, 98.238%, 98.238%, 98.678%, 97.944%, 98.238% และ 98.238% ตามลำดับ สำหรับการเปรียบเทียบกับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ที่แยกจากประเทศเกาหลีใต้ พบว่า เชื้อไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ KPEDV-9F, KPEDV-9 และ Chinju99 มีลำดับเบสที่ตรงกัน 97.504%, 97.944% และ 97.944% ตามลำดับ ส่วนการเปรียบเทียบลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ JMe2 ที่แยกจากประเทศญี่ปุ่น พบว่า มีความเหมือนกันของลำดับเบสเท่ากับ 98.385% และสุดท้ายคือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพื้อดีสายพันธุ์ CV777 ที่รายงานในปี ค.ศ. 2001 และ 2008 (หรือ พ.ศ. 2544 และพ.ศ. 2551) พบว่ามีความเหมือนกัน 98.238% และ 98.238% ตามลำดับ


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10      20      30      40      50
CU/VET/MED/001PEDV-M g ATGTCTAACG GTTCTATTCC CGTTGATGAG GTGATTCAAC ACCTTAGAAA
pCR8CU001PEDV-M g ATGTCTAACG GTTCTATTCC CGTTGATGAG GTGATTCAAC ACCTTAGAAA
pGEXCU001PEDV-M p ATGTCTAACG GTTCTATTCC CGTTGATGAG GTGATTCAAC ACCTTAGAAA
pGEXCU002PEDV-M p ATGTCTAACG GTTCTATTCC CGTTGATGAG GTGATTCAAC ACCTTAGAAA
pGEXCU003PEDV-M p ATGTCTAACG GTTCTATTCC CGTTGATGAG GTGATTCAAC ACCTTAGAAA
pGEXCU004PEDV-M p ATGTCTAACG GTTCTATTCC CGTTGATGAG GTGATTCAAC ACCTTAGAAA
pGEXCU005PEDV-M p ATGTCTAACG GTTCTATTCC CGTTGATGAG GTGATTCAAC ACCTTAGAAA
pGEXCU006PEDV-M p ATGTCTAACG GTTCTATTCC CGTTGATGAG GTGATTCAAC ACCTTAGAAA
*****

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60      70      80      90     100
CU/VET/MED/001PEDV-M g CTGGAATTTC ACATGGAATA TCATACTGAC GATACTACTT GTAGTGCTTC
pCR8CU001PEDV-M g CTGGAATTTC ACATGGAATA TCATACTGAC GATACTACTT GTAGTGCTTC
pGEXCU001PEDV-M p CTGGAATTTC ACATGGAATA TCATACTGAC GATACTACTT GTAGTGCTTC
pGEXCU002PEDV-M p CTGGAATTTC ACATGGAATA TCATACTGAC GATACTACTT GTAGTGCTTC
pGEXCU003PEDV-M p CTGGAATTTC ACATGGAATA TCATACTGAC GATACTACTT GTAGTGCTTC
pGEXCU004PEDV-M p CTGGAATTTC ACATGGAATA TCATACTGAC GATACTACTT GTAGTGCTTC
pGEXCU005PEDV-M p CTGGAATTTC ACATGGAATA TCATACTGAC GATACTACTT GTAGTGCTTC
pGEXCU006PEDV-M p CTGGAATTTC ACATGGAATA TCATACTGAC GATACTACTT GTAGTGCTTC
*****

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110     120     130     140     150
CU/VET/MED/001PEDV-M g AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
pCR8CU001PEDV-M g AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
pGEXCU001PEDV-M p AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
pGEXCU002PEDV-M p AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
pGEXCU003PEDV-M p AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
pGEXCU004PEDV-M p AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
pGEXCU005PEDV-M p AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
pGEXCU006PEDV-M p AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
*****

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160     170     180     190     200
CU/VET/MED/001PEDV-M g ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACGTGCAC TTTTGTATGC
pCR8CU001PEDV-M-g ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACGTGCAC TTTTGTATGC
pGEXCU001PEDV-M p ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACGTGCAC TTTTGTATGC
pGEXCU002PEDV-M p ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACGTGCAC TTTTGTATGC
pGEXCU003PEDV-M p ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACGTGCAC TTTTGTATGC
pGEXCU004PEDV-M p ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACGTGCAC TTTTGTATGC
pGEXCU005PEDV-M p ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACGTGCAC TTTTGTATGC
pGEXCU006PEDV-M p ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACGTGCAC TTTTGTATGC
*****

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210     220     230     240     250
CU/VET/MED/001PEDV-M g ATGGGCTAGC TTTCAGGTCA ATTGGGTCTT TTTTGCCTTC AGCATCCTTA
pCR8CU001PEDV-M g ATGGGCTAGC TTTCAGGTCA ATTGGGTCTT TTTTGCCTTC AGCATCCTTA
pGEXCU001PEDV-M p ATGGGCTAGC TTTCAGGTCA ATTGGGTCTT TTTTGCCTTC AGCATCCTTA
pGEXCU002PEDV-M p ATGGGCTAGC TTTCAGGTCA ATTGGGTCTT TTTTGCCTTC AGCATCCTTA
pGEXCU003PEDV-M p ATGGGCTAGC TTTCAGGTCA ATTGGGTCTT TTTTGCCTTC AGCATCCTTA
pGEXCU004PEDV-M p ATGGGCTAGC TTTCAGGTCA ATTGGGTCTT TTTTGCCTTC AGCATCCTTA
pGEXCU005PEDV-M p ATGGGCTAGC TTTCAGGTCA ATTGGGTCTT TTTTGCCTTC AGCATCCTTA
pGEXCU006PEDV-M p ATGGGCTAGC TTTCAGGTCA ATTGGGTCTT TTTTGCCTTC AGCATCCTTA
*****

```


	260 270 280 290 300
CU/VET/MED/001PEDV-M g	TGGCTTGCAT CACTCTTATG CTGTGGATAA TGTACTTTGT CAATAGCATT
pCR8CU001PEDV-M g	TGGCTTGCAT CACTCTTATG CTGTGGATAA TGTACTTTGT CAATAGCATT
pGEXCU001PEDV-M p	TGGCTTGCAT CACTCTTATG CTGTGGATAA TGTACTTTGT CAATAGCATT
pGEXCU002PEDV-M p	TGGCTTGCAT CACTCTTATG CTGTGGATAA TGTACTTTGT CAATAGCATT
pGEXCU003PEDV-M p	TGGCTTGCAT CACTCTTATG CTGTGGATAA TGTACTTTGT CAATAGCATT
pGEXCU004PEDV-M p	TGGCTTGCAT CACTCTTATG CTGTGGATAA TGTACTTTGT CAATAGCATT
pGEXCU005PEDV-M p	TGGCTTGCAT CACTCTTATG CTGTGGATAA TGTACTTTGT CAATAGCATT
pGEXCU006PEDV-M p	TGGCTTGCAT CACTCTTATG CTGTGGATAA TGTACTTTGT CAATAGCATT

	310 320 330 340 350
CU/VET/MED/001PEDV-M g	CGGTTGTGGC GCAGGACACA TTCTTGGTGG TCTTTCAATC CTGAAACAGA
pCR8CU001PEDV-M g	CGGTTGTGGC GCAGGACACA TTCTTGGTGG TCTTTCAATC CTGAAACAGA
pGEXCU001PEDV-M p	CGGTTGTGGC GCAGGACACA TTCTTGGTGG TCTTTCAATC CTGAAACAGA
pGEXCU002PEDV-M p	CGGTTGTGGC GCAGGACACA TTCTTGGTGG TCTTTCAATC CTGAAACAGA
pGEXCU003PEDV-M p	CGGTTGTGGC GCAGGACACA TTCTTGGTGG TCTTTCAATC CTGAAACAGA
pGEXCU004PEDV-M p	CGGTTGTGGC GCAGGACACA TTCTTGGTGG TCTTTCAATC CTGAAACAGA
pGEXCU005PEDV-M p	CGGTTGTGGC GCAGGACACA TTCTTGGTGG TCTTTCAATC CTGAAACAGA
pGEXCU006PEDV-M p	CGGTTGTGGC GCAGGACACA TTCTTGGTGG TCTTTCAATC CTGAAACAGA

	360 370 380 390 400
CU/VET/MED/001PEDV-M g	CGCGCTTCTC ACTACTTCTG TGATGGGCCG ACAGGTCTGC ATTCCAGTGC
pCR8CU001PEDV-M g	CGCGCTTCTC ACTACTTCTG TGATGGGCCG ACAGGTCTGC ATTCCAGTGC
pGEXCU001PEDV-M p	CGCGCTTCTC ACTACTTCTG TGATGGGCCG ACAGGTCTGC ATTCCAGTGC
pGEXCU002PEDV-M p	CGCGCTTCTC ACTACTTCTG TGATGGGCCG ACAGGTCTGC ATTCCAGTGC
pGEXCU003PEDV-M p	CGCGCTTCTC ACTACTTCTG TGATGGGCCG ACAGGTCTGC ATTCCAGTGC
pGEXCU004PEDV-M p	CGCGCTTCTC ACTACTTCTG TGATGGGCCG ACAGGTCTGC ATTCCAGTGC
pGEXCU005PEDV-M p	CGCGCTTCTC ACTACTTCTG TGATGGGCCG ACAGGTCTGC ATTCCAGTGC
pGEXCU006PEDV-M p	CGCGCTTCTC ACTACTTCTG TGATGGGCCG ACAGGTCTGC ATTCCAGTGC

	410 420 430 440 450
CU/VET/MED/001PEDV-M g	TTGGAGCACC AACTGGTGTA ACGCTAACAC TCCTTAGTGG TACATTGCTT
pCR8CU001PEDV-M g	TTGGAGCACC AACTGGTGTA ACGCTAACAC TCCTTAGTGG TACATTGCTT
pGEXCU001PEDV-M p	TTGGAGCACC AACTGGTGTA ACGCTAACAC TCCTTAGTGG TACATTGCTT
pGEXCU002PEDV-M p	TTGGAGCACC AACTGGTGTA ACGCTAACAC TCCTTAGTGG TACATTGCTT
pGEXCU003PEDV-M p	TTGGAGCACC AACTGGTGTA ACGCTAACAC TCCTTAGTGG TACATTGCTT
pGEXCU004PEDV-M p	TTGGAGCACC AACTGGTGTA ACGCTAACAC TCCTTAGTGG TACATTGCTT
pGEXCU005PEDV-M p	TTGGAGCACC AACTGGTGTA ACGCTAACAC TCCTTAGTGG TACATTGCTT
pGEXCU006PEDV-M p	TTGGAGCACC AACTGGTGTA ACGCTAACAC TCCTTAGTGG TACATTGCTT

	460 470 480 490 500
CU/VET/MED/001PEDV-M g	GTAGAGGGCT ATAAGGTTGC TACTGGCGTA CAGGTAAGTC AATTACCTAA
pCR8CU001PEDV-M g	GTAGAGGGCT ATAAGGTTGC TACTGGCGTA CAGGTAAGTC AATTACCTAA
pGEXCU001PEDV-M p	GTAGAGGGCT ATAAGGTTGC TACTGGCGTA CAGGTAAGTC AATTACCTAA
pGEXCU002PEDV-M p	GTAGAGGGCT ATAAGGTTGC TACTGGCGTA CAGGTAAGTC AATTACCTAA
pGEXCU003PEDV-M p	GTAGAGGGCT ATAAGGTTGC TACTGGCGTA CAGGTAAGTC AATTACCTAA
pGEXCU004PEDV-M p	GTAGAGGGCT ATAAGGTTGC TACTGGCGTA CAGGTAAGTC AATTACCTAA
pGEXCU005PEDV-M p	GTAGAGGGCT ATAAGGTTGC TACTGGCGTA CAGGTAAGTC AATTACCTAA
pGEXCU006PEDV-M p	GTAGAGGGCT ATAAGGTTGC TACTGGCGTA CAGGTAAGTC AATTACCTAA

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                    510      520      530      540      550
CU/VET/MED/001PEDV-M g   TTTCGTCACA GTCGCCAAGG CCACTACAAC AATTGTCTAC GGACGTGTTG
pCR8CU001PEDV-M g       TTTCGTCACA GTCGCCAAGG CCACTACAAC AATTGTCTAC GGACGTGTTG
pGEXCU001PEDV-M p       TTTCGTCACA GTCGCCAAGG CCACTACAAC AATTGTCTAC GGACGTGTTG
pGEXCU002PEDV-M p       TTTCGTCACA GTCGCCAAGG CCACTACAAC AATTGTCTAC GGACGTGTTG
pGEXCU003PEDV-M p       TTTCGTCACA GTCGCCAAGG CCACTACAAC AATTGTCTAC GGACGTGTTG
pGEXCU004PEDV-M p       TTTCGTCACA GTCGCCAAGG CCACTACAAC AATTGTCTAC GGACGTGTTG
pGEXCU005PEDV-M p       TTTCGTCACA GTCGCCAAGG CCACTACAAC AATTGTCTAC GGACGTGTTG
pGEXCU006PEDV-M p       TTTCGTCACA GTCGCCAAGG CCACTACAAC AATTGTCTAC GGACGTGTTG
*****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                    560      570      580      590      600
CU/VET/MED/001PEDV-M g   GTCGTTCACT CAATGCTTCA TCTGGCACTG GTTGGGCTTT CTATGTCCGG
pCR8CU001PEDV-M g       GTCGTTCACT CAATGCTTCA TCTGGCACTG GTTGGGCTTT CTATGTCCGG
pGEXCU001PEDV-M p       GTCGTTCACT CAATGCTTCA TCTGGCACTG GTTGGGCTTT CTATGTCCGG
pGEXCU002PEDV-M p       GTCGTTCACT CAATGCTTCA TCTGGCACTG GTTGGGCTTT CTATGTCCGG
pGEXCU003PEDV-M p       GTCGTTCACT CAATGCTTCA TCTGGCACTG GTTGGGCTTT CTATGTCCGG
pGEXCU004PEDV-M p       GTCGTTCACT CAATGCTTCA TCTGGCACTG GTTGGGCTTT CTATGTCCGG
pGEXCU005PEDV-M p       GTCGTTCACT CAATGCTTCA TCTGGCACTG GTTGGGCTTT CTATGTCCGG
pGEXCU006PEDV-M p       GTCGTTCACT CAATGCTTCA TCTGGCACTG GTTGGGCTTT CTATGTCCGG
*****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                    610      620      630      640      650
CU/VET/MED/001PEDV-M g   TCCAAACACG GCGACTACTC AGCTGTGAGT AATCCGAGTT CGGTTCCTAC
pCR8CU001PEDV-M g       TCCAAACACG GCGACTACTC AGCTGTGAGT AATCCGAGTT CGGTTCCTAC
pGEXCU001PEDV-M p       TCCAAACACG GCGACTACTC AGCTGTGAGT AATCCGAGTT CGGTTCCTAC
pGEXCU002PEDV-M p       TCCAAACACG GCGACTACTC AGCTGTGAGT AATCCGAGTT CGGTTCCTAC
pGEXCU003PEDV-M p       TCCAAACACG GCGACTACTC AGCTGTGAGT AATCCGAGTT CGGTTCCTAC
pGEXCU004PEDV-M p       TCCAAACACG GCGACTACTC AGCTGTGAGT AATCCGAGTT CGGTTCCTAC
pGEXCU005PEDV-M p       TCCAAACACG GCGACTACTC AGCTGTGAGT AATCCGAGTT CGGTTCCTAC
pGEXCU006PEDV-M p       TCCAAACACG GCGACTACTC AGCTGTGAGT AATCCGAGTT CGGTTCCTAC
*****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                    660      670      680
CU/VET/MED/001PEDV-M g   AGATAGTGAG AAAGTGCTTC ATTTAGTCTA A
pCR8CU001PEDV-M g       AGATAGTGAG AAAGTGCTTC ATTTAGTCTA A
pGEXCU001PEDV-M p       AGATAGTGAG AAAGTGCTTC ATTTAGTCTA A
pGEXCU002PEDV-M p       AGATAGTGAG AAAGTGCTTC ATTTAGTCTA A
pGEXCU003PEDV-M p       AGATAGTGAG AAAGTGCTTC ATTTAGTCTA A
pGEXCU004PEDV-M p       AGATAGTGAG AAAGTGCTTC ATTTAGTCTA A
pGEXCU005PEDV-M p       AGATAGTGAG AAAGTGCTTC ATTTAGTCTA A
pGEXCU006PEDV-M p       AGATAGTGAG AAAGTGCTTC ATTTAGTCTA A
*****

