

การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนจากบางส่วนของยีนยูนิคซอต 8 ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม

นาย ศุภฤกษ์ นันทวัน ณ ออยุธยา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN FROM A PARTIAL OF
PSEUDORABIES VIRUS UNIQUE SHORT 8 GENE

Mr. Suparlark Nuntawan Na Ayudhya

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

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนจากบางส่วนของยีนยูนิคซ์ออก
8 ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม

โดย

นาย ศุภฤกษ์ นันทวัน ณ อยุธยา

สาขาวิชา

พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพูน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา ไสละสูต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

(นายสัตวแพทย์ ดร.พรชิต อัสวชีพ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.กัมพล แก้วเกษ)

ศุภฤกษ์ นันทวัน ณ ออยุธยา : การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากบางส่วนของยีนยูนิคซ็อด 8 ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN FROM A PARTIAL OF PSEUDORABIES VIRUS UNIQUE SHORT 8 GENE) อ.ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: ศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, 72 หน้า.

โรคพิษสุนัขบ้าเทียมเป็นโรคประจำถิ่นของประเทศไทย และก่อความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของประเทศไทยอยู่เป็นระยะๆ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโปรตีนจากยีนยูนิคซ็อด 8 ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมเพื่อนำไปพัฒนาเป็นชุดทดสอบโรคพิษสุนัขบ้าเทียมชนิดอิมมูโนโครมาโตกราฟีฟีก โดยการศึกษานี้ใช้ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมสายพันธุ์ 8NP74 นำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 156 ถึง 714 ของยีนยูนิคซ็อด 8 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส นำ ผลผลิต gE fragment (ขนาด 573 คู่เบส) ดังกล่าวไปโคลนเข้าพลาสมิด pGEM-Teasy ให้ชื่อเป็น พลาสมิด gE pGEM-T แล้วใส่เข้าไปในแบคทีเรียอีโคไลสายพันธุ์ JM109 ทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียแล้วสกัดพลาสมิด gE pGEM-T ออกมาจากแบคทีเรียและทำการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI ก่อนทำการเชื่อมต่อกับส่วนของยีนยูนิคซ็อด 8 ที่ถูกตัดออกมาเข้าสู่พลาสมิด pGEX 5x-3 ซึ่งใช้เป็น expression vector โดยใช้แบคทีเรียอีโคไลสายพันธุ์ Rosetta DE3 plysS เป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนทำการกระตุ้นแบคทีเรียให้ทำการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน gE นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ไปทดสอบ Western immunoblotting analysis โดยใช้ซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกกับไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมด้วยวิธีอีไลซา (HerdCheck Anti-ADV gpl, IDEXX, USA) และนำไปเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดจากแบคทีเรียควบคุม พบการติดสีน้ำตาลที่แถบโปรตีนขนาดประมาณ 47 กิโลดาลตัน นำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบ Dot blot analysis พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกกับไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมด้วยวิธีอีไลซาได้ จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน gE จากยีนยูนิคซ็อด 8 ได้และมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดทดสอบโรคพิษสุนัขบ้าเทียมชนิดอิมมูโนโครมาโตกราฟีฟีกได้

ภาควิชา.....พยาธิวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา 2553.....

5275569831 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEYWORDS : PSEUDORABIES VIRUS / GLYCOPROTEIN E / RECOMBINANT PROTEIN / IMMUNOCHROMATOGRAPHIC

SUPARLARK NUNTAWAN NA AYUDHYA: THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN FROM A PARTIAL OF PSEUDORABIES VIRUS UNIQUE SHORT 8 GENE. THESIS ADVISOR: PROF. ROONGROJE THANAWONGNUWECH, Ph.D., 72 pp.

Aujeszky's disease or Pseudorabies is an endemic disease causing economic losses to the Thai swine industries. The objective of this study is to produce recombinant protein from unique short 8 gene (Us 8) of pseudorabies virus and to develop immunochromatographic strip test for detecting pseudorabies-infected pigs. Nucleotides 156 to 174 of a wild type pseudorabies virus (8NP74) Us 8 gene were amplified by using polymerase chain reaction (PCR) and the PCR product was cloned into pGEM-Teasy plasmid and named gE pGEM-T. This plasmid was transformed into *E. coli* JM109 strain. After culturing, gE pGEM-T plasmid was extracted and cut with enzyme EcoRI. The cut sequence was cloned into pGEX 5x-3 expression vector. *E. coli* rosetta DE3 plysS was used for producing gE recombinant protein. Nucleotide sequence was again checked before gE recombinant protein production. Recombinant protein was tested by western immunoblotting analysis using known ELISA positive swine serum (HerdCheck Anti-ADV gpl, IDEXX, USA) and compared to the protein from the control bacteria. The result showed reaction at protein size around 47 kDa. Recombinant protein was purified and tested using dot blot analysis. Positive reaction to known pseudorabies positive serum was demonstrated. From this study, gE recombinant protein was successfully produced using *E. coli* and potentially used for pseudorabies virus immunochromatographic test development.

Department :Veterinary Pathology.....

Student's Signature

Field of Study :Veterinary Pathobiology.....

Advisor's Signature

Academic Year :2010.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รัช .น.สพ.ดร.กัมพล แก้วเกษ และอาจารย์ น.สพ. ดร.พรชิต อัครวชิพ ซึ่งได้ให้ความรู้ และคำแนะนำ ตลอดจนความกรุณา ในการช่วยตรวจทานและแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คุณพอจิต ชูใจ และบุคคลากรที่ให้ความช่วยเหลือในด้านตัวอย่างไวรัส ซีรัม สถานที่ในการทำวิจัย สารเคมี อุปกรณ์ และความช่วยเหลือ ในด้านการอำนวยความสะดวก ต่างๆ ให้ วิทยานิพนธ์นี้ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและบุคคลากรที่ให้ความช่วยเหลือในด้านสถานที่ในการทำวิจัย และ ความช่วยเหลือต่างๆ

ขอขอบคุณ น.สพ. รุ่งธรรม เกษโกวิท นายปิยะ วงศ์ญาณิน สพ.ญ.สุภัทตรา จิตติ มณี และนิตติบ ณฑิตศึกษา พยาธิชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ

บทที่

1	บทนำ.....	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
	2.1 ความเป็นมาและระบาดวิทยาของโรคพิษสุนัขบ้าเทียม.....	4
	2.2 ไวรัสวิทยา.....	5
	2.3 พยาธิวิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน.....	9
	2.4 การวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าเทียม.....	12
	2.5 การควบคุมและกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าเทียม.....	14
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
	3.1 ไวรัส.....	16
	3.2 ซีรัมสุกร.....	16
	3.3 การสกัดดีเอ็นเอของไวรัส.....	16
	3.4 การเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	16
	3.5 การโคลน (clone) และการสกัดพลาสมิด (plasmid).....	18
	3.6 การตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ.....	20
	3.7 การตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากพลาสมิด.....	20

บทที่	หน้า
3.4 การเชื่อมต่อ gE fragments เข้าสู่พลาสมิด	22
3.5 การย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ <i>E. coli</i> ที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ..	23
3.6 การกระตุ้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน	23
3.7 การตรวจหาขนาดรีคอมบิแนนท์โปรตีน	23
3.8 การทดสอบด้วยวิธี western immunoblotting	24
3.9 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์	24
3.10 การวัดปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน	25
3.11 การทดสอบ dot blot analysis	25
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	27
4.1 การเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสส่วน gE ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส	27
4.2 การโคลน gE fragment เข้าสู่ pGEX 5X-3 vector และการตรวจสอบทิศทาง	27
4.3 การกระตุ้นโปรตีนและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์	28
4.4 ผลการวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้	29
4.5 การทดสอบ dot blot analysis	29
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	57
5.1 สรุปผลการวิจัย	57
5.2 อภิปรายผลการวิจัย	58
5.3 ข้อเสนอแนะ	63
รายการอ้างอิง	48
ภาคผนวก	57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส.....	31
2	สูตรการเตรียม 12 % Separating และ 5 % Stacking polyacrylamide gel.....	64