```

CU/VET/MED/001PEDV-M g, CU/VET/MED/001PEDV-M gene

pCR8CU001PEDV-M g, pCR[®]8CU/VET/MED/001PEDV-M gene ที่เตรียมจาก EcoRI cut

pGEXCU001PEDV-M p, pGEX-4T-2CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียโคลนที่ 1

pGEXCU002PEDV-M p, pGEX-4T-2CU/VET/MED/002PEDV-M recombinant plasmid ที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียโคลนที่ 2

pGEXCU003PEDV-M p, pGEX-4T-2CU/VET/MED/003PEDV-M recombinant plasmid ที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียโคลนที่ 3

pGEXCU004PEDV-M p, pGEX-4T-2CU/VET/MED/004PEDV-M recombinant plasmid ที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียโคลนที่ 4

pGEXCU005PEDV-M p, pGEX-4T-2CU/VET/MED/005PEDV-M recombinant plasmid ที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียโคลนที่ 5

pGEXCU006PEDV-M p, pGEX-4T-2CU/VET/MED/006PEDV-M recombinant plasmid ที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียโคลนที่ 6

ภาพที่ 4.7 เปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของ recombinant plasmids ต่างๆ ที่ศึกษา ซึ่งเตรียมจากการโคลน CU/VET/MED/001PEDV-M gene เข้าสู่ pCR[®]8/GW/TOPO[®] vector และ pGEX-4T-2 vector

ตารางที่ 4.3 แสดง identity ของลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ในประเทศไทย ประเทศจีน ประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น และสายพันธุ์มาตรฐาน CV777

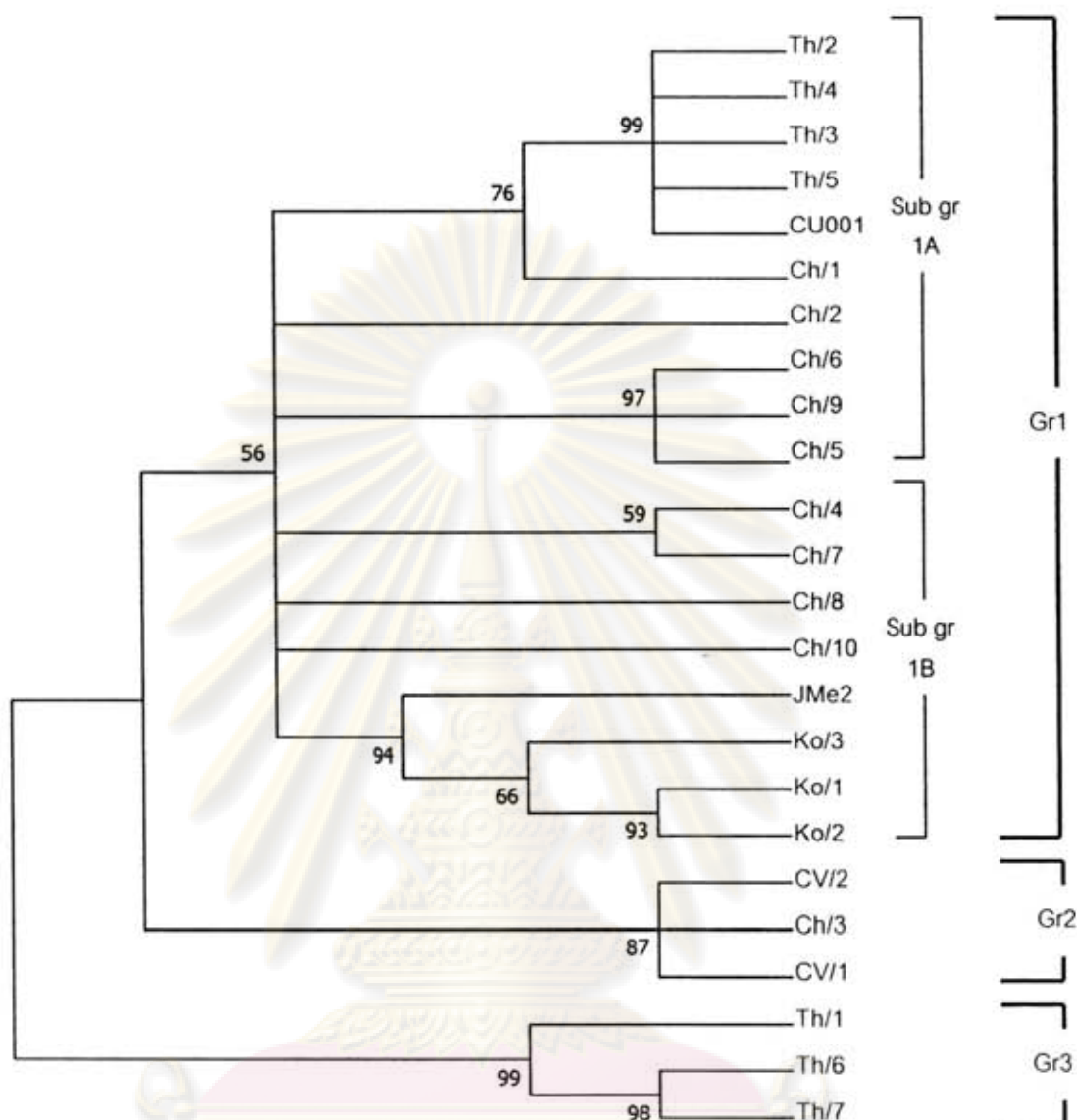
Seq->	CU001	Th/1	Th/2	Th/3	Th/4	Th/5	Th/6	Th/7	Ch/1	Ch/2	Ch/3	Ch/4	Ch/5	Ch/6	Ch/7	Ch/8	Ch/9	Ch/10	Ko/1	Ko/2	Ko/3	Ja/1	CV/1	CV/2
CU001		0.967	1.000	1.000	0.998	1.000	0.969	0.966	0.991	0.976	0.972	0.985	0.982	0.982	0.986	0.979	0.982	0.982	0.975	0.979	0.979	0.983	0.982	0.982
Th/1	0.967		0.967	0.967	0.966	0.967	0.986	0.983	0.970	0.964	0.969	0.970	0.970	0.970	0.972	0.973	0.970	0.976	0.966	0.970	0.970	0.975	0.979	0.979
Th/2	1.000	0.967		1.000	0.998	1.000	0.969	0.966	0.991	0.976	0.972	0.985	0.982	0.982	0.986	0.979	0.982	0.982	0.975	0.979	0.979	0.983	0.982	0.982
Th/3	1.000	0.967	1.000		0.998	1.000	0.969	0.966	0.991	0.976	0.972	0.985	0.982	0.982	0.986	0.979	0.982	0.982	0.975	0.979	0.979	0.983	0.982	0.982
Th/4	0.998	0.966	0.998	0.998		0.998	0.967	0.964	0.989	0.975	0.970	0.983	0.980	0.980	0.985	0.977	0.980	0.980	0.973	0.977	0.977	0.982	0.980	0.980
Th/5	1.000	0.967	1.000	1.000	0.998		0.969	0.966	0.991	0.976	0.972	0.985	0.982	0.982	0.986	0.979	0.982	0.982	0.975	0.979	0.979	0.983	0.982	0.982
Th/6	0.969	0.986	0.969	0.969	0.967	0.969		0.994	0.969	0.966	0.970	0.972	0.972	0.972	0.973	0.975	0.972	0.977	0.967	0.972	0.972	0.976	0.980	0.980
Th/7	0.966	0.983	0.966	0.966	0.964	0.966	0.994		0.966	0.960	0.967	0.969	0.969	0.969	0.970	0.972	0.969	0.975	0.964	0.969	0.969	0.973	0.977	0.977
Ch/1	0.991	0.970	0.991	0.991	0.989	0.991	0.969	0.966		0.976	0.975	0.988	0.985	0.985	0.989	0.985	0.985	0.988	0.975	0.979	0.979	0.983	0.985	0.985
Ch/2	0.976	0.964	0.976	0.976	0.975	0.976	0.966	0.960	0.976		0.969	0.973	0.976	0.976	0.972	0.973	0.976	0.976	0.969	0.973	0.973	0.977	0.979	0.979
Ch/3	0.972	0.969	0.972	0.972	0.970	0.972	0.970	0.967	0.975	0.969		0.977	0.977	0.977	0.979	0.980	0.977	0.983	0.973	0.977	0.977	0.982	0.989	0.989
Ch/4	0.985	0.970	0.985	0.985	0.983	0.985	0.972	0.969	0.988	0.973	0.977		0.991	0.991	0.995	0.988	0.991	0.994	0.980	0.985	0.985	0.989	0.988	0.988
Ch/5	0.982	0.970	0.982	0.982	0.980	0.982	0.972	0.969	0.985	0.976	0.977	0.991		1.000	0.989	0.988	1.000	0.994	0.977	0.982	0.982	0.986	0.988	0.988
Ch/6	0.982	0.970	0.982	0.982	0.980	0.982	0.972	0.969	0.985	0.976	0.977	0.991	1.000		0.989	0.988	1.000	0.994	0.977	0.982	0.982	0.986	0.988	0.988
Ch/7	0.986	0.972	0.986	0.986	0.985	0.986	0.973	0.970	0.989	0.972	0.979	0.995	0.989	0.989		0.989	0.989	0.995	0.979	0.983	0.983	0.988	0.989	0.989
Ch/8	0.979	0.973	0.979	0.979	0.977	0.979	0.975	0.972	0.985	0.973	0.980	0.988	0.988	0.988	0.989		0.988	0.994	0.977	0.982	0.982	0.986	0.991	0.991
Ch/9	0.982	0.970	0.982	0.982	0.980	0.982	0.972	0.969	0.985	0.976	0.977	0.991	1.000	1.000	0.989	0.988		0.994	0.977	0.982	0.982	0.986	0.988	0.988
Ch/10	0.982	0.976	0.982	0.982	0.980	0.982	0.977	0.975	0.988	0.976	0.983	0.994	0.994	0.994	0.995	0.994	0.994		0.980	0.985	0.985	0.989	0.994	0.994
Ko/1	0.975	0.966	0.975	0.975	0.973	0.975	0.967	0.964	0.975	0.969	0.973	0.980	0.977	0.977	0.979	0.977	0.977	0.980		0.989	0.983	0.988	0.983	0.983
Ko/2	0.979	0.970	0.979	0.979	0.977	0.979	0.972	0.969	0.979	0.973	0.977	0.985	0.982	0.982	0.983	0.982	0.982	0.985	0.989		0.988	0.992	0.988	0.988
Ko/3	0.979	0.970	0.979	0.979	0.977	0.979	0.972	0.969	0.979	0.973	0.977	0.985	0.982	0.982	0.983	0.982	0.982	0.985	0.983	0.988		0.992	0.988	0.988
Ja/1	0.983	0.975	0.983	0.983	0.982	0.983	0.976	0.973	0.983	0.977	0.982	0.989	0.986	0.986	0.988	0.986	0.986	0.989	0.988	0.992	0.992		0.992	0.992
CV/1	0.982	0.979	0.982	0.982	0.980	0.982	0.980	0.977	0.985	0.979	0.989	0.988	0.988	0.988	0.989	0.991	0.988	0.994	0.983	0.988	0.988	0.992		1.000
CV/2	0.982	0.979	0.982	0.982	0.980	0.982	0.980	0.977	0.985	0.979	0.989	0.988	0.988	0.988	0.989	0.991	0.988	0.994	0.983	0.988	0.988	0.992	1.000	