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม.....	6
2	การผ่านเข้าเซลล์ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมในเซลล์.....	7
3	กระบวนการการผ่านเข้าเซลล์ของไวรัสกลุ่มอัลฟาเฮอริปีส์ไวรัส.....	8
4	เส้นทางการติดเชื้อเข้าสู่สมองของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม.....	10
5	กลไกที่ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมใช้ในการแพร่เชื้อแบบเซลล์ต่อเซลล์.....	13
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมจากประเทศมาเลเซีย.....	19
7	แบบจำลองของพลาสมิด pGEX 5X-3.....	21
8	กรอบแนวคิดการวิจัย.....	26
9	gE fragment ที่แสดงบน 1.5% agarose gel electrophoresis Ladder.....	30
10	อไลน์เมนทส์ส่วน gE ของพลาสมิด gE pGEM-T และ FJ176390 Malaysia.....	32
11	แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ของ gE pGEM-T เปรียบเทียบกับ Us8 ยีนจากไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมของประเทศต่างๆ.....	33
12	การตรวจสอบทิศทางของ gE fragment ภายใน gE pGEX 5x-3.....	34
13	การตรวจสอบทิศทางของ gE fragment ภายใน gE pGEX 5x-3 ของแบคทีเรีย gE pGEX 5x-3 Ros.....	35
14	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด gE pGEX 5x-3.....	36
15	ลำดับกรดอะมิโนเฉพาะส่วน gE ที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด gE pGEX 5x-3.....	37
16	สัดส่วนชนิดกรดอะมิโนเฉพาะส่วน gE ที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ของพลาสมิด gE pGEX 5x-3.....	38
17	SDS-PAGE ของรีคอมบิแนนท์ของโปรตีนที่ผลิตจาก gE pGEX 5x-3 Ros.....	39
18	Western blot analysis ของรีคอมบิแนนท์ของโปรตีนที่ผลิตจาก gE pGEX 5x-3 Ros.....	40
19	SDS-PAGE ของรีคอมบิแนนท์ของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.....	41
20	Western blot analysis ของรีคอมบิแนนท์ของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.....	42
21	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและ optical density.....	43
22	dot blot analysis.....	44

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (Aujeszky's or Pseudorabies disease) เป็นโรคระบาดในสุกรซึ่งเคยก่อความเสียหายรุนแรงต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก ลูกสุกรดุนนมที่ป่วยเป็นโรคนี้จะมีอาการทางประสาท พบการนั่งแบบสุนัข (dog sitting) ตากรอกไปมา (nystagmus) หลังเหยียดแอ่น (opisthotonos) ชักตะกาย (paddle) สุกรที่แสดงอาการทางประสาทจะตายอย่างรวดเร็วภายใน 24-36 ชั่วโมง อัตราการตายในสุกรดุนนมอาจสูงถึงร้อยละ 100 ในสุกรขุนพบอาการทางระบบทางเดินหายใจ หอบ ปอดอักเสบ ปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) อัตราการป่วยสูงแต่อัตราการตายต่ำ ในสุกรอุมท้องจะพบการแท้งได้ สุกรที่ไม่ตายจะกลับสู่สภาวะปกติ แต่จะพบการติดเชื้อไวรัสแบบแฝงติดทน (persistent infection) เป็นพาหะและสามารถปล่อยเชื้อ (shedding) ออกมาเป็นระยะๆ และติดกลับไปยังสุกรที่ไวรับโรคได้ ซึ่งจะทำให้ โรคนี้วนเวียนอยู่ในฟาร์มเรื่อยๆ โดยจะมีการระบาดเป็นระยะๆ ในปัจจุบันโรคพิษสุนัขบ้าเทียมมีวิธีควบคุม และป้องกันโรคที่ได้ผลดีคือ การทำวัคซีนที่มีการตัดยีน (gene-deleted vaccine) ซึ่งสามารถจำแนกภูมิคุ้มกันที่สุกรสร้างต่อการติดเชื้อโดยธรรมชาติและภูมิคุ้มกันที่เกิดจากวัคซีนได้ ดังนั้นจึงสามารถกำจัดโรคด้วยวิธีการทดสอบและคัดทิ้งได้ (test and removal) (Komaromi and Szabo, 2005) โดยจะทำการคัดทิ้งสุกรที่ให้ผลตรวจแอนติบอดีเป็นบวกต่อการแสดงออกของยีนที่ไม่มีในวัคซีน ซึ่งหมายถึงสุกรที่เคยติดเชื้อไวรัสทางธรรมชาติ (natural infection) จะมีแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าว โดยจะทำการตรวจทั้งสุกรพันธุ์ในฝูงและสุกรทดแทนที่จะรับเข้ามาใหม่ ทำให้ในหลายประเทศสามารถกำจัดโรคและประกาศเป็นเขตปลอดโรคพิษสุนัขบ้าเทียมแล้ว เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศออสเตรเลีย เป็นต้น และด้วยกระบวนการทดสอบและคัดทิ้งที่มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพนี้ ร่วมกับนโยบายที่เหมาะสมของภาครัฐ ทำให้การกำจัดโรคในหลายประเทศในยุโรปมีความก้าวหน้าเป็นอย่างยิ่ง สำหรับสถานการณ์โรคพิษสุนัขบ้าเทียมในประเทศไทยนั้น จัดได้ว่าเป็นโรคที่บุคคลากรในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรไม่ค่อยให้ความสำคัญนัก แต่จากการสำรวจสุกรสาวที่คัดทิ้งเนื่องจากปัญหาทางระบบสืบพันธุ์พบว่ามีร้อยละ 28 ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบแอนติบอดีต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (Tummaruk and Tantilertcharoen, 2008) จึงเห็นได้ว่าโรคพิษสุนัขบ้าเทียมนี้มีส่วนสร้างความเสียหายอยู่ในระดับที่สูงพอสมควรในประเทศไทยแต่ไม่ค่อยได้รับความสนใจจากทั้งภาครัฐและเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกร

โดยทั่วไปแล้ว การควบคุมและกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าเทียมโดยการใช้วัคซีนทั้งชนิดเชื้อเป็น (modified live vaccine) และทั้งชนิดเชื้อตาย (killed vaccine) สามารถปฏิบัติได้ในภาคสนามตามความเหมาะสมของความชุกของโรคและตามคำแนะนำของสัตวแพทย์ ซึ่งวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าเทียมเป็นวัคซีนที่มีการตัดยีนบางส่วนของไวรัสที่ไม่จำเป็นต่อการแบ่งตัวของไวรัส เช่น Thymidine kinase (TK), ยูนิคซีอิต 44 (Unique short 44 ควบคุมการสร้าง glycoprotein C หรือ gC) หรือ ยูนิคซีอิต 8 (ควบคุมการสร้าง glycoprotein E หรือ gE) เป็นต้น โดยสุกรที่ได้รับวัคซีนจะสร้างแอนติบอดีที่ป้องกันโรค (protective immune) แต่จะไม่สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนของยีนส่วนที่ถูกตัดทิ้งไปของวัคซีน ทำให้สามารถคัดแยกสุกรที่ได้รับวัคซีนออกจากสุกรที่ติดเชื้อได้ โดยปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า เทียมนั้นสามารถตรวจแอนติบอดีต่อโปรตีน gE โดยวิธี competitive enzyme linked immunosorbant assays (cELISA) (IDEXX, USA) ซึ่งต้องส่งตัวอย่าง ซึ่รวมไปทำการตรวจในห้องปฏิบัติการ และได้ผลตรวจภายใน 2-5 วัน ทำให้ไม่สะดวกในการตรวจคัดกรองสุกร ทดแทนหรือสุกรพันธุ์ที่เป็นพาหะอยู่ในฝูงซึ่ง อาจจะไม่ทัน่วงที่ทำให้เกิดการแพร่โรคในระหว่างการกักโรคก่อนที่จะนำสุกรเข้าฝูงหรือจะคัดสุกร พาหะทิ้ง โดยเฉพาะในพื้นที่ที่เกษตรกรทั่วไปโดยเฉพาะรายย่อยไม่สะดวกในการนำตัวอย่างมาส่ง ในห้องปฏิบัติการ จึงน่าจะเป็นอุปสรรคหนึ่งที่ทำให้ความก้าวหน้าในการกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในประเทศไทยเป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร

จากปัญหาดังกล่าวจึงเป็นมูลเหตุที่ทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนจากยีนยูนิคซีอิต 8 ที่สามารถพัฒนาเป็นชุดทดสอบการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมโดยใช้หลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟีฟิสิก ที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคในภาคสนามได้ทันทีโดยไม่ต้องนำตัวอย่างเข้ามาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ และไม่ต้องพึ่งเครื่องมือและอุปกรณ์เสริมในการตรวจ โดยสามารถใช้ชุดทดสอบดังกล่าวเป็นเครื่องมือในการตรวจเบื้องต้น (screening test) ในฝูงสุกรเพื่อการเฝ้าระวังโรค (monitoring) หรือใช้ในการตรวจสอบสุกรที่กักโรค (quarantine) ก่อนนำเข้าฝูง ซึ่งเกษตรกรและสัตวแพทย์สามารถใช้ได้ในภาคสนามข้างตัวสัตว์ ทั้งนี้คณะผู้วิจัยคาดว่าจะ เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์และเพิ่มความคล่องตัวในการป้องกันควบคุมและกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าเทียมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ชุดทดสอบที่จะพัฒนาขึ้นนี้ยังไม่เคยมีการผลิตเพื่อจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศมาก่อน จึงมีศักยภาพในการผลิตเพื่อจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศที่ยังมีความชุกของโรคพิษสุนัขบ้าเทียมอยู่ อีกทั้งยังช่วยลดการนำเข้าชุดทดสอบชนิดอีไลซาจากต่างประเทศอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนจากส่วนหนึ่งของยีนยูนิคซีต 8 ในไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมที่มีศักยภาพในการผลิตเป็นชุดตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม
2. ทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ผลิตขึ้นในการทำปฏิกิริยากับ anti-gE antibody ของสุกร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รีคอมบิแนนต์โปรตีนซึ่งเป็นโปรตีนส่วนหนึ่งของไกลโคโปรตีนอีของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม
2. สามารถนำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ผลิตได้ไปผลิตเป็นชุดทดสอบการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมในอนาคตได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความเป็นมาและระบาดวิทยาของโรคพิษสุนัขบ้าเทียม

โรคพิษสุนัขบ้าเทียมหรือ Aujeszky's disease มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (Pseudorabies virus, PrV) เป็นโรคที่ก่อความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลก โดยมีการตรวจพบครั้งแรกในประเทศฮังการีในปี ค.ศ. 1902 ในโคและสุนัขโดยศัลยสัตวแพทย์ Aladar Aujeszky (Mettenleiter, 2000; Nauwynck et al., 2007) หลังจากนั้นพบว่าโรคพิษสุนัขบ้าเทียมนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการตายของสุกรในทุกช่วงอายุและเป็นสาเหตุของการแท้งในแม่สุกรอ้อมท้องทั่วยุโรป ในช่วงปลายทศวรรษที่ 1960 ถึงต้นทศวรรษที่ 1970 โรคพิษสุนัขบ้าเทียมนี้ก็เป็นสาเหตุหลักของการตายในลูกสุกรและการแสดงอาการทางประสาทใน สุนัข โค เกะ และแมวในประเทศสหรัฐอเมริกา หลังจากมีการพัฒนาวัคซีนและโปรแกรมกำจัดโรคอุบัติการณ์ของโรคพิษสุนัขบ้าเทียมก็ลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ปัจจุบันในหลายประเทศโดยเฉพาะสหรัฐอเมริกาและในยุโรปเริ่มพบอุบัติการณ์ของโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในสุกรป่า (wild boar) มากขึ้น (Corn et al., 2004; Wilson et al., 2009) จากการสำรวจพบว่าสุกรป่าในประเทศสหรัฐอเมริการ้อยละ 30 มีแอนติบอดีต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (Wyckoff et al., 2009) ในปี ค.ศ. 2008 มีการสำรวจในประเทศอิตาลีพบว่าสุกรร้อยละ 14.6 จากตัวอย่างทั้งหมด 141 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อ gE ด้วยวิธีอีไลซา (Foti et al., 2008) ในประเทศสาธารณรัฐเช็กการสำรวจตัวอย่างจากสุกรป่าในปี ค.ศ. 2004-2005 พบว่ามีสุกรป่าที่ให้ผลบวก 101 ตัวจากสุกรที่สำรวจทั้งหมด 338 ตัว (Sedlak et al., 2008) ในประเทศสโลวีเนียพบสุกรป่าให้ผลบวกต่อโรคพิษสุนัขบ้าเทียมร้อยละ 26 (Vengust et al., 2005) ปัญหาสุกรป่าติดไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมนั้นเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากระบบการเลี้ยงในหลายประเทศในยุโรปทำให้สุกรป่ามีโอกาสในการสัมผัสกับสุกรบ้าน และมีโอกาสแพร่เชื้อมากขึ้น (Wyckoff et al., 2009) ส่วนประเทศในเอเชียนั้น ปัญหาการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมยังคงมีความสำคัญในด้านของความต้องการในการกำจัดโรคออกจากฟาร์ม เนื่องจากในหลายประเทศโรคพิษสุนัขบ้าเทียมยังจัดเป็นโรคประจำถิ่น จะเห็นได้จาก มีการศึกษาโดยทำ การสำรวจเนื้อเยื่อประสาทของสุกรที่ส่งมายังโรงฆ่าสัตว์ในประเทศเกาหลีใต้ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสต่อ gE ในปี ค.ศ. 2005 พบว่าให้ผลบวกร้อยละ 57.5 (Yoon et al., 2005) สำหรับประเทศไทยนั้นมีการรายงานโรคพิษสุนัขบ้าเทียมครั้งแรกในปี พ.ศ. 2520 ในสุกรในจังหวัดนครปฐมพบสุกรตาย 200 ตัวจากสุกรที่เลี้ยงทั้งหมด 300 ตัว (มาโนช, 2546) จากการสำรวจสุกรสาวที่คัดทิ้งเนื่องจากปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ในปี ค.ศ. 2008 พบว่ามีร้อยละ 28 ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ

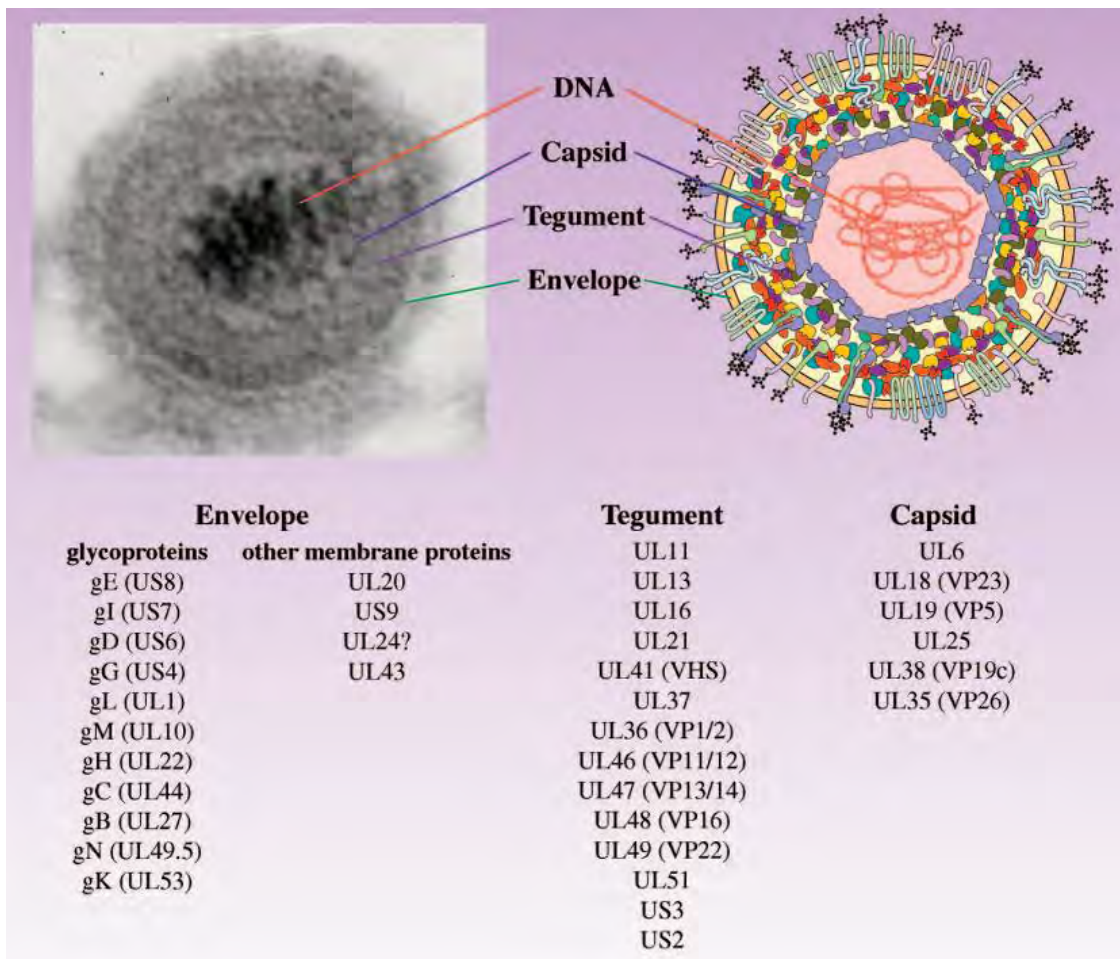
แอนติบอดีต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (Tummaruk et al., 2009) จะเห็นได้ว่าโรคพิษสุนัขบ้าเทียม ยังคงก่อความเสียหายในหลายๆประเทศทั่วโลกรวมถึงในประเทศไทยด้วย

สุกรเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติ (natural host) ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมแต่อย่างไรก็ตามไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมจัดเป็นไวรัสที่สามารถติดได้ในสัตว์หลายชนิดเช่น สุนัข แมว โค แพะ แกะ แรคคูน สัตว์ฟันแทะ เสือและม้า เป็นต้น (Kimman et al., 1991; Glass et al., 1994) ซึ่งการติดเชื้อในสัตว์ที่ไม่ใช่โฮสต์ตามธรรมชาตินี้สัตว์ที่ติดเชื้อส่วนใหญ่จะมีอาการคันและอาการทางประสาทและตายในที่สุด

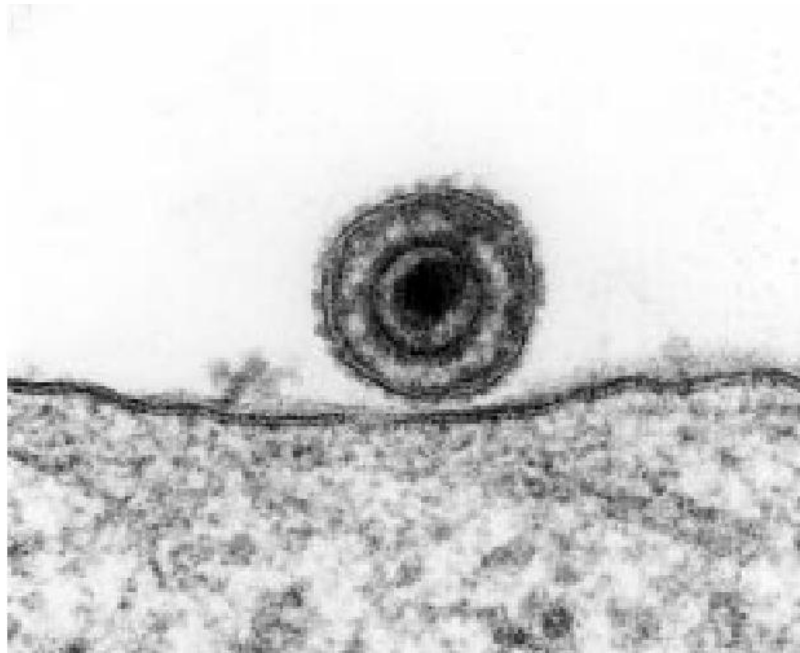
ไวรัสวิทยา

ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (pseudorabies virus, PRV) เป็นดีเอ็นเอไวรัสชนิดสายคู่ (double stranded DNA virus) วงศ์ Herpesviridae วงศ์ย่อย Alphavirus สกุล Varicellovirus มีสายจีโนมซึ่งเป็น DNA ยาว 145 กิโลเบส (kilobase, kb) โดยมีการจัดเรียงโครงสร้างแบ่งเป็นส่วนต่างๆเรียงจาก 5' ไป 3' คือ ยูนิคลอง (Unique long, UL) อินเวอร์ตเตดรีพีท (Inverted-repeat, IR) ยูนิคชอร์ต (Unique short, US) และเทอร์มินอลรีพีท (Terminal repeat, TR) ไวรัสมีเส้นผ่าศูนย์กลางยาว 100 - 150 นาโนเมตร (Nauwynck et al., 2007) ประกอบด้วยสี่ส่วนคือ จีโนมของไวรัสเป็นสายยาว (linear) อยู่ภายใน enveloped nucleocapsid ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 105 - 110 นาโนเมตร ซึ่งฝังตัวอยู่ในเมตริกซ์โปรตีน (หรือเรียกว่า tegument) และล้อมรอบด้วยเปลือกของไวรัส (virus envelope) ที่มีโครงสร้างเป็น lipid bilayer ซึ่งมี transmembrane protein ฝังอยู่ (ภาพที่ 1) envelope ประกอบด้วย structural protein อย่างน้อย 9 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50-130 กิโลดาลตัน และพบว่า 8 ชนิดเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ไกลโคโปรตีนกลุ่มที่เป็น structural protein นี้มีความสำคัญต่อการเข้าสู่เซลล์โฮสต์และแพร่เชื้อของไวรัสเป็นอย่างยิ่งเช่น gC เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับ heparin sulfate ที่ผิวเซลล์โฮสต์ (ภาพที่ 2) เช่น epithelial cells alveolar macrophages (Pomeranz et al., 2005)หลังจากจับแล้ว gD จะจับกับ specific receptor ที่เซลล์โฮสต์เพื่อให้มีเสถียรภาพมากขึ้น หลังจากนั้น gB, gH และ gL จะรวมตัวเข้ากับเซลล์เมมเบรนของโฮสต์ (Mettenleiter, 2002) (ภาพที่3) แล้วปล่อยแคปซิดของไวรัสเข้าสู่เซลล์โฮสต์ หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่นิวเคลียสของโฮสต์และเริ่มกระบวนการ transcription เมื่อมีการเพิ่มจำนวนและประกอบเป็นตัวไวรัสแล้ว ส่วนโปรตีน gE และ gI จะจับด้วยกันเป็นสารเชิงซ้อน (complex) ทำหน้าที่ช่วยในการแพร่กระจายไวรัสจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่งโดยเฉพาะในเซลล์ประสาท (cell to cell spreading) ส่วนการแพร่ไวรัส