CU001, CU/VET/MED/001PEDV-M gene. Th/1, M_NIAH1795_04 (Thai, GenBank accession number EU542415). Th/2, M_NIAH100541 (Thai, GenBank accession number EU542416). Th/3, M_NIAH116099_07 (Thai, GenBank accession number EU542417). Th/4, M_NIAH100542_08 (Thai, GenBank accession number EU542418). Th/5, M_NIAH116913_07 (Thai, GenBank accession number EU542419). Th/6, M_NIAH2013_95 (Thai, GenBank accession number EU581711). Th/7, M_NIAH380_98 (Thai, GenBank accession number EU581712). Ch/1, JS-2004-2 (China, GenBank accession number AY653205). Ch/2, LJB/03 (China, GenBank accession number AY608890). Ch/3, LZC (China, GenBank accession number EF185992). Ch/4, DX (China, GenBank accession number EU031893). Ch/5, CH/IMB/06 (China, GenBank accession number EU033962). Ch/6, CH/HNCH/06 (China, GenBank accession number EU033963). Ch/7, CH/HLJH/06 (China, GenBank accession number EU033964). Ch/8, CH/IMT/06 (China, GenBank accession number EU033965). Ch/9, CH/SHH/06 (China, GenBank accession number EU033966). Ch/10, CH/JSX/06 (China, GenBank accession number EU033967). Ko/1, KPED-9F (Korea, GenBank accession number AF019893). Ko/2, KPED-9 (Korea, GenBank accession number AF015888). Ko/3, Chinju99 (Korea, GenBank accession number DQ845249). Ja/1, JMe2 (Japan, GenBank accession number D89752). CV/1, CV777 (Belgium, GenBank accession number AF353511). CV/2, CV777 (no report, GenBank accession number NC_003436).

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ PEDV-M gene ทั้งหมดจำนวน 24 สายพันธุ์ โดยอาศัยวิธี phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Version 4.1 (Beta) (Tamura et al., 2007) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อไวรัสพีอีดีจากความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ PEDV-M gene ได้ 3 กลุ่มดังภาพที่ 4.8

เชื้อไวรัสพีอีดีกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย เชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย ประเทศจีน ประเทศญี่ปุ่น และประเทศเกาหลีใต้ รวมเป็นจำนวน 18 สายพันธุ์คือ M_NIAH100541, M_NIAH100542, M_NIAH116099_07, M_NIAH116913_07, CU/VET/MED/001 PEDV-M gene, JS-2004-2, LJB/03, CH/HNCH/06, VH/SHH/06, CH/IMB/06, DX, CH/HLJH/06, CH/IMT/06, CH/JSX/06, JMe2, Chinju99, KPEDV-9F และ KPEDV-9 โดยสามารถแบ่งกลุ่มที่ 1 ออกได้ 2 กลุ่มย่อย คือ subgroup 1a ซึ่งประกอบด้วยเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ดังต่อไปนี้ คือ M_NIAH100541, M_NIAH100542, M_NIAH116099_07, M_NIAH116913_07, CU/VET/MED/001 PEDV-M gene, JS-2004-2, LJB/03, CH/HNCH/06, VH/SHH/06 และ CH/IMB/06 ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย และประเทศจีน ส่วน subgroup 1b ประกอบด้วยเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ DX, CH/HLJH/06, CH/IMT/06, CH/JSX/06, JMe2, Chinju99, KPEDV-9F และ KPEDV-9 สำหรับเชื้อไวรัสพีอีดีกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 และเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่มีการรายงานจากประเทศจีน คือ เชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 ที่รายงานจากประเทศเบลเยียม ในปีพ.ศ. 2544 และ พ.ศ. 2551 และเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ LZC จากประเทศจีน สำหรับกลุ่มสุดท้าย ประกอบด้วยเชื้อไวรัสพีอีดีจำนวน 3 สายพันธุ์ ซึ่งทั้งหมดมีการรายงานมาจากประเทศไทย คือ M_NIAH1795_04, M_NIAH2013_95 และ M_NIAH380_98

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



CU001, CU/VET/MED/001PEDV-M gene

Th1, M_NIAH1795_04 (Thai, GenBank accession number EU542415)
 Th2, M_NIAH100541 (Thai, GenBank accession number EU542416)
 Th3, M_NIAH116099_07 (Thai, GenBank accession number EU542417)
 Th4, M_NIAH100542_08 (Thai, GenBank accession number EU542418)
 Th5, M_NIAH116913_07 (Thai, GenBank accession number EU542419)
 Th6, M_NIAH2013_95 (Thai, GenBank accession number EU581711)
 Th7, M_NIAH380_98 (Thai, GenBank accession number EU581712)
 Ch1, JS-2004-2 (China, GenBank accession number AY653205)
 Ch2, LJB/03 (China, GenBank accession number AY608890)
 Ch3, LZC (China, GenBank accession number EF185992)
 Ch4, DX (China, GenBank accession number EU031893)

Ch5, CH/IMB/06 (China, GenBank accession number EU033962)

Ch6, CH/HNCH/06 (China, GenBank accession number EU033963)
 Ch7, CH/HLJH/06 (China, GenBank accession number EU033964)
 Ch8, CH/MT/06 (China, GenBank accession number EU033965)
 Ch9, CH/SHH/06 (China, GenBank accession number EU033966)
 Ch10, CH/JSX/06 (China, GenBank accession number EU033967)
 Ko/1, KPEDV-9F (Korea, GenBank accession number AF019893)
 Ko/2, KPEDV-9 (Korea, GenBank accession number AF015888)
 Ko/3, Chinju99 (Korea, GenBank accession number DQ845249)
 Ja/1, JMe2 (Japan, GenBank accession number D89752)
 CV/1, CV777 (Belgium, GenBank accession number AF353511)
 CV/2, CV777 (GenBank accession number NC_003436)

ภาพที่ 4.8 phylogenetic tree ของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene และลำดับเบสส่วน

PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพืดัสสายพันธุ์ที่มีการรายงานใน GenBank

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสกัด total RNA จากตัวอย่างลำไส้ของลูกสุกรซึ่งคาดว่าติดเชื้อไวรัสพีอีดี และสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene ด้วยวิธี RT-PCR โดยได้ผลบวกจากการตรวจหาสารพันธุกรรมในตัวอย่างจำนวน 9 ตัวอย่าง จากตัวอย่างลำไส้ของลูกสุกรทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ที่ได้รับมาจากฟาร์มสุกร จังหวัดราชบุรี เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 คือ CU/VET/MED/001PEDV-M gene ถึง CU/VET/MED/009PEDV-M gene

เมื่อได้ยืนยันลำดับเบสของ purified RT-PCR product ว่าเป็นสารพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีโดยการตรวจหาลำดับเบสแล้ว ผู้วิจัยจึงโคลน CU/VET/MED/001PEDV-M gene เข้าสู่ pCR[®]8/GW/TOPO[®] vector เมื่อ transform ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell และตรวจผลการโคลนยีนจำนวน 10 clones ด้วยวิธี PCR แล้ว พบว่า สามารถโคลน CU/VET/MED/001PEDV-M gene ได้ทั้ง 10 clones คือได้ pCR[®]8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pCR[®]8CU/VET/MED/010PEDV-M recombinant plasmid โดยการตรวจสอบผลการโคลนยีนด้วยวิธี PCR และการตรวจหาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell ที่มี pCR[®]8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ส่วนการสร้าง PEDV-M gene expression vector พบว่า ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการโคลนยีน โดยการแทรก CU/VET/MED/001PEDV-M gene ที่ปลายทั้งสองข้างมีตำแหน่งของ *EcoRI* เข้าสู่ pGEX-4T-2 vector และเพิ่มจำนวนผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 จากการศึกษาวิเคราะห์ผลการโคลนยีนจำนวน 10 clones ด้วยวิธี PCR ตรวจพบการเพิ่มจำนวน PEDV-M gene ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 จำนวน 6 clones และได้ pGEX-4T-2CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pGEX-4T-2CU/VET/MED/006PEDV-M recombinant plasmid ซึ่ง pGEX-4T-2CU/VET/MEDPEDV-M recombinant plasmids ที่เพิ่มจำนวนผ่านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 clones นี้ได้รับการยืนยันผลการโคลน CU/VET/MED/001PEDV-M gene เข้าสู่ pGEX-4T-2 expression vector อีกครั้งโดยการส่งตรวจหาลำดับเบส

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene และ ลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของ recombinant plasmids ต่างๆ ที่ศึกษา พบว่า ลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ทั้งหมดจำนวน 8 ตัวอย่างที่ได้ตรวจหาจากการศึกษาครั้งนี้ตรงกันทั้ง 681 nucleotides จึงเก็บ transformants ทั้งหมดของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ใน glycerol และ รักษาสภาพในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อเป็น transformant stocks ของเชื้อแบคทีเรียสำหรับ ศึกษา CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant proteins expression ต่อไปในการศึกษาลำดับเบสครั้งนี้ ได้คัดเลือก CU/VET/MED/001PEDV-M gene เป็นตัวแทนของลำดับเบสส่วน PEDV-M gene จากเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากลำไส้ของลูกสุกรซึ่งติดเชื้อตามธรรมชาติ ในฟาร์มสุกรที่ตั้งอยู่ในจังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.0.9. (Hall, 1999) พบว่า ลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene มีขนาด 681 bp ประกอบด้วย adenine, cytosine และ guanine ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันคือ 22.32%, 21.88% และ 23.20% ตามลำดับ ส่วน thymine เป็นองค์ประกอบในลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene คิดเป็น 32.60% โดยมีสัดส่วนของ G-C content ต่ำกว่าสัดส่วนของ A-T content คือ G-C content มีสัดส่วนเท่ากับ 45.08% และ A-T content มีสัดส่วนเท่ากับ 54.92% เมื่อวิเคราะห์ deduced amino acids พบว่า deduced amino acids ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 6 ตัวแรกของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene คือ leucine, valine, serine, threonine, alanine และ glycine ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M genes ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีการรายงานใน GenBank ได้แก่ PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยจำนวน 7 สายพันธุ์ ประเทศจีนจำนวน 10 สายพันธุ์ ประเทศเกาหลีใต้จำนวน 3 สายพันธุ์ ประเทศญี่ปุ่นจำนวน 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์มาตรฐาน CV777 จำนวน 2 สายพันธุ์ พบว่า มีลำดับเบสที่ตรงกัน 96.62-100% โดย CU/VET/MED/001PEDV-M gene มีลำดับเบสเหมือนกัน 100% กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรี และจังหวัดนครปฐม ของประเทศไทย 3 สายพันธุ์ คือ M_NIAH100541, M_NIAH116099_07 และ M_NIAH116913_07 แต่มีลำดับเบสเหมือนกันต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ M_NIAH380_98 ซึ่งแยกได้จากประเทศไทยคือ 96.62% สำหรับการเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001 PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene จากเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศจีน พบว่า มีลำดับเบสที่เหมือนกันระหว่าง 97.21-99.12% โดยลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ JS-2004-2 มีความเหมือนกับลำดับเบสของ CU/VET/MED/001

PEDV-M gene มากที่สุด (99.12%) และลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ LZC มีความเหมือนกันของลำดับเบสต่ำที่สุด (97.21%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ CUVET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศเกาหลีใต้ พบว่า มีความเหมือนกันอยู่ในช่วงระหว่าง 97.50-97.94% โดยเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ KPEDV-9 และสายพันธุ์ Chinju99 มีลำดับเบสของ PEDV-M gene ตรงกันสูงที่สุด (97.94%) ขณะที่เชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ KPEDV-9F มีลำดับเบสต่างกันมากที่สุด (97.50%) ส่วนเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่เหมือนกับลำดับเบสของ CUVET/MED/001PEDV-M gene เท่ากับ 98.24% ส่วนลำดับเบสจากเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 ที่มีการรายงานใน GenBank มี 98.38% ของลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่ตรงกับลำดับเบสของ CUVET/MED/001PEDV-M gene