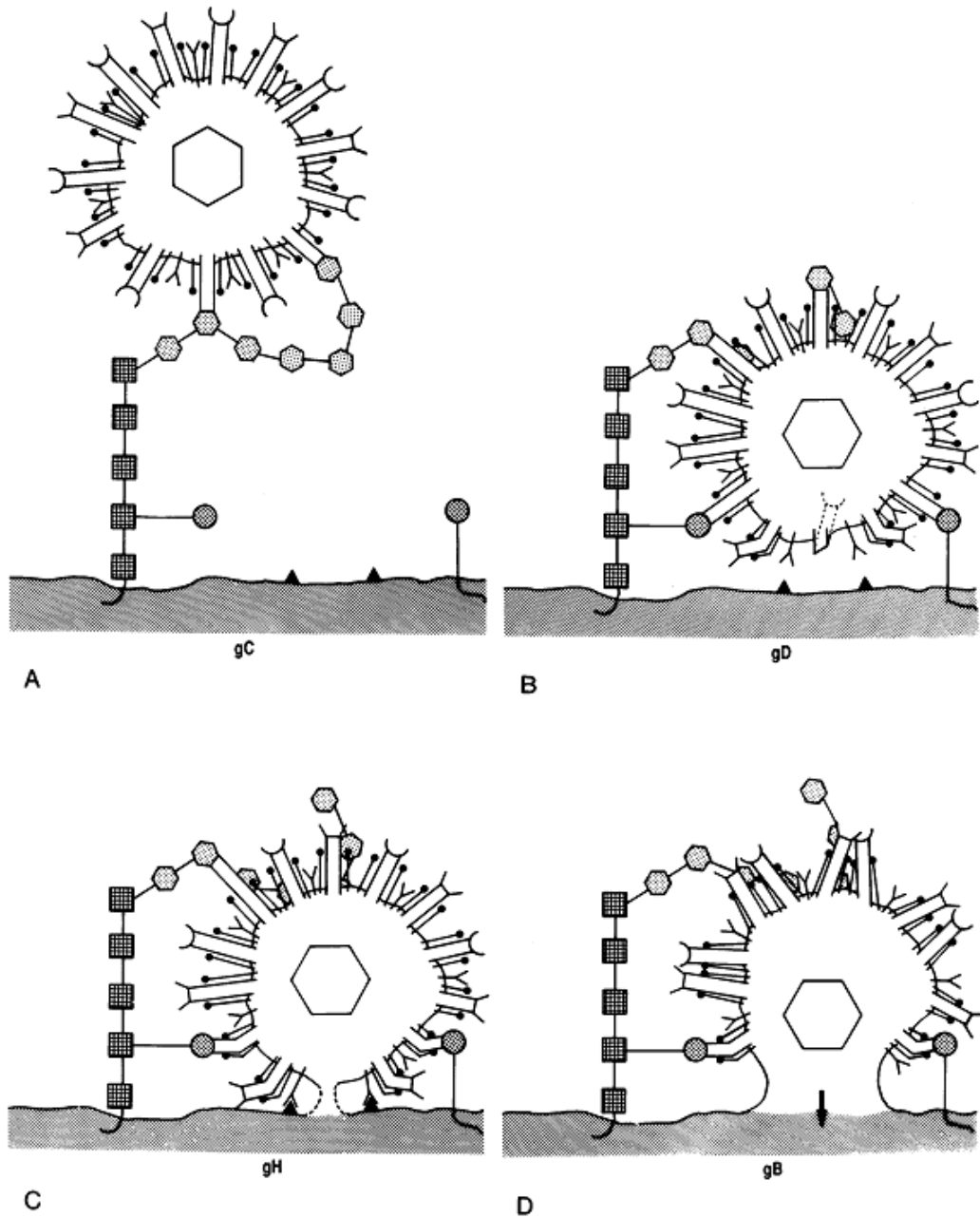
ไปทั่วร่างกายนั้นเป็นแบบการไปกับเซลล์ในระบบ peripheral blood mononuclear cell ซึ่งมีความสำคัญต่อการก่อโรค เช่น ทำให้เกิดการแท้งในแม่สุกร (Nauwynck and Pensaert, 1992) ส่วน cell free viremia นั้นพบน้อยและมักไม่มีความสำคัญกับพยาธิกำเนิด (Wittmann et al., 1980) ส่วนของไวรัสที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของไวรัสแบ่งได้ 3 กลุ่มดังนี้ 1) envelop glycoprotein เช่น การตัด gE ทำให้ไวรัสลดความรุนแรงลงโดยมีผลต่อการแพร่เชื้อเข้าสู่ระบบประสาท (Kimman et al., 1992) 2) virus-encoded enzymes เช่น การตัดยีนที่ควบคุมการสร้าง Thymidine kinase มีผลทำให้ลดการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ประสาท (de Wind et al., 1992; Ferrari et al., 1998; Ferrari et al., 2000) 3) nonessential capsid protein เช่น การขาดหายไปของ UL21 ซึ่งเป็น capsid-associated tegument protein ทำให้ไวรัสลดความรุนแรงลง (Klupp et al., 1992)



ภาพที่ 1 โครงสร้างไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (Pomeranz et al., 2005)



ภาพที่ 2 การผ่านเข้าเซลล์ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมในเซลล์ โดยการเริ่มนำส่วน virion envelope สัมผัสกับกับเยื่อหุ้มเซลล์ (Mettenleiter, 2000)

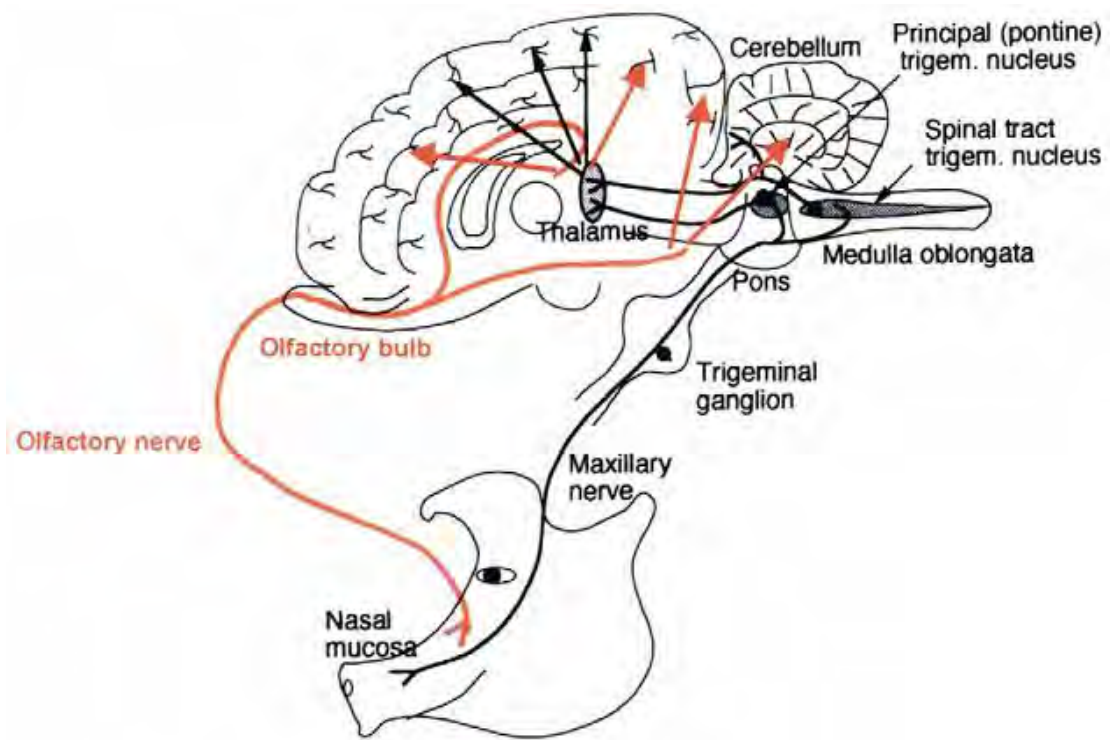


ภาพที่ 3 กระบวนการการผ่านเข้าเซลล์ของไวรัสกลุ่มอัลฟาเฮอริปีส์ไวรัส A) gC ของไวรัสจับกับเฮปารินซัลเฟตของเซลล์เจ้าบ้าน B) gD ของไวรัสช่วยจับเพิ่มความแข็งแรง C) เกิดการรวมกันของเซลล์เจ้าบ้านและไวรัส D) ไวรัสปลดปล่อยแคปซิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Mettenleiter, 2002)

พยาธิวิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน

ลักษณะความรุนแรงของรอยโรคทางพยาธิวิทยาของโรคพิษสุนัขบ้าที่เพิ่มขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการคือ สายพันธุ์ของไวรัส (strain) อายุสุกรและปริมาณเชื้อที่ได้รับ (Pomeranz et al., 2005) โดยไวรัสสายพันธุ์รุนแรงทำให้เกิดการแพร่ของไวรัสในกระแสเลือด (viremia) (Nawynck and Pensaert, 1995) ในขณะที่ไวรัสสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงไวรัสมักจะอยู่ที่บริเวณที่ได้รับเชื้อ โดยไวรัสสายพันธุ์รุนแรงนั้นสามารถพบเชื้อและแยกเชื้อได้จากเม็ดเลือดขาวในชั้น buffy coat และจาก monocytes ในปอด (Iglesias et al., 1992) และพบเชื้อกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ม้าม ทอนซิลและมดลูกเป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบการติดเชื้อแบบแฝง (latent infection) ในเซลล์ประสาท เช่น ใน trigeminal nerve ganglia (Pomeranz et al., 2005; Yoon et al., 2005; Yoon et al., 2006) ในสุกรที่ติดเชื้อแบบแฝงนี้ ยังสามารถพบเชื้อในทอนซิลได้เช่นกันแม้จะน้อยกว่า (Maes et al., 1997) สุกรที่มีการติดเชื้อแบบแฝงนี้ไวรัสสามารถถูก กระตุ้นและกลับมาแพร่เชื้อได้ในกรณีที่สุกรเกิดความเครียดหรือจากการได้รับสารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive agents) (Rziha et al., 1986) นอกจากนี้ยังมีการวิจัยในหนูพบว่าแม่หนูที่มีการติดเชื้อแบบแฝงนี้เมื่อตั้งท้องสามารถถ่ายทอดเชื้อให้ลูกหนูได้ (Tanaka and Mannen, 2008)

สุกรจะติดเชื้อไวรัสผ่านทางจมูก (nasal) และ oropharyngeal mucosa โดยไวรัสจะเพิ่มจำนวนที่เซลล์เยื่อ (epithelial cells) และผ่านเข้าไปติดที่ sensory nerve ending ที่อยู่ในบริเวณติดเชื้อ retrograde transport ของไวรัสสามารถเกิดได้ที่ maxillary branch ของเส้นประสาทสมอง trigeminal grossopharyngeal และ olfactory (Maes et al., 1997) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 เส้นทางการติดต่อเข้าสู่สมองของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (Mettenleiter, 2003)

ในลูกสุกรดูดนม (suckling pigs) จะแสดงอาการของการติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลางอย่างรุนแรง แต่ในสุกรอายุมากจะแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจมากกว่าอาการทางประสาท (Pomeranz et al., 2005) ในลูกสุกรจะมีระยะฟักตัว (incubation period) ประมาณ 2-4 วันหลังได้รับเชื้อ หลังจากสุกรแสดงอาการภายใน 24 ชั่วโมงจะเริ่มแสดงอาการทางประสาท เช่น การนั่งแบบสุนัข ข (dog sitting) หลังเหยียดแอ่น (opisthotonos) ชักตะกาย (paddle) เดินวนเป็นวง น้ำลายไหลเป็นต้น หลังจากแสดงอาการทางประสาทลูกสุกรส่วนใหญ่จะตายภายใน 24-36 ชั่วโมงจากสมองอักเสบ (encephalitis) ในสุกรอนุบาลอายุ 3-9 สัปดาห์ สุกรจะแสดงอาการเช่นเดียวกับสุกรดูดนมแต่อัตราการตายต่ำกว่า สุกรอายุ 3-4 สัปดาห์พบอัตราการตายร้อยละ 50 สุกรอายุ 5-10 สัปดาห์ จะพบอาการเบื่ออาหาร มีไข้ 41-42 องศาเซลเซียส ภายใน 3-6 วันหลังติดเชื้อมสุกรจะแสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น ไอ จาม มีน้ำมูกและแสดงอาการหายใจลำบาก พบการสูญเสียน้ำหนักตัวอย่างชัดเจน หลังจากแสดงอาการ 5-10 วันสุกรสามารถกลับมาปกติได้ ในสุกรที่โตเต็มที่พบอาการทางระบบทางเดินหายใจเป็นหลักแต่ก็สามารถพบอาการทางประสาทได้บ้างเช่น อาการกล้ามเนื้อสั่น (muscle tremors) หลังจากติดเชื้อ 3-6 วันสุกรจะเริ่มแสดงอาการ เบื่ออาหาร มีไข้ 41-42 องศาเซลเซียส และเริ่ม

แสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น ไอ จาม มีน้ำมูกและแสดงอาการหายใจลำบาก หอบ ปอดอักเสบ (Narita et al., 1993) ปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) (Iglesias et al., 1992; Ferrari et al., 1998) สัตว์จะแสดงอาการป่วยนาน 6-10 วัน ในสุกรอุ้มท้องพบการกลับสัด แท้ง มัมมี ลูกแรกเกิดอ่อนแอ (Katayama et al., 1998) แม่สุกรป่วยสามารถส่งไวรัสไปยังลูกได้โดย ผ่านรก (transplacental transmission) (Wittmann et al., 1980)

เมื่อสุกรได้รับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม ร่างกายสุกรจะเริ่มทำการตอบสนองทาง ภูมิคุ้มกันโดยการหลั่ง Type I interferon ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และขึ้นสู่ระดับสูงสุดภายใน 2-3 วัน (Wittmann et al., 1980) ในช่วงแรกของการติดเชื้อ NK cells จะเป็นเซลล์ที่มีบทบาทในการ ทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ (non-specific cytotoxicity) มีการตอบสนองทั้งทางภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune response) และแบบพึ่งเซลล์ (cell mediated immune response) สุกรที่ติดเชื้อจะเริ่มตรวจพบนิวทรัลไลซิงแอนติบอดี (neutralizing antibody, NAb) ภายใน 1 สัปดาห์หลัง การติดเชื้อ และ NAb นี้จะขึ้นสู่ระดับสูงสุดภายใน 2-3 สัปดาห์ ซึ่ง NAb ที่สุกรสร้างขึ้นนั้นโดยมาก จะมีความจำเพาะต่อโปรตีน gC ของไวรัส (Ben-Porat et al., 1986) นอกจากนี้ gC ยังเป็น แอนติเจนเป้าหมายของ CD4⁺ T Helper cell และ CD8⁺ Cytotoxic T cell (Karger and Mettenleiter, 1993) โดยการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์นี้เองที่เป็นระบบหลักในการ ทำลายไวรัสอย่างได้ผล

ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมมีกลไกที่ใช้ในการหลบหนีกระบบภูมิคุ้มกันสัตว์โดยเมื่อ สัตว์ติดเชื้อไวรัสจะเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์และแพร่กระจายโดยผ่านเซลล์ต่อเซลล์ (cell to cell spreading) โดยผ่าน 4 กลไก (ภาพที่ 5) 1) การแพร่ของไวรัสไปยังเซลล์ที่อยู่ติดกันโดยไวรัส จะใช้ โกลโคโปรตีน B H/L และ K จับกับตัวรับที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ข้างเคียงพร้อมกับใช้โกลโค โปรตีน E/I (Knapp et al., 1997) และ M ช่วยให้เกิดการรวมตัวกันของเซลล์ 2 เซลล์ (syncytium) (Rauh and Mettenleiter, 1991) 2) ไวรัสจะแพร่ไปยังเซลล์ที่อยู่ห่างกันด้วยการกระตุ้นให้เกิดการ สร้างโครงสร้างของโปรตีนแอกติน (actin) ยื่นไปที่เซลล์เป้าหมายแล้วสร้างเป็นสะพานเชื่อม ระหว่างเซลล์ (intercellular brige) (Favoreel et al., 2005) โดยโปรตีนของไวรัสที่เข้ามา มีบทบาท คือ US3 ทำให้ไวรัสสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ข้างเคียงได้ 3) ไวรัสเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวกันของ เซลล์ที่อยู่ห่างกันโดยอาศัยโกลโคโปรตีน C B และ D มักพบในเซลล์โมโนไซต์ 4) เมื่อโมโนไซต์ติด ไวรัสโมโนไซต์จะมีการแสดงออกของ MHC class I molecule ลดลง (Mellencamp et al., 1991; Favoreel et al., 1999; Deruelle et al., 2009) ทำให้ลดโอกาสในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน แบบพึ่งเซลล์และจะมีการแสดงออกของโปรตีน wCD11R3 and CD18 ซึ่งเป็น adhesion