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ต่างๆ โดยอาศัยวิธี phylogenetic tree analysis ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Version 4.1 (Beta) (Tamura et al., 2007) พบว่า สามารถแบ่ง PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่มีการรายงานในการวิจัยครั้งนี้กับเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีการรายงานลำดับเบสใน GenBank จำนวน 23 สายพันธุ์ ได้เป็น 3 กลุ่ม โดยลำดับเบสของ CUVET/MED/001PEDV-M gene มีความใกล้เคียงกับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ในประเทศไทยมากที่สุด และลำดับเบสของ CUVET/MED/001PEDV-M gene มีลำดับเบสที่ตรงกับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่มีการรายงานจากประเทศจีนมากกว่าลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่มีการรายงานจากประเทศญี่ปุ่น และประเทศเกาหลีใต้ รวมทั้งเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ส่ง purified RT-PCR product เพื่อตรวจหาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีซึ่งแยกได้จากลูกสุกรแรกเกิดที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ จากฟาร์มสุกร ในจังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 เพียงตัวอย่างเดียว เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีในประเทศไทย โดยมีการเปรียบเทียบกับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีการรายงานจากจังหวัดนครปฐม และในพื้นที่ส่วนต่างๆ ของจังหวัดราชบุรี ซึ่งเป็นการรายงานการพบโรคพีอีดีในปีเดียวกัน อีกทั้งเปรียบเทียบกับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่มีการรายงานมาจากประเทศต่างๆ ในแถบเอเชีย ได้แก่ ประเทศจีน ประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น และลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 ซึ่งรายงานใน GenBank ทั้งหมด

จำนวน 23 สายพันธุ์ จึงมีความเพียงพอ และเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีในครั้งนี้

PEDV-M primers ได้เตรียมขึ้นเพื่อใช้ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene จาก cDNA template ที่สังเคราะห์จาก total RNA ของเชื้อไวรัสพีอีดีโดยอาศัย RT-PCR technique ผู้วิจัยได้ออกแบบลำดับเบสของ PEDV-M primers โดยอ้างอิงตามลำดับสายพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่รายงานในจังหวัดราชบุรี เมื่อ พ.ศ. 2551 คือ M_NIAH100542_08 (GenBank accession number EU542418) โดยพบว่า ลำดับสายพันธุกรรมตำแหน่งที่ใช้ในการออกแบบ PEDV-M primers ตรงกับลำดับสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดีส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ Chinju99 (GenBank accession number DQ845249) ที่มีการรายงานจากประเทศเกาหลีใต้ และจากผลการตรวจหาลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกสุกรแรกเกิดซึ่งติดเชื้อไวรัสพีอีดีตามธรรมชาติ ในฟาร์มสุกร ที่จังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ซึ่งเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ PEDV-M primers ภายใต้สภาวะการทำ PCR ที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้น ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ PEDV-M primers ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (National Center for Biotechnology Information: NCBI) ได้แสดงถึงความจำเพาะของ PEDV-M primers และประสิทธิภาพในการนำมาใช้ใน RT-PCR technique สำหรับการวิจัยในครั้งนี้ พบว่า การประยุกต์ใช้ RT-PCR technique ร่วมกับการทำ PCR และ PEDV-M primers ที่ได้พัฒนาขึ้นในการวิจัยสามารถนำมาใช้เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีที่ก่อโรคในลูกสุกรที่ติดเชื้อมากกว่าที่จังหวัดราชบุรี ในเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2551 ได้

สำหรับการโคลน CU/VET/MED/001PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกสุกรแรกเกิดที่ติดเชื้อตามธรรมชาติภายในฟาร์มสุกร ซึ่งตั้งอยู่ในพื้นที่ของจังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้ pCR[®] 8/GW/TOPO[®] vector เป็น vector กลางในการเก็บรักษา และเพิ่มจำนวน CU/VET/MED/001PEDV-M gene ใน pCR[®] 8/GW/TOPO[®] vector โดย vector นี้อยู่ในชุดโคลนนิ่งสำเร็จรูป pCR[®] 8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit ซึ่งมีข้อดี คือ ได้รับการพัฒนาขึ้นโดยอาศัย Invitrogen's TOPO[®] Cloning Technology ที่ทำให้มีประสิทธิภาพในขบวนการ ligation ในตำแหน่งที่จำเพาะสูงมากกว่า 95% ร่วมกับ Gateway[®] Technology ซึ่งพัฒนาขึ้นเพื่ออำนวยความสะดวกสำหรับกรณีที่ต้องการย้ายยีนที่สนใจเข้าสู่ vector อื่นๆ ที่อยู่ในระบบ Gateway[®] Technology เช่น Gateway[®] destination

vector หรือ MultiSite Gateway[®] destination vector หรือ ระบบการผลิตโปรตีนอื่น เช่น ยีสต์ เซลล์แมลง หรือเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยไม่ต้องใช้ restriction enzyme หรือ ligase enzyme (Landy, 1989) สำหรับประสิทธิภาพในขบวนการ transformation เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell คือ 1×10^9 cfu/ μ g (Invitrogen, 2006) โดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และมีขนาดของโคโลนีเดี่ยวใหญ่กว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เมื่อเพาะบ่มเชื้อข้ามคืน จากการโคลน CU/VET/MED/001PEDV-M gene ด้วยชุดโคลนนิ่งสำเร็จรูป pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit พบว่า ผู้วิจัยสามารถโคลน CU/VET/MED/001PEDV-M gene ได้ library จำนวนมากที่สามารถเจริญได้ใน selective media ที่มียาปฏิชีวนะชนิด spectinomycin เนื่องจากลำดับสายพันธุ์กรรมของ pCR[®]8/GW/TOPO[®] vector มี spectinomycin promotor และ spectinomycin resistance gene จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการคัดแยกเชื้อที่อาจปนเปื้อนระหว่างขั้นตอนต่างๆ ในการโคลนยีน จากการตรวจผลการโคลน CU/VET/MED/001PEDV-M gene ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell จำนวน 10 clones พบว่าได้ transformants ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell ทั้งหมด 10 clones สำหรับโครงสร้างสายพันธุ์กรรมอื่นๆ ที่สำคัญของ pCR[®]8/GW/TOPO[®] vector ได้แก่ pUC origin ซึ่งใช้ในการเพิ่มจำนวน recombinant plasmid ในปริมาณสูง โดย pUC origin จะอยู่ในตำแหน่งก่อน *rrnB* T1 และ *rrnB* T2 transcription termination sequences เพื่อป้องกันการผลิตโปรตีนที่อาจมีความเป็นพิษต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และทำให้ เชื้อแบคทีเรีย ตกตะกอน และตายในที่สุด นอกจากนี้ pCR[®]8/GW/TOPO[®] vector ยังสามารถนำ *EcoRI* restriction enzyme มาใช้เพื่อตัด และย้ายยีนที่สนใจไปยัง vector อื่นต่อไปได้ โดยมี *EcoRI* restriction site ที่ตำแหน่งหลัง *attL1* และตำแหน่งก่อน *attL2* สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้อาศัย *EcoRI* restriction enzyme เพื่อตัด และแทรก CU/VET/MED/001PEDV-M gene เข้าสู่ pGEX-4T-2 expression vector

ในขั้นตอนการสร้าง PEDV-M gene expression vector นั้น ผู้วิจัยเลือกใช้ pGEX-4T-2 vector ซึ่งเป็น vector ที่อยู่ในระบบ Glutathione S-transferase (GST) Gene Fusion System สามารถนำมาใช้เพื่อศึกษา recombinant protein expression โดยทำให้ recombinant protein บริสุทธิ์ได้โดยการตัด GST-tag ออกด้วย enzyme ที่จำเพาะ vector ในระบบนี้สามารถ transform เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้หลายสายพันธุ์ ซึ่งต้องเลือกใช้ให้ตรงตามวัตถุประสงค์เช่น เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 สามารถใช้เพื่อศึกษา recombinant protein expression เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM105 เป็น competent cell สำหรับการ

โคลนยีน และเก็บรักษา plasmid โดยลำดับสายพันธุกรรมของ pGEX-4T-2 vector มียีนที่น่าสนใจ คือ ampicillin-resistant gene ซึ่งเป็นยีนที่ช่วยในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ใน LB agar ขณะที่ทำการโคลนยีน และมี GST gene ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ tac promoter และ internal lacI^a gene ซึ่งเหนี่ยวนำขบวนการ recombinant protein expression ด้วย isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) เนื่องจาก recombinant protein ที่ผลิตขึ้นผ่าน pGEX-4T-2 vector มี glutathione S-transferase (GST) ขนาด 26 kDa ติดอยู่ จึงเป็นประโยชน์ในการทำให้ recombinant protein บริสุทธิ์ด้วย Glutathione Sepharose™ 4B และ thrombin protease ซึ่งในขั้นตอนนี้มีผลกระทบต่อความเป็นแอนติเจน และการทำงานของ recombinant protein น้อยมาก (Amersham Biosciences, 2002) สำหรับการวัดปริมาณ recombinant protein สามารถทำได้ด้วยวิธี colorimetric method หรือ immunological method ดังนั้น pGEX-4T-2 vector จึงเป็น vector ที่มีความเหมาะสมในการผลิต recombinant protein เพื่อศึกษาในด้านหน้าที่และการทำงานของโปรตีน การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน รวมทั้งการศึกษาเพิ่มเติมทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา และสามารถนำ recombinant protein ที่ผลิตขึ้นได้ไปปรับประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ เช่น การพัฒนารีคอมบิแนนท์วัคซีน การผลิตแอนติเจนเพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจทางซีรั่มวิทยา โดยจากการศึกษาที่ผ่านมา Lundbäck และคณะ (2003) ได้ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนส่วนของ transmembrane protein โดยใช้ระบบ GST-Gene Fusion System และทำให้ GST-fusion transmembrane protein บริสุทธิ์ สำหรับเชื้อไวรัสทีอีดีนั้น มีการใช้ pGEX-6p-1 vector ซึ่งเป็น vector หนึ่งในระบบ GST-Gene Fusion System เพื่อผลิต recombinant membrane protein ส่วน NH₂-terminus ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และพบว่าสามารถนำมาใช้เป็นแอนติเจน สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีจากการตอบสนองของร่างกายสุกรทางระบบภูมิคุ้มกันเมื่อติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี ELISA (Shenyang et al., 2007) เพื่อตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสทีอีดี และประเมินระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคทีอีดีได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Sun และคณะ (2008) ได้ศึกษาโดยการโคลนยีนเฉพาะส่วนย่อยต่างๆ ของ S protein gene เข้าสู่ pGEX-6p-1 vector ผ่านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 และนำโปรตีนที่ผลิตขึ้นได้จากเชื้อแบคทีเรียมาวิเคราะห์ความสามารถของโปรตีนในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย (immunogenicity) ของสุกร โดยอาศัยวิธี ELISA และ western blotting technique สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ใช้เป็น competent cell ในการผลิต expression vector ในการศึกษา มีประสิทธิภาพในขบวนการ transformation มากกว่า 10⁸ cfu/μg และเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 มีลำดับเบสของ *recA1* mutation และ *endA1* mutation จึงช่วยให้ plasmid ที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว มีความเสถียร และมีคุณภาพสูงขึ้น โดยผลจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สามารถสร้าง pGEX-4T-2

CU/VET/MED/PEDV-M recombinant plasmid ได้จำนวน 6 clones จากการตรวจทั้งหมด จำนวน 10 clone ที่ผ่านมามีผู้วิจัยที่ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนโดยอาศัย vector ในระบบ GST-Gene Fusion System ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 และได้นำไปศึกษาเพิ่มเติมต่อในด้านต่างๆ เช่น การศึกษาลำดับเบส ลำดับกรดอะมิโน และโครงสร้างของโปรตีน (Kim et al., 2008) การศึกษาหน้าที่และการทำงานของโปรตีน (Zhang et al., 2006; Landmann et al., 2007) การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Yuan et al., 2006; Amin et al., 2007; Nakasako et al., 2008) และ การศึกษาเพื่อผลิต recombinant protein สำหรับเป็นแอนติเจน (Hashimoto et al., 2006; Takahash et al., 2006; Kim et al., 2008) เป็นต้น

จากการศึกษาลำดับเบส CU/VET/MED/001PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดี สายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกสุกรแรกเกิดซึ่งติดเชื้อเองในธรรมชาติที่จังหวัดราชบุรี เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 พบว่า มีสัดส่วนของ nucleotides ที่ใกล้เคียงกับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่มีการรายงานจากประเทศจีน (Jinghui and Yijing, 2005) และให้ผล การศึกษาลำดับเบสที่สอดคล้องกับ Chen และคณะ (2008) คือ ไม่พบว่าลำดับเบสส่วน PEDV-M gene มีการเพิ่มหรือลด nucleotides ตลอดความยาว 681 bp ส่วนสัดส่วนของ G-C content ใน ลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene ที่ได้จากการหาลำดับเบสเท่ากับ 45.08% ซึ่ง จัดว่าเป็นสัดส่วนที่มีปริมาณ G-C content สูงเมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสอื่นในกลุ่ม *coronavirus* ซึ่งมี สัดส่วนของ G-C content อยู่ในช่วงประมาณ 37-42% (Rota et al., 2003) จากการที่ปริมาณ สัดส่วนของ G-C content ยังมีความสัมพันธ์กับ replication timing และขบวนการซ่อมแซม (repair mechanism) ของยีนหลังขบวนการ expression ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ยีสต์ และ แบคทีเรีย เช่น เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (Deschavanne and Filipiski, 1995) กล่าวคือ ในบริเวณของ โครโมโซมที่มี G-C content ปริมาณสูง จะมีขบวนการ replication ก่อนบริเวณที่มี A-T content สูง ซึ่งมีผลต่อขบวนการซ่อมแซมสารพันธุกรรมอีกด้วย การรายงาน และศึกษาลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene จึงอาจจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเพิ่ม จำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดี นอกจากนี้ G-C content ยังมีความสัมพันธ์กับรูปแบบการ แสดงออกของยีน โดยความสัมพันธ์ระหว่าง G-C content และรูปแบบการแสดงออกของยีนยังมี การรายงานที่หลากหลายอยู่ (Goncalves et al., 2000; Duret, 2002; Ponger et al., 2001; Vinogradov, 2003; Urrutia and Hurst, 2003; Versteeg et al., 2003; Lercher, et al., 2003)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบส ส่วน PEDV-M gene จาก pCR[®]8CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid จากเชื้อ แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cell จำนวน 1 clone

และลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ใน pGEX-4T-2CU/VET/MED/001PEDV-M recombinant plasmid ถึง pGEX-4T-2CU/VET/MED/006PEDV-M recombinant plasmid ที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 จำนวน 6 clones พบว่า มีลำดับเบสตรงกันตลอด 681 bp และจากผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่รายงานใน GenBank ซึ่งเป็นรายงานลำดับเบสของเชื้อไวรัสจากประเทศไทยจำนวน 7 สายพันธุ์ ประเทศจีนจำนวน 10 สายพันธุ์ ประเทศเกาหลีใต้จำนวน 3 สายพันธุ์ ประเทศญี่ปุ่นจำนวน 1 สายพันธุ์ และเชื้อไวรัสพีอีดีมาตรฐานสายพันธุ์ CV777 จำนวน 2 สายพันธุ์ พบว่า ลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก โดยลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene มีความแตกต่างกับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่รายงานจากประเทศไทยไม่เกิน 3.4%

เชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยซึ่งอ้างอิงจาก GenBank จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่นำมาร่วมศึกษาในครั้งนี้ เป็นลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ที่แยกได้จากจังหวัดราชบุรีจำนวน 5 สายพันธุ์ และจังหวัดนครปฐมจำนวน 1 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรที่หนาแน่น โดยได้รายงานลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ในช่วงเวลาเดียวกับที่กรมปศุสัตว์มีการรายงานพบโรคพีอีดี และเป็นเวลาเดียวกับที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene (CU/VET/MED/001PEDV-M gene) เช่นกัน จากผลการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีแต่ละสายพันธุ์ในประเทศไทย พบว่า ลำดับเบสส่วน PEDV-M gene มีความใกล้เคียงกันสูงมาก จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัสพีอีดีที่แพร่กระจาย และก่อโรคพีอีดีในสุกรของประเทศไทยไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซึ่งก่อให้เกิดเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการก่อโรคที่รุนแรงและรวดเร็ว เนื่องจากมีการแยกสารพันธุกรรมตัวอย่างของเชื้อไวรัสพีอีดีภายในช่วงเวลาเดียวกัน และเป็นตัวอย่างสารพันธุกรรมซึ่งเก็บมาจากหลายตำแหน่งในพื้นที่ของ 2 จังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นของประเทศไทย อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาลำดับเบสในส่วนอื่นของเชื้อไวรัสพีอีดีเพิ่มเติมเพื่อร่วมวิเคราะห์ เพราะลำดับเบสส่วน PEDV-M gene มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสน้อย การวิเคราะห์จากลำดับเบสส่วนนี้เพียงส่วนเดียวจึงไม่เพียงพอที่จะสรุปได้อย่างชัดเจน

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene กับลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่มีรายงานจากประเทศจีน ประเทศเกาหลีใต้ ประเทศญี่ปุ่น และสายพันธุ์มาตรฐาน CV777 พบว่า ลำดับเบสมีความแตกต่างกันไม่เกิน 2.8%, 2.5%, 1.7% และ 1.8% ตามลำดับ และจากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีก่อน และหลังจากที่เชื้อไวรัสเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells ที่ passage

ระดับที่ 100 พบว่าลำดับเบสยังคงใกล้เคียงกัน คือ มีความเหมือนกัน 98.97% (Kweon et al., 2003) และ 98.53% (Song et al., 2003) จึงสามารถสรุปได้ว่า PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดี มีลักษณะเป็น conserved gene และเป็นการยืนยันความเหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสพีอีดีด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primers สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วน PEDV-M gene อีกทั้งสามารถนำ recombinant PEDV-M proteins ไปพัฒนาเป็นแอนติเจนสำหรับการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสพีอีดีด้วยวิธี ELISA ต่อไปได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มทางเลือก และเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัย และ/หรือ การประเมินระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายสุกร

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีด้วยวิธี phylogenetic tree analysis ทั้งหมดจำนวน 24 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ในประเทศไทยมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ในประเทศจีนมากที่สุด โดยเมื่อวิเคราะห์ตามช่วงเวลาที่ยานงานลำดับเบสของเชื้อไวรัสของทั้งสองประเทศแล้ว เชื้อไวรัสพีอีดีส่วนหนึ่งที่แพร่กระจายในประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2551 อาจมีแหล่งที่มาหรือต้นกำเนิดเดียวกับเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่พบในประเทศจีน อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสส่วนอื่นเพิ่มเติม เช่น ลำดับเบสส่วน S gene ซึ่งเป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสสูง เพื่อศึกษาถึงแหล่งที่มาของเชื้อไวรัสพีอีดีที่แพร่กระจายในประเทศไทย เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 แม้ว่าลำดับเบสส่วน PEDV-M gene จะมีลักษณะเป็น conserved gene แต่จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี phylogenetic tree analysis ผู้วิจัยสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่ม อย่างชัดเจน โดยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในเชื้อไวรัสพีอีดีทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกัน ซึ่งผลการวิเคราะห์ดังกล่าวนี้อาจสอดคล้องกับรายงานความหลากหลายของสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพีอีดีได้ที่มีการศึกษาพบ และรายงานในต่างประเทศมาแล้ว (Kubota et al., 1999; Yeo et al., 2003; Chen et al., 2008)

ข้อเสนอแนะ

RT-PCR technique และ PEDV-M primers ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้ สามารถนำมาปรับประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยสารพันธุกรรมส่วน full length PEDV-M gene และใช้ในการยืนยันถึงการพบเชื้อไวรัสพีอีดีในสุกร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุม และป้องกันโรคได้ เนื่องจาก PEDV-M primers มีความจำเพาะต่อ PEDV-M gene สูง และลำดับเบสของ PEDV-M gene มีลักษณะเป็น conserved gene อย่างมากจึงเป็นการเพิ่มทางเลือกของวิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคพีอีดีวิธีหนึ่ง โดยการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี RT-PCR นี้ให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะ และความไวในการตรวจหาสายพันธุกรรมที่อยู่ในตัวอย่างสูง อีกทั้งใช้เวลาในการตรวจไม่นาน การอ่านผลการตรวจง่าย และไม่ยุ่งยาก

สำหรับการศึกษาลำดับเบสส่วน PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดี ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และโครงสร้างของโปรตีน รวมทั้งการทำงานของโปรตีน นอกจากนี้ เพื่อเป็นการเพิ่มเติมความรู้ด้านอนุชีวโมเลกุลเกี่ยวกับเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่ก่อโรคในประเทศไทย จึงควรมีการศึกษา และวิเคราะห์ลำดับเบสส่วนต่างๆ ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยในปัจจุบันเพิ่มเติม เช่น N gene, ORF3 gene และ E gene และ S gene และเปรียบเทียบกับลำดับเบสส่วนต่างๆ ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรในประเทศไทยในอดีต รวมทั้งเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่มีการรายงานจากต่างประเทศ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางระบาดวิทยา และอาจจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสพีอีดี การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย และวางแผนเพื่อควบคุม หรือป้องกันโรคต่อไป

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการศึกษาค้างนี้จะมิตัดอุปประสงค์หลัก คือ (1) โคลนนิ่ง และสร้าง expression vector สำหรับ PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรที่ติดเชื้อตามธรรมชาติในจังหวัดราชบุรี พ.ศ. 2551 และ (2) ศึกษาลำดับเบสของ PEDV-M gene ที่แยก แต่สำหรับการโคลนนิ่ง PEDV-M gene ของเชื้อไวรัสพีอีดีนี้ เป็นเพียงขั้นตอนเริ่มต้นสำหรับการพัฒนาชุดตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธี ELISA ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำขบวนการ recombinant PEDV-M protein expression จาก CUVET/MED/001PEDV-M gene ใน expression vector ที่สร้างขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อผลิต recombinant PEDV-M protein และนำไปใช้พัฒนาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค หรือใช้เป็นส่วนประกอบในวัคซีนป้องกันโรคพีอีดีในสุกรต่อไปในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ ส่วนระบาดวิทยาทางสัตวแพทย์ 2008^a (2551^a). รายงานการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการสะสม. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา. 14(147): 7.
- กรมปศุสัตว์. สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ ส่วนระบาดวิทยาทางสัตวแพทย์ 2008^b (2551^b). รายงานการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการสะสม. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา. 14(150): 9.
- กรมปศุสัตว์. สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ ส่วนระบาดวิทยาทางสัตวแพทย์ 2008^c (2551^c). รายงานการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการสะสม. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา. 14(153): 8.
- Al-Hasani, K., Simpfendorfer, K., Wardan, H., Vadolas, J., Zaibak, F., Villain, R. and Ioannou, P.A. 2003. Development of a novel bacterial artificial chromosome cloning system for functional studies. *Plasmid*. 49(2): 184–187.
- Amersham Biosciences. 2002. GST gene fusion system handbook: Instruction manual.
- Amin, M.Z., Bando, T., Ruksana, R., Anokye-Danso, F., Takashima, Y., Sakube, Y. and Kagawa, H. 2007. Tissue-specific interactions of TNI isoforms with other TN subunits and tropomyosins in *C. elegans*: The role of the C- and N-terminal extensions. *Biochim. Biophys. Acta*. 1774(4): 456–465.
- Bae, J.L., Lee, J.G., Kang, T.J., Jang, H.S., Jang, Y.S. and Yang, M.S. 2003. Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune response by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine*. 21(25-26): 4052-4058.
- Bridgen, A., Duarte, M., Tobler, K., Laude, H. and Ackermann, M. 1993. Sequence determination of the nucleocapsid protein gene of the porcine epidemic diarrhoea virus confirms that this virus is a coronavirus related to human coronavirus 229E and porcine transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.* 74: 1795-1804.

- Callebaut, P., De Bouck, P. and Pensaert, M. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. *Vet. Microbiol.* 7(4): 296-306.
- Carvajal, A., Lanza, I., Diego, R., Rubio, P. and Girrnenes, P. 1995. Seroprevalence of porcine epidemic diarrhea virus infection among different types of breeding swine farms in Spain. *Prev. Vet. Med.* 23: 33-40.
- Chen, J.F., Sun, D.B., Wang, C.B., Shi, H.Y., Cui, X.C., Liu, S.W., Qiu, H.J. and Feng, L. 2008. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. *Virus Genes.* 36(2): 355-364.
- Cruz, D.J.M., Kim, C.J. and Shin, H.J. 2006. Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes. *Virology.* 354(1): 28-34.
- Deschavanne, P. and Filipski, J. 1995. Correlation of GC content with replication timing and repair mechanisms in weakly expressed *E. coli* genes. *Nucleic Acids Res.* 23(8): 1350-1353.
- Duret, L. 2002. Evolution of synonymous codon usage in metazoans. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 640-649.
- Duarte, M. and Laude, H. 1994. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 75: 1195-1200.
- Dukkipati, A., Park, H.H., Waghray, D., Fischer, S. and Garcia, K.C. 2008. BacMam system for high-level expression of recombinant soluble and membrane glycoproteins for structural studies. *Protein Expr. Purif.* 62(2): 378-383.
- Frengen, E., Weichenhan, D., Zhao, B., Osoegawa, K., Geel, M.V. and De Jong P.J. 1999. A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics.* 58: 250-253.