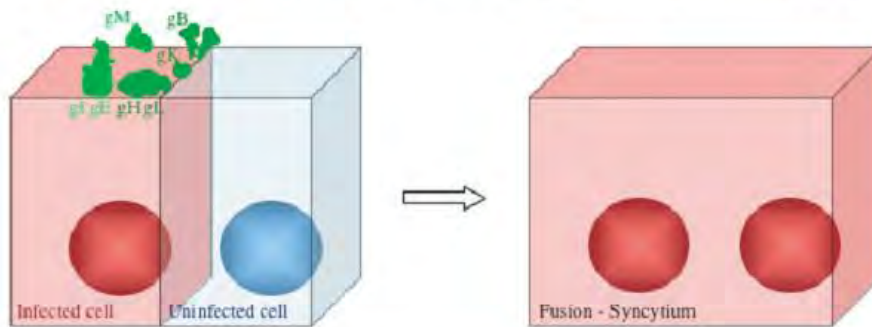
molecule เพิ่มขึ้นทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อมีเข้าไปยึดเกาะกับ endothelial เซลล์และเกิดการแพร่เชื้อไปยัง endothelial เซลล์ได้กรณีนี้จะเกิดขึ้นในการแพร่เชื้อจากแม่สู่ลูกผ่านรก (Van de Walle et al., 2003) ซึ่งกลไกต่างๆเหล่านี้ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำไม่สามารถที่จะกำจัดไวรัสได้ (Nauwynck et al., 2007)

การวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าเทียม

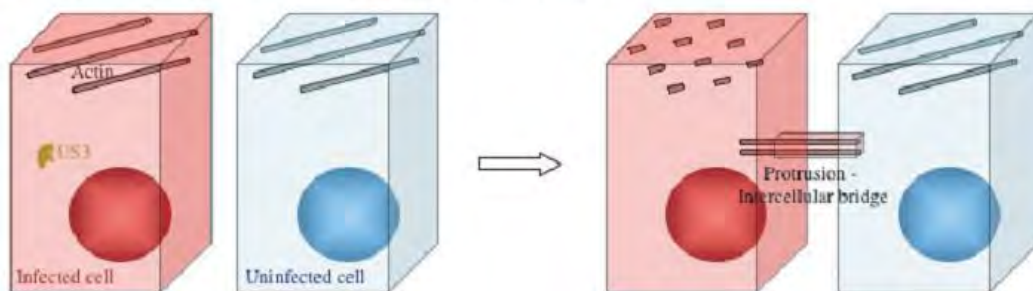
การวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าเทียมทำได้โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่าง อวัยวะหรือจากการป้ายจมูก (nasal swab) โดยวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK6 หรือ PK-15 แล้วตรวจดูความผิดปกติของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) และทำการตรวจ พิสูจน์เชื้อด้วยวิธี immunofluorescent หรือ immunoperoxidase (Pomeranz et al., 2005) หรือ ตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction) (Huang et al., 2004; Lee et al., 2007; Yue et al., 2009) quantitative PCR (Thiery et al., 1996; Ma et al., 2008) และ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (En et al., 2008) เป็นต้น

การตรวจทางซีรัมวิทยา ทำได้โดยวิธี ไวรัสนิวทรัลไลซ์ เซชัน (virus neutralization) latex agglutination (Yong et al., 2005) หรือวิธีอีไลซา (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) โดยเฉพาะปัจจุบันวิธี competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) สามารถตรวจวินิจฉัยแยกสารที่ติดเชื้อมอกจากสารที่ได้รับ วัคซีนที่ตัดยีนบางตัวของไวรัส โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ถูกตัดออกนี้ ทำให้วิธี cELISA เป็นวิธีที่แพร่หลายนิยมใช้ในปัจจุบัน แต่ข้อเสียของการตรวจวิธีนี้คือจำเป็นต้องใช้ อุปกรณ์เครื่องมือเฉพาะเช่น ELISA reader ทำให้ต้องตรวจได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการเท่านั้น (Chen et al., 2009)

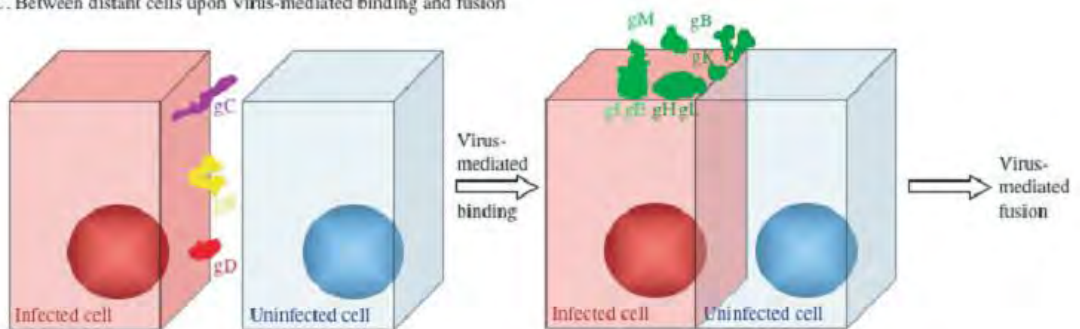
A. Between cells in contact by fusion process with the formation of a syncytium (dark green: essential; light green: modulating)



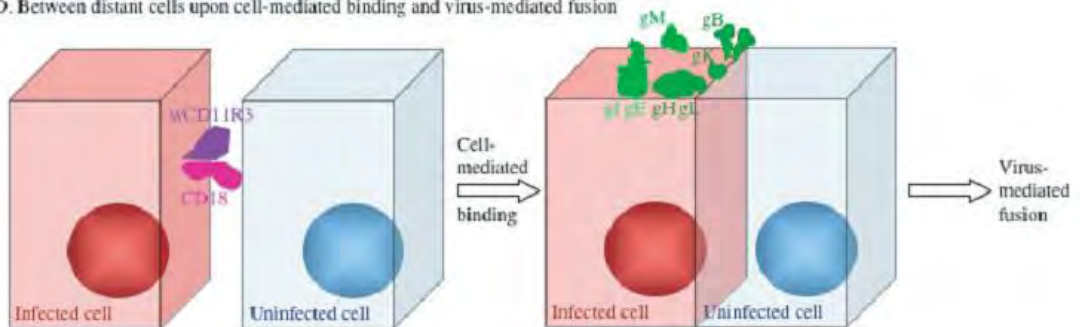
B. Between distant cells by the formation of a protrusion (intercellular bridge)



C. Between distant cells upon virus-mediated binding and fusion



D. Between distant cells upon cell-mediated binding and virus-mediated fusion



ภาพที่ 5 กลไกที่ไวรัสพิษสุนัขบ้าเตรียมใช้ในการแพร่เชื้อแบบเซลล์ต่อเซลล์ (Nauwynck et al., 2007)

การควบคุมและกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าเทียม

การควบคุมและกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในปัจจุบันนี้ ในหลายประเทศใช้ มาตรการทำวัคซีนแบบ DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) (Pasick, 2004; Foley and Hill, 2005; Komaromi and Szabo, 2005) ร่วมกับการตรวจและคัดทิ้ง (test and removal) (Kit, 1990; van Oirschot et al., 1990; Wittmann, 1991; Muller et al., 2003; Bouma, 2005) โดยตัวอย่างในการกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในประเทศเยอรมัน มีดังนี้ 1) ป้องกัน การติดเชื้อในฟาร์มสุกรที่ปลอดโรค ที่ไม่ได้ทำวัคซีน 2) ลดการติดเชื้อและทำวัคซีนในพื้นที่ที่มีการ ระบาดของโรค โดยข้อนี้แบ่งมาตรการเป็น 4 ระดับคือ 2.1) ทำวัคซีนที่มีการตัดยีนยูนิคซีออต 8 โดยทำวัคซีนในสุกรแม่พันธุ์และลูกสุกรทุกตัว 2.2) เมื่อทำวัคซีนไปได้ระยะหนึ่งแล้วทำการตรวจหา สุกรที่มีแอนติบอดีต่อโปรตีน gE โดยใช้วิธีอีไลซา และทำการคัดทิ้งสุกรที่ให้ผลบวก 2.3) สามารถ ระบุสถานะภาพฝูงที่ทำวัคซีนแต่ไม่มีอาการของโรคพิษสุนัขบ้าเทียมได้ 2.4) หยุดการทำวัคซีนและ ระบุสถานะภาพฝูงที่ไม่ติดเชื้อได้ และการจะนำสุกรเข้าฝูงนี้ได้ต้องมาจากฝูงที่มีสถานะภาพระดับ เดียวกันเท่านั้น 3) ในพื้นที่ที่เคยมีการระบาดของโรคจะมีอุบัติการณ์น้อยลงจนหมดไปในที่สุด เมื่อใช้ มาตรการดังกล่าว (Muller et al., 2003) ซึ่งการกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าเทียมให้หมดไปนั้นมี ประโยชน์หลายประการดังนี้ 1) ลดความสูญเสียที่จะเกิดกับสุกรอนุบาลและสุกรขุน รวมถึงการเกิด การแท้งในแม่สุกรอุมท้อง 2) เพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของสุกรขุน 3) ลดต้นทุนค่า วัคซีนและยาปฏิชีวนะ 4) ไม่ถูกกีดกันทางการค้าในการส่งออกสุกรไปยังประเทศปลอดโรค ใน ปัจจุบันการผลิตวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าเทียมได้มีการตัดยีนยูนิคซีออต 8 ซึ่งทำหน้าที่ผลิตโปรตีน gE ออก (Mulder et al., 1994) ทำให้ไวรัสวัคซีนเป็นไวรัสที่ไม่มีโปรตีน gE ซึ่งการที่ไวรัสวัคซีนไม่มี โปรตีน gE นั้นมีประโยชน์ 2 ด้านคือ 1) ช่วยในการลดความรุนแรงของไวรัสลงเพราะโปรตีน gE ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมนี้ เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการทำให้ไวรัสสามารถแพร่จากเซลล์ หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่งได้ (Knapp et al., 1997; Brack et al., 2000) แต่โปรตีน gE ของไวรัสพิษสุนัข บ้าเทียมไม่มีความจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส ดังนั้นไวรัสวัคซีนจึงมีความรุนแรงและ ความสามารถในการแพร่เชื้อเข้าสู่เซลล์ประสาทลดลง แต่ไม่ได้ลดความสามารถในการเพิ่มจำนวน ของไวรัสและไม่ทำให้ไวรัสตาย 2) การตัดยีนยูนิคซีออต 8 นี้ยังทำให้สามารถตรวจแยกสุกรที่ติด เชื้อ (infected pigs) ตามธรรมชาติออกจากสุกรที่ได้รับวัคซีนได้ (Ao et al., 2003; Pensaert et al., 2004) โดยตรวจแอนติบอดีต่อโปรตีน gE เนื่องจากสุกรที่เคยได้รับเชื้อจากธรรมชาติ จะสร้าง แอนติบอดีต่อโปรตีน gE แต่สุกรที่ได้รับวัคซีนจะไม่สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน gE ทำให้สามารถ แยกสุกรที่ติดเชื้อออกจากสุกรที่ได้รับวัคซีนได้ ซึ่งหากพบว่าสุกรภายในฟาร์มให้ผลบวกต่อโปรตีน gE จะสามารถบอกได้ว่ายังมีการแพร่เชื้อเกิดขึ้นในฟาร์มอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีสถานะ

เป็นเขตปลอดโรคหรือสถานะไม่มีการติดเชื้อการนำสุกรเข้าฝูงจำเป็นต้องตรวจสอบให้ชัดเจนว่าสุกรไม่ติดเชื้อ (Pasick, 2004) ดังนั้นโปรตีน gE นี้จึงเป็นโปรตีนที่นิยมนำมาใช้ ประโยชน์ โดยการใช้ผลิตเป็นชุดทดสอบการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าเทียม

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าโรคพิษสุนัขบ้าเทียมเป็นโรคที่มีความรุนแรงและเป็นโรคที่หลายประเทศใช้เป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้าและในประเทศไทยยังจัดเป็นโรคประจำถิ่นซึ่งดังที่กล่าวมาข้างต้นการลดความเสี่ยง โดยการคัดเลือกสุกรก่อนนำเข้าฝูงเป็นสิ่งที่สำคัญ และวิธีการทดสอบด้วยวิธีอิลูซานั้นได้ผลค่อนข้างช้าและไม่สามารถนำไปปฏิบัติงานในภาคสนามได้ทันที การศึกษาในประเทศสเปนพบว่า การนำสุกรที่ไม่ได้ตรวจโรคก่อนทำการขนย้ายมายังพื้นที่ปลอดโรคหรือพื้นที่ที่อุบัติการณ์ต่ำ (ต่ำกว่าร้อยละ 10) มีความเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดการระบาดของโรคสูงกว่าการนำ เข้าสุกรที่ตรวจโรคก่อนขนย้ายถึง 13.6 เท่า (Martinez-Lopez et al., 2009) ดังนั้นการตรวจโรคสุกรก่อนขนย้ายจึงเป็นมาตรการที่มีความสำคัญ ในการควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นการออกแบบชุดทดสอบการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมที่ใช้หลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟีฟิค ที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคในภาคสนามได้ทันที โดยไม่ต้องนำตัวอย่างเข้ามาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ และสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจเบื้องต้น (screening test) ในฝูงเพื่อเฝ้าระวัง (monitoring) หรือใช้ในการตรวจสอบสุกรกักโรคก่อนนำเข้าฝูง (quarantine) (Card and Enquist, 2001) เพื่อลดความเสี่ยงของการแพร่เชื้อ ให้สุกรปลอดโรคจากการนำสุกรที่ติดเชื้อมารอผลการตรวจในโรงเรือนกักโรคหรือในฝูงสุกรพันธุ์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ไวรัส

ไวรัสที่ใช้เป็นไวรัสอ้างอิงสำหรับการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนในการศึกษาครั้งนี้เป็นไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม ที่แยกได้จากในประเทศไทยสายพันธุ์ 8NP74 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซีรัมสุกร

ซีรัมสุกรที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซีรัมเหล่านี้ประกอบด้วยซีรัมที่ให้ผลบวกจำนวน 50 ตัวอย่าง และซีรัมที่ให้ผลลบจำนวน 50 ตัวอย่าง [จากผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA HerdCheck Anti-ADV gpl (IDEXX, USA) โดยหน่วยชันสูตรโรคสัตว์]

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA) ของไวรัส

การสกัดดีเอ็นเอของไวรัสทำโดยนำตัวอย่างไวรัสที่อยู่ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Eagle's minimum essential medium มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin RNA Virus (Macherey-Nagel, Germany) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ (แสดงในภาคผนวก) เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอของไวรัสที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป

การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 156 ถึง 714 ของยีนยูนิคซ็อต 8 (Unique short 8) (เป็นช่วงของดีเอ็นเอที่แปลรหัสได้เป็นโปรตีน gE ในช่วงกรดอะมิโนที่ 52 ถึง 238 ซึ่งเป็น major epitope domain (Jacobs and Kimman, 1994)) ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ BamAjzkyF และ BamAjzkyR ซึ่งได้รับออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีนยูนิคซ็อต 8 ในช่วงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 156 ถึง 714 และไพรเมอร์คู่ได้รับการออกแบบให้ผลผลิตของพีซีอาร์ (PCR product) ที่เกิดขึ้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ

ต่อเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ BamHI ที่บริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของผลผลิตของพีซีอาร์ด้วย (ตารางที่ 1) ขนาดของผลผลิตของพีซีอาร์มีขนาด 573 คู่เบส

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ BamAjzkyF และ BamAjzkyR นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อเอ็นไซม์ BamHI

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
BamAjzkyF	5'- <u>ggatcc</u> gcc ggc gac gat gac ctc aac -3'
BamAjzkyR	5'- <u>ggatcc</u> ggg cga gaa gag ctg cga gtg -3'

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1