- Goncalves, I., Duret, L. and Mouchiroud, D. 2000. Nature and structure of human genes that generate retropseudogenes. *Genome Res.* 10: 672–678.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hashimoto, O., Ushiro, Y., Sekiyama, K., Yamaguchi, O., Yoshioka, K., Mutoh, K.I. and Hasegawa, Y. 2006. Impaired growth of pancreatic exocrine cells in transgenic mice expressing human activin βE subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341(2): 416–424.
- Hofmann, M. and Wyler, R. 1989. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Vet. Microbiol.* 20(2): 131–142.
- Hofmann, M. and Wyler, R. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera. *Vet. Microbiol.* 21(3): 263-273.
- Hou, X.L., Yu, L.Y. and Liu, J. 2007^a. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Vet. Microbiol.* 123(1-3): 86–92.
- Hou, X.L., Yu, L.Y., Liu, J. and Wang, G.H. 2007^b. Surface-displayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria. *Vaccine.* 26(1): 24-31.
- Invitrogen. 2006. pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit: Instruction manual.
- Ishikawa, K., Sekiguchi, H., Ogino, T. and Suzuki, S. 1997. Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR. *J. Virol. Method.* 69: 191-195.
- Jackson, P.G.G. and Cockcroft, P.D. 2007. Disease of the gastrointestinal system. In: *Handbook of pig medicine.* 1st ed. St. Louis: Saunders. 83-111.
- Jinghui, F. and Yijing, L. 2005. Cloning and sequence analysis of the M gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes.* 30(1): 69–73.

- Junwei, G., Baoxian, L., Lijie, T. and Yijing, L. 2006. Cloning and sequence analysis of the N gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes*. 33(2): 215-219.
- Kang, T.J., Han, S.C., Yang, M.S. and Jang, Y.S. 2006. Expression of synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco plants. *Protein Expr. Purif.* 46(1): 16-22.
- Kang, T.J., Kang, K.H., Kim, J.A., Kwon, T.H., Jang, Y.S. and Yang, M.S. 2004. High-level expression of the neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus by a tobacco mosaic virus-based vector. *Protein Expr. Purif.* 38(1): 129-135.
- Kang, T.J., Kim, Y.S., Jang, Y.S. and Yang, M.S. 2005^a. Expression of the synthetic neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in tobacco plants without nicotine. *Vaccine*. 23(17-18): 2294-2297.
- Kang, T.J., Seo, J.E., Kim, D.H., Kim, T.G., Jang, Y.S. and Yang, M.S. 2005^b. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expr. Purif.* 41(2): 378-383.
- Kim, J.Y., Kim, Y.M., Cho, S.K., Choi, K.S. and Cho, M. 2008. Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.* 32(10): 1131-1141.
- Kim, O. and Chae, C. 2003. Experimental infection of piglets with a Korean strain of porcine epidemic diarrhea virus. *J. Comp. Path.* 129(1): 55-60.
- Kim, Y.S., Kang, T.J., Jang, Y.S. and Yang, M.S. 2005. Expression of neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus in potato plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 82: 125-130.

- Knuchel, M., Ackermann, M., Mfiller, H.K. and Kihm, U. 1992. An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. *Vet. Microbiol.* 32(2): 117-134.
- Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M. and Tobler, K. 2001. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes.* 23(2): 137-144.
- Kubota, S., Sasaki, O., Amimota, K., Okada, N., Kitazima, T. and Yasuhara, H. 1999. Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus. *J. Vet. Med. Sci.* 61(7): 827-830.
- Kweon, C.H., Kwon, B.J., Lee, J.G., Kwon, G.O. and Kang, Y.B. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine.* 17(20-21): 2546-2553.
- Landmann, C., Fink, B., Festner, M., Dregus, M., Engel, K.H. and Schwab, W. 2007. Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). *Arch. Biochem. Biophys.* 465: 417-429.
- Landy, A. 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 913-949.
- Lee, H.K.Y. and Yeo, S.G. 2003. Cloning and sequence analysis of the nucleocapsid gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99. *Virus Genes.* 26(2): 207-212.
- Lercher, M.J., Urrutia, A.O., Pavlicek, A. and Hurst, L.D. 2003. A unification of mosaic structures in the human genome. *Hum. Mol. Genet.* 12: 2411-2415.
- Li, B.X., Ge, J.W. and Li, Y.J. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology.* 365(1): 166-172.
- Lundbäck, A.K., Haneskog, L., Andersson, L., Heijbel, A., Ingemarsson, L. and Birse, D. 2003. Innovations Forum: Optimal solubilization screening strategies for GST-fusion membrane proteins. *Life Science News.* 15: 10-12.

- Nakasako, M., Zikihara, K., Matsuoka, D., Katsura, H. and Tokutomi, S. 2008. Structural basis of the LOV1 dimerization of arabidopsis phototropins 1 and 2. *J. Mol. Biol.* 381(3): 718–733.
- Oh, J.S., Song, D.S., Yang, J.S., Song, J.Y., Moon, H.J., Kim, T.Y. and Park, B.K. 2005. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection. *J. Vet. Sci.* 6(4): 349–352.
- Park, S.J., Moon, H.J., Luo, Y., Kim, H.K., Kim, E.M., Yang, J.S., Song, D.S., Kang, B.K., Lee, C.S. and Park, B.K. 2008. Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses. *Virus Genes.* 36(1): 95–104.
- Park, S.J., Song, D.S., Ha, G.W. and Park, B.K. 2007. Cloning and further sequence analysis of the spike gene of attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13. *Virus Genes.* 35(1): 55–64.
- Pensaert, M.B. and De Bouck, P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* 58: 243-247.
- Ponger, L., Duret, L. and Mouchiroud, D. 2001. Determinants of CpG islands: expression in early embryo and isochore structure. *Genome. Res.* 11: 1854–1860.
- Pospischil, A., Stuedli, A. and Kiupel, M. 2002. Update on porcine epidemic diarrhea. *J Swine Health Prod.* 10(2): 81–85.
- Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., De Risi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.D., Peret, T.C.T., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Günther, S., Osterhaus, A.D.M.E., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J. and Bellini, W.J. 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science.* 300: 1394–1399.

- Saif L.J. 2004. Animal coronaviruses: What can they teach us about the severe acute respiratory syndrome? *Rev. Sci. Tech.* 23(2): 643-660.
- Sheibani, N. 1999. Prokaryotic gene fusion expression systems and their use in structural and functional studies of proteins. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 29: 77-90.
- Shenyang, G., Enhui, Z., Baoxian, L., Xinyuan, Q., Lijie, T., Junwei, G. and Yijing, L. 2007. High-level prokaryotic expression of envelope exterior of membrane protein of porcine epidemic diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 123(1-3): 187-193.
- Shibata, I., Ono, M. and Mori, M. 2001. Passive protection against porcine epidemic diarrhoea (PED) virus in piglets by colostrum from immunized cows. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 655-658.
- Shibata, I., Tsuda, T., Mori, M., Ono, M., Sueyoshi, M. and Uruno, K. 2000. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Vet. Microbiol.* 72(3-4): 173-182.
- Sittidilokratna, N., Dangtip, S., Cowley, J.A. and Walker, P.J. 2008. RNA transcription analysis and completion of the genome sequence of yellow head nidovirus. *Virus Research.* 136: 157-165.
- Song, D.S., Kang, B.K., Oh, J.S., Ha, G.W., Yang, J.S., Moon, H.J., Jang, Y.S. and Park, B.K. 2006. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 278-281.
- Song, D.S., Yang, J.S., Oh, J.S., Han, J.H. and Park, B.K. 2003. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3. *Vaccine.* 21(17-18): 1833-1842.

- Sturman, L.S., Holmes, K.V. and Behnke, J. 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* 33(1): 449–462.
- Sueyoshi, M., Tsuda, T., Yamazaki, K., Yoshida, K., Nakazawa, M., Sato, K., Minami, T., Iwashita, K., Watanabe, M., Suzuki, Y. and Mori, M. 1995. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea. *J. Comp. Path.* 113(1): 59–67.
- Sun, D., Feng, L., Shi, H., Chen, J., Cui, X., Chen, H., Liu, S., Tong, Y., Wang, Y. and Tong, G. 2008. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhoea virus spike protein. *Vet. Microbiol.* 131(1-2): 73-81.
- Takahashi, S., Ogiyama, Y., Kusano, H., Shimada, H., Kawamukai, M. and Kadowaki, K.I. 2006. Metabolic engineering of coenzyme Q by modification of isoprenoid side chain in plant. *FEBS Letters.* 580(3): 955–959.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution.* 24:1596-1599.
- Urrutia, A.O. and Hurst, L.D. 2003. The signature of selection mediated by expression on human genes. *Genome Res.* 13: 2260–2264.
- Utiger, A., Tobler, K., Bridgen, A. and Ackermann, M. 1995. Identification of the membrane protein of porcine epidemic diarrhoea virus. *Virus Genes.* 10(2): 137-148.
- Vennema, H., Godeke, G.J., Rossen, J.W.A., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.J.E. and Rottier, P.J.M. 1996. Nucleocapsid-independent assembly of corona virus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO. J.* 15(8): 2020-2028.
- Versteeg, R., van Schaik, B.D., van Batenburg, M.F., Roos, M., Monajemi, R., Caron, H., Bussemaker, H.J. and van Kampen, A.H. 2003. The human transcriptome map

reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res.* 13: 1998–2004.

Vijaykrishna, D., Smith, G.J.D., Zhang, J.X., Peiris, J.S.M., Chen, H. and Guan, Y. 2007. Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *J. Virol.* 81(8): 4012–4020.

Vinogradov, A.E. 2003. Isochores and tissue-specificity. *Nucleic Acids Res.* 31: 5212–5220.

Woods, R.D. 2001. Efficacy of a transmissible gastroenteritis coronavirus with an altered ORF-3 gene. *Can. J. Vet. Res.* 65: 28-32.

Yaling, Z., Ederveen, J., Egberink, H., Pensaert, M. and Horzinek, M.C. 1988. Porcine epidemic diarrhea virus (CV 777) and feline infectious peritonitis virus (FIPV) are antigenically related. *Arch. Virol.* 102: 63-71.

Yeo, S.G., Hernandez, M., Krell, P.J. and Nagy, E. 2003. Cloning and sequence analysis of the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99. *Virus Genes.* 26(3): 239-246.

Yuan, X., Shan, Y., Zhao, Z., Chen, J. and Cong, Y. 2006. Short communication: Interaction between Snapin and G-CSF receptor. *Cytokine.* 33(4): 219-225.

Zhang, Y.D., Zhou, J., Zhao, J.F., Peng, J., Liu, X.D., Liu, X.S. and Jia, Z.M. 2006. Expression, purification and bioactivity of human augments of liver regeneration. *World J. Gastroenterol.* 12(27): 4401-4405.

Zheng, W.X., Chen, L.L., Ou, H.Y., Gao, F. and Zhang, C.T. 2005. Coronavirus phylogeny based on a geometric approach. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36: 224–232.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

เครื่องมือ-อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และสารเคมี

เครื่องมือ-อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- Agarose gel electrophoresis unit, Model GE-100 (Bioer technology co. Ltd, China)
- Autoclave (JE-356A, Taiwan)
- Centrifuge tube
- Centrifuge
 - Centrifuge (Model DCS-16RV S/N:4724)
 - Refreezed ultracentrifuge (Heraeus Biofuge 22R, USA)
- Cooler
 - Cooling box
 - -20 °C Freezer, Model SF-C997 (Sanyo, Thailand)
 - -80 °C Freezer, Model 905 (Thermofisher Scientific, USA)
 - Refrigerator (SANYO รุ่น SR-F213C)
- Digital balance (Sartorius BP 310 S, Germany)
- Experimental glassware: Beaker, Cylinder, Flask
- Gel Document system, Model GVM20 (Synoptics, UK)
- Heater
 - Incubator, Model BE-400 (Mettler Inc., Germany)
 - Heat block (Labnet, USA)
 - Shaking incubator, Model 311DS (Labnet, USA)

- Laminar air flow (Bio IIA) (Telstar, Spain)
- Microcentrifuge tube
- Micropipette
 - Micropipette 1-10 ul (Labnet, USA)
 - Micropipette 10-100 ul (Labnet, USA)
 - Micropipette 20-200 ul (Labnet, USA)
 - Micropipette 100-1000 ul (Labnet, USA)
- Micropipette tip
 - Micropipette tip 10 μ l
 - Micropipette tip 200 μ l
 - Micropipette tip 1,000 μ l
- PCR Machine 24 Well (Applied Biosystems SN803S)
- UV transilluminator (M15E Benchtop UV Transilluminator UVP SN:011603-001)
- Vortex, Model K550-GE (Scientific Inc., USA)
- Vertical shaking
- Water bath

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

- 95% Ethyl alcohol
- Absoluted ethyl alcohol
- Bacto agar (DIFCO, USA)
- Disodium hydrogen phosphate (Sigma-Aldrich[®], USA)
- Ethidium bromide
- Ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA (0.5 M, pH 8.0)
- Glacial acetic acid
- Glycerol
- Potasium chloride
- Potassium dihydrogen phosphate
- Sodium chloride
- Sodium hydroxide
- Tris base
- Tryptone (DIFCO, USA)
- Yeast extraction (DIFCO, USA)

ยาปฏิชีวนะ

- ampicillin (Sigma-Aldrich[®], USA)
- spectinomycin dihydrochloride (Sigma-Aldrich[®], USA)

ชุดสำเร็จรูปสำหรับสกัด total RNA

- Total RNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan)

สารเคมีสำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

- *Pfu* DNA Polymerase and PCR mixture (Fermentas, Canada)
- 10 mM dNTPs Mix (Fermentas, Canada)

สารเคมีสำหรับ agarose gel electrophoresis

- Agarose S (Molecular grade)
- DNA ladder: Generuler™ 100 bp and 100 bp plus DNA ladder (Fermentus, Canada)
- Ethidium bromide (Sigma, USA)
- Loading dye (Fermentas, Canada)
- 1X TAE Buffer

ชุดสำเร็จรูปสำหรับ purify PCR product จาก agarose gel

- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany)

ชุดสำเร็จรูปสำหรับการโคลนยีน

- PCR[®] 8/GW/TOPO[®] TA Cloning vector (Invitrogen, USA)
- QIAquick Plasmid Miniprep Extraction Kit (QIAGEN, Germany)
- SuperScript™ III First-Strand (Invitrogen, USA)

สารเคมีสำหรับการ subclone ด้วย *EcoRI* restriction enzyme (Promega, USA)

- *EcoRI* restriction enzyme
- Ligase 10X buffer
- T4 DNA ligase (Promega, USA)

expression vector

- pGEX-4T-2 vector (Pharmacia, USA)

competent cell

- *E. coli* สายพันธุ์ JM109



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Luria –Bertani (LB) medium with spectinomycin dihydrochloride

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
Sodium chloride	10	g
DW to	1,000	ml

ผสมจนสารละลายเข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 5 N sodium hydroxide แล้ว autoclave 121°C 15 นาที รอให้อุณหภูมิ LB broth เป็น 55 °C ใส่ 10 mg/ml filter-sterilized spectinomycin dihydrochloride 10 ml

ในกรณีที่ต้องการเตรียม LB agar ใส่ 20 g agar ก่อน autoclave

Luria –Bertani (LB) medium with ampicillin

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
Sodium chloride	10	g
DW to	1,000	ml

ผสมจนสารละลายเข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 5 N sodium hydroxide แล้ว autoclave 121°C 15 นาที รอให้อุณหภูมิ LB broth เป็น 55 °C ใส่ 10 mg/ml filter-sterilized ampicillin 10 ml

ในกรณีที่ต้องการเตรียม LB agar ใส่ 20 g agar ก่อน autoclave

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม Phosphate buffer solution (PBS)

Sodium chloride	8.00	g
Potassium chloride	0.20	g
Disodium hydrogen phosphate	1.44	g
Potassium dihydrogen phosphate	0.24	g

การเตรียม 10XTris-acetate buffer (TAE)

Tris base	48.4	g
Glacial acetic acid	11.4	ml
0.5 M EDTA pH 8.0	20.0	ml
DW to	1,000.0	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้ว autoclave 121°C 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของ PEDV-M gene สำหรับเตรียม primers

สายพันธุ์ที่รายงานในประเทศไทย

GenBank: EU542418.1

Porcine epidemic diarrhea virus clone M_NIAH100542_08 membrane protein (M) gene, complete (681 bp)

gij|169793738|gb|EU542418.1| Porcine epidemic diarrhea virus clone M_NIAH100542_08 membrane protein (M) gene, complete cds

PEDV-M primer (forward)

ATGTCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAACTGGAATTC
 CACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTCAGTATGGCCATTACAAGT
 ACTCTGCGTTCCTTGTATGGTGTCAAGATGGCTATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGT
 TAGCACTGTCACCTTTTGGATGCATGGGCTAGCTTTCAGGTCAATTGGGTCTTTTTTGCTT
 TCAGCATCCTTATGGCTTGCATCACTCCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCA
 TTCGGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTCAATCCTGAAACAGACGCGCT
 TCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCAGTGCTTGGAGCACCAACT
 GGTGTAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGCTTGTAGATGGCTATAAGGTTGCTAC
 TGGCGTACAGGTAAGTCAATTACCTAATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACA
 ATTGTCTACGGACGTGTTGGTCGTTCAAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTT
 CTATGTCCGGTCCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTTCGGTTCTC
 ACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA

← PEDV-M primer (reverse)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สายพันธุ์ที่รายงานในประเทศเกาหลีใต้

GenBank: DQ845249

Porcine epidemic diarrhea virus isolate Chinju99 membrane protein (M) gene, complete (681 bp)

gi|111434289|gb|DQ845249.1| Porcine epidemic diarrhea virus isolate Chinju99 membrane protein (M) gene, complete cds

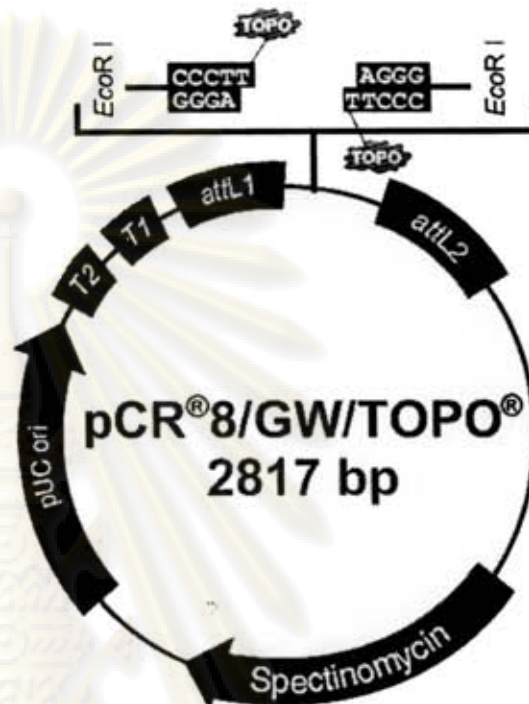
PEDV-M primer (forward)

ATGCTAACGGTTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAACTGTAATTC
 ACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTCAGTATGGCCATTACAAGTA
 CTCTGCGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCTATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTT
 GGCACGTCACTTTTTGACGCATGGGCTAGCTTCCAGGTCAACTGGGTCTTTTTCGCTT
 TCAGCATCCTTATGGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTATTTTGTCAATAGCA
 TTCGTTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTTCAATCCTGAACTGACGCGCT
 TCTCACTACTTCTGTGATGGGCCGACAGGTCTGCATTCCATTGCTTGGAGCACCAACT
 GGTGTAACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGCTTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTA
 CTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACCTAATTTTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAAC
 AATTGTCTACGTACGTGTTGGTCGTTTCAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCAT
 TCTATGTCCGGTCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTGCGGTTCT
 CACAGATAGCGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA

← PEDV-M primer (reverse)

ภาคผนวก ง

pCR[®] 8/GW/TOPO[®] vector map



Comments for pCR[®]8/GW/TOPO[®]
2817 nucleotides

- rnnB* T2 transcription termination sequence: bases 268-295
- rnnB* T1 transcription termination sequence: bases 427-470
- M13 forward (-20) priming site: bases 537-552
- attL1*: bases 569-668
- GW1 priming site: bases 607-631
- TOPO[®] recognition site 1: bases 678-682
- TOPO[®] recognition site 2: bases 683-687
- attL2*: bases 696-795
- GW2 priming site: bases 733-757
- T7 Promoter/priming site: 812-831 (c)
- M13 reverse priming site: bases 836-852
- Spectinomycin promoter: bases 930-1063
- Spectinomycin resistance gene (*Spn^R*): 1064-2074
- pUC origin: bases 2141-2814

(c) = complementary sequence

501 TAACGCTAGC ATGGATGTTT TCCAGTCAC GAGGTTGTA AAGCAGGCC AGTCTTAAGC TCGGGCCCCA AATAATGATT
attL1 GW1 priming site

581 TTATTTGAC TGATAGTGAC CTGTGGTTG CAACAATTC ATGAGCAATG CTTTTTATA ATGCCAACT TTG TAC AAA
EcoRI EcoRI AAC ATG TTT Leu Tyr Lys

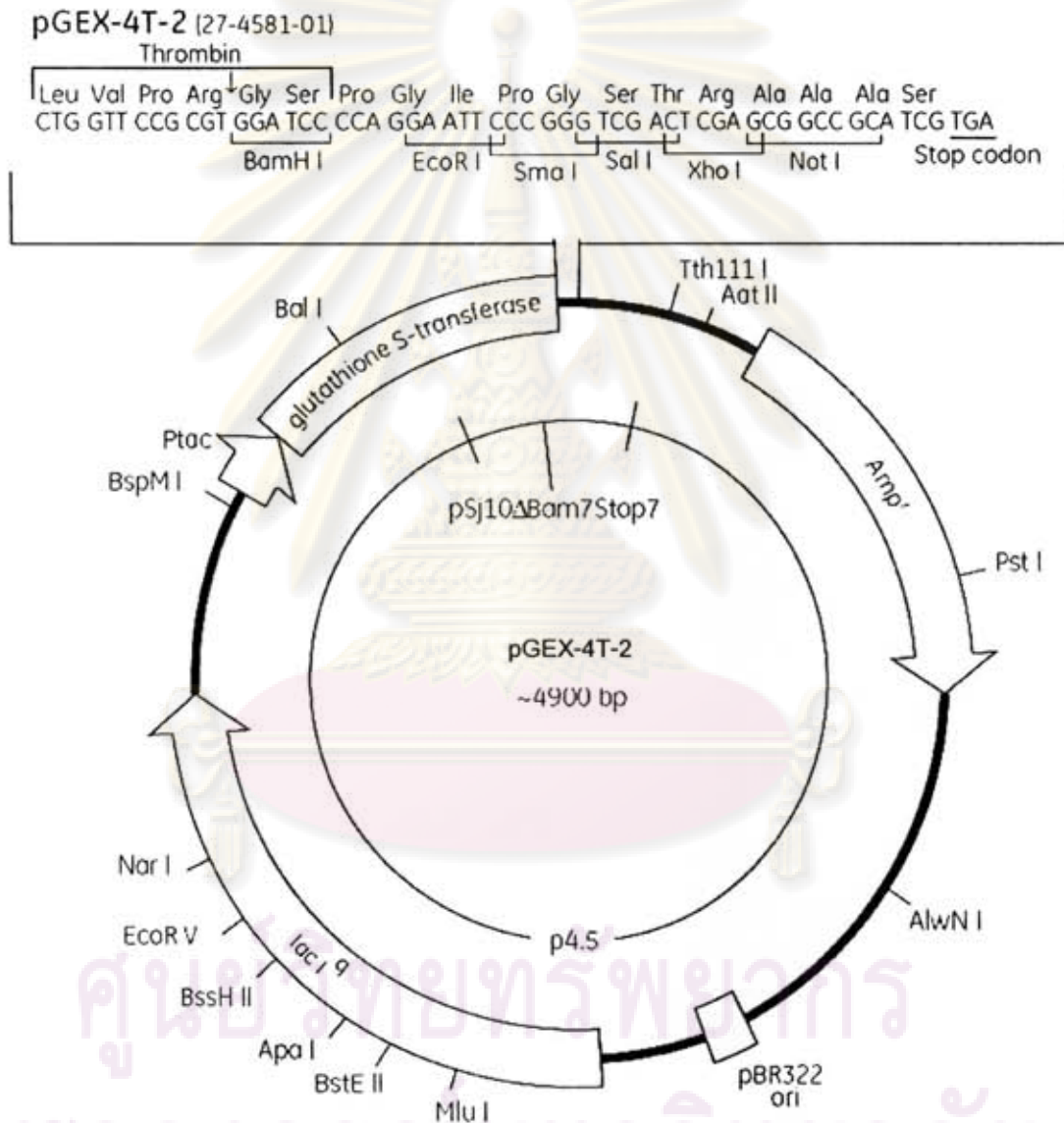
659 AAA GCA GGC TCC GAA TTC GCC CTT PCR product AAG GGC GAA TTC GAC CCA GCT TTC TTG TAC
 TTT CGT CCG AGG CTT AAG GGG GAA TTC CCG CTT AAG CTG GGT CGA AAG AAC ATG
attL2 GW2 priming site Lys Ala Gly Ser Glu Phe Gly Leu Lys Gly Glu Phe Asp Pro Ala Phe Leu Tyr

713 AAAGTTGG CATTATAAAA AATAATTGCT CATCAATTG TTGCAACGAA CAGGTCACTA TCAGTCAAAA TAAATCATT
T7 promoter/priming site M13 reverse priming site

791 ATTTGTCATC CAGCCTATAT CCCTATAGT GAGTGTATT ACATGGTCAT AGTTGTTTC TCAGAGCTCT

ภาคผนวก ๑

pGEX-4T-2 vector map



ภาคผนวก จ

ลำดับเบส และ deduced amino acid ของ CU/VET/MED/001PEDV-M gene

>CU/VET/MED/001PEDV-M gene

1	ATG TCT AAC GGT TCT ATT CCC GTT GAT GAG GTG ATT CAA CAC CTT	45
1	Met Ser Asn Gly Ser Ile Pro Val Asp Glu Val Ile Gln His Leu	15
46	AGA AAC TGG AAT TTC ACA TGG AAT ATC ATA CTG ACG ATA CTA CTT	90
16	Arg Asn Trp Asn Phe Thr Trp Asn Ile Ile Leu Thr Ile Leu Leu	30
91	GTA GTG CTT CAG TAT GGC CAT TAC AAG TAC TCT GCG TTC TTG TAT	135
31	Val Val Leu Gln Tyr Gly His Tyr Lys Tyr Ser Ala Phe Leu Tyr	45
136	GGT GTC AAG ATG GCT ATT CTA TGG ATA CTT TGG CCT CTT GTG TTA	180
46	Gly Val Lys Met Ala Ile Leu Trp Ile Leu Trp Pro Leu Val Leu	60
181	GCA CTG TCA CTT TTT GAT GCA TGG GCT AGC TTT CAG GTC AAT TGG	225
61	Ala Leu Ser Leu Phe Asp Ala Trp Ala Ser Phe Gln Val Asn Trp	75
226	GTC TTT TTT GCT TTC AGC ATC CTT ATG GCT TGC ATC ACT CTT ATG	270
76	Val Phe Phe Ala Phe Ser Ile Leu Met Ala Cys Ile Thr Leu Met	90
271	CTG TGG ATA ATG TAC TTT GTC AAT AGC ATT CGG TTG TGG CGC AGG	315
91	Leu Trp Ile Met Tyr Phe Val Asn Ser Ile Arg Leu Trp Arg Arg	105
316	ACA CAT TCT TGG TGG TCT TTC AAT CCT GAA ACA GAC GCG CTT CTC	360
106	Thr His Ser Trp Trp Ser Phe Asn Pro Glu Thr Asp Ala Leu Leu	120
361	ACT ACT TCT GTG ATG GGC CGA CAG GTC TGC ATT CCA GTG CTT GGA	405
121	Thr Thr Ser Val Met Gly Arg Gln Val Cys Ile Pro Val Leu Gly	135
406	GCA CCA ACT GGT GTA ACG CTA ACA CTC CTT AGT GGT ACA TTG CTT	450
136	Ala Pro Thr Gly Val Thr Leu Thr Leu Leu Ser Gly Thr Leu Leu	150
451	GTA GAG GGC TAT AAG GTT GCT ACT GGC GTA CAG GTA AGT CAA TTA	495
151	Val Glu Gly Tyr Lys Val Ala Thr Gly Val Gln Val Ser Gln Leu	165
496	CCT AAT TTC GTC ACA GTC GCC AAG GCC ACT ACA ACA ATT GTC TAC	540
166	Pro Asn Phe Val Thr Val Ala Lys Ala Thr Thr Thr Ile Val Tyr	180
541	GGA CGT GTT GGT CGT TCA GTC AAT GCT TCA TCT GGC ACT GGT TGG	585
181	Gly Arg Val Gly Arg Ser Val Asn Ala Ser Ser Gly Thr Gly Trp	195
586	GCT TTC TAT GTC CGG TCC AAA CAC GGC GAC TAC TCA GCT GTG AGT	630
196	Ala Phe Tyr Val Arg Ser Lys His Gly Asp Tyr Ser Ala Val Ser	210
631	AAT CCG AGT TCG GTT CTC ACA GAT AGT GAG AAA GTG CTT CAT TTA	675
211	Asn Pro Ser Ser Val Leu Thr Asp Ser Glu Lys Val Leu His Leu	225
676	GTC TAA	681
226	Val End	


```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                110       120       130       140       150
CU/VET/MED/001 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
Thai EU542415 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTCT CAAGATGGCT
Thai EU542416 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
Thai EU542417 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
Thai EU542418 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
Thai EU542419 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
Thai EU581711 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTCT CAAGATGGCT
Thai EU581712 AGTATGGCCA TCACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
China AY653205 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
China AY608890 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGAGT CAAGATGGCT
China EF185992 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
China EU031893 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCC
China EU033962 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
China EU033963 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
China EU033964 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
China EU033965 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
China EU033966 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
China EU033967 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
Korea AF019893 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
Korea AF015888 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
Korea DQ845249 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
Japan D89752 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGCGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
CV777 AF353511 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
CV777 NC003436 AGTATGGCCA TTACAAGTAC TCTGTGTTCT TGTATGGTGT CAAGATGGCT
***** * ***** ***** ***** * *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                160       170       180       190       200
CU/VET/MED/001 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACTGTCAC TTTTGTATGC
Thai EU542415 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TCTTTGACGC
Thai EU542416 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACTGTCAC TTTTGTATGC
Thai EU542417 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACTGTCAC TTTTGTATGC
Thai EU542418 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACTGTCAC TTTTGTATGC
Thai EU542419 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTA GCACTGTCAC TTTTGTATGC
Thai EU581711 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAT TTTTCGACGC
Thai EU581712 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAT TTTTCGACGC
China AY653205 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTATGC
China AY608890 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTCG GCACTGTCAC TCTTTGACGC
China EF185992 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTACGC
China EU031893 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTATGC
China EU033962 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTATCAC TTTTGTATGC
China EU033963 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTATCAC TTTTGTATGC
China EU033964 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTATGC
China EU033965 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTATGC
China EU033966 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTATCAC TTTTGTATGC
China EU033967 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTATGC
Korea AF019893 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTACGC
Korea AF015888 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTACGC
Korea DQ845249 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTACGC
Japan D89752 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTACGC
CV777 AF353511 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTACGC
CV777 NC003436 ATTCTATGGA TACTTTGGCC TCTTGTGTTG GCACTGTCAC TTTTGTACGC
***** ***** ***** ***** * * * * *

```


	210	220	230	240	250
CU/VET/MED/001	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ATTGGGTCTT	TTTTGCTTTC	AGCATCCTTA
Thai EU542415	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
Thai EU542416	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ATTGGGTCTT	TTTTGCTTTC	AGCATCCTTA
Thai EU542417	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ATTGGGTCTT	TTTTGCTTTC	AGCATCCTTA
Thai EU542418	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ATTGGGTCTT	TTTTGCTTTC	AGCATCCTTA
Thai EU542419	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ATTGGGTCTT	TTTTGCTTTC	AGCATCCTTA
Thai EU581711	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
Thai EU581712	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
China AY653205	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTTGCTTTC	AGCATCCTTA
China AY608890	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ACTGGGTCTC	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
China EF185992	ATCGCCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
China EU031893	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
China EU033962	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
China EU033963	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
China EU033964	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ATTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
China EU033965	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
China EU033966	ATGGGCTAGC	TTTCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
China EU033967	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
Korea AF019893	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
Korea AF015888	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
Korea DQ845249	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
Japan D89752	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
CV777 AF353511	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
CV777 NC003436	ATGGGCTAGC	TTCCAGGTCA	ACTGGGTCTT	TTTCGCTTTC	AGCATCCTTA
	** * *****	** * *****	* * * * * *	*** * * * * *	*****

	260	270	280	290	300
CU/VET/MED/001	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTACTTTGT	CAATAGCATT
Thai EU542415	TGGCCTGCAT	CACTCTTATG	CTGCGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
Thai EU542416	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTACTTTGT	CAATAGCATT
Thai EU542417	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTACTTTGT	CAATAGCATT
Thai EU542418	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTACTTTGT	CAATAGCATT
Thai EU542419	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTACTTTGT	CAATAGCATT
Thai EU581711	TGGCCTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
Thai EU581712	TGGCCTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
China AY653205	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTACTTTGT	CAATAGCATT
China AY608890	TGGCTTGCAT	CACTCTTACG	CTGTGGATAA	TGTACTTTGT	CAATAGCATT
China EF185992	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
China EU031893	TGGCTTGCAT	CACCCCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
China EU033962	TGGCTTGCAT	CACCCCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
China EU033963	TGGCTTGCAT	CACCCCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
China EU033964	TGGCTTGCAT	CACCCCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
China EU033965	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
China EU033966	TGGCTTGCAT	CACCCCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
China EU033967	TGGCTTGCAT	CACCCCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
Korea AF019893	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
Korea AF015888	TCGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
Korea DQ845249	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
Japan D89752	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
CV777 AF353511	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
CV777 NC003436	TGGCTTGCAT	CACTCTTATG	CTGTGGATAA	TGTATTTTGT	CAATAGCATT
	* * * * *	*** * * * *	* * * * *	**** * * * *	*****

	310	320	330	340	350
CU/VET/MED/001	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACAGA
Thai EU542415	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAACC	CTGAAACTGA
Thai EU542416	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACAGA
Thai EU542417	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACAGA
Thai EU542418	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACAGA
Thai EU542419	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACAGA
Thai EU581711	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
Thai EU581712	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
China AY653205	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACAGA
China AY608890	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACAGA
China EF185992	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
China EU031893	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
China EU033962	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
China EU033963	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
China EU033964	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
China EU033965	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
China EU033966	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
China EU033967	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
Korea AF019893	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
Korea AF015888	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
Korea DQ845249	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
Japan D89752	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
CV777 AF353511	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
CV777 NC003436	CGGTTGTGGC	GCAGGACACA	TTCTTGGTGG	TCTTTCAATC	CTGAAACTGA
	*****	*****	*****	*****	*****

	360	370	380	390	400
CU/VET/MED/001	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
Thai EU542415	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTTTGC	ATTCCAGTGC
Thai EU542416	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
Thai EU542417	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
Thai EU542418	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
Thai EU542419	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
Thai EU581711	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTTTGC	ATTCCAGTGC
Thai EU581712	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTTTGC	ATTCCAGTGC
China AY653205	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
China AY608890	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
China EF185992	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
China EU031893	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
China EU033962	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
China EU033963	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
China EU033964	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
China EU033965	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
China EU033966	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
China EU033967	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
Korea AF019893	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
Korea AF015888	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
Korea DQ845249	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCATTGC
Japan D89752	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
CV777 AF353511	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
CV777 NC003436	CGCGTTTCTC	ACTACTTCTG	TGATGGGCCG	ACAGGTCTGC	ATTCCAGTGC
	*****	*****	*****	*****	*****

	410	420	430	440	450
CU/VET/MED/001	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
Thai EU542415	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACGTTGCTT
Thai EU542416	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
Thai EU542417	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
Thai EU542418	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
Thai EU542419	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
Thai EU581711	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACGTTGCTT
Thai EU581712	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACGTTGCTT
China AY653205	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
China AY608890	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
China EF185992	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
China EU031893	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
China EU033962	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
China EU033963	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
China EU033964	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
China EU033965	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
China EU033966	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
China EU033967	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
Korea AF019893	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
Korea AF015888	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
Korea DQ845249	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
Japan D89752	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
CV777 AF353511	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
CV777 NC003436	TTGGAGCACC	AACTGGTGTA	ACGCTAACAC	TCCTTAGTGG	TACATTGCTT
	*****	**	*****	*****	*** *****

	460	470	480	490	500
CU/VET/MED/001	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Thai EU542415	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Thai EU542416	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Thai EU542417	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Thai EU542418	GTAGATGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Thai EU542419	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Thai EU581711	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Thai EU581712	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
China AY653205	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
China AY608890	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
China EF185992	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
China EU031893	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
China EU033962	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
China EU033963	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
China EU033964	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
China EU033965	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTGCCTGA
China EU033966	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
China EU033967	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Korea AF019893	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Korea AF015888	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Korea DQ845249	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
Japan D89752	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
CV777 AF353511	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
CV777 NC003436	GTAGAGGGCT	ATAAGGTTGC	TACTGGCGTA	CAGGTAAGTC	AATTACCTAA
	*****	****	*****	*****	***** ** *

	510	520	530	540	550
CU/VET/MED/001	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
Thai EU542415	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
Thai EU542416	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
Thai EU542417	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
Thai EU542418	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
Thai EU542419	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
Thai EU581711	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
Thai EU581712	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
China AY653205	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAT	GGACGTGTTG
China AY608890	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
China EF185992	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
China EU031893	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAT	GGACGTGTTG
China EU033962	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAT	GGACGTGTTG
China EU033963	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAT	GGACGTGTTG
China EU033964	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAT	GGACGTGTTG
China EU033965	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAT	GGACGTGTTG
China EU033966	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAT	GGACGTGTTG
China EU033967	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAT	GGACGTGTTG
Korea AF019893	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
Korea AF015888	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
Korea DQ845249	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GTACGTGTTG
Japan D89752	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
CV777 AF353511	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
CV777 NC003436	TTTCGTCACA	GTCGCCAAGG	CCACTACAAC	AATTGTCTAC	GGACGTGTTG
	*****	***	*****	*****	* *****

	560	570	580	590	600
CU/VET/MED/001	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
Thai EU542415	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCC	TCTAGCACTG	GTTGGGCTTT	TTATGTCCGG
Thai EU542416	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
Thai EU542417	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
Thai EU542418	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
Thai EU542419	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
Thai EU581711	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCC	TCTAGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
Thai EU581712	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCC	TCTAGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
China AY653205	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	TTATGTCCGG
China AY608890	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACGG	GTTGGGCTTT	CTATGTACGG
China EF185992	GTCGTTCAAGT	CCCGGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
China EU031893	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
China EU033962	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
China EU033963	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
China EU033964	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
China EU033965	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
China EU033966	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
China EU033967	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
Korea AF019893	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCATT	CTATGTCCGG
Korea AF015888	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCATT	CTATGTCCGG
Korea DQ845249	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCATT	CTATGTCCGG
Japan D89752	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCATT	CTATGTCCGG
CV777 AF353511	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
CV777 NC003436	GTCGTTCAAGT	CAATGCTTCA	TCTGGCACTG	GTTGGGCTTT	CTATGTCCGG
	*****	*	*****	*****	*****

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมนัน วงศ์เสรีพิพัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2526 สำเร็จชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาระดับปริญญาโทบัณฑิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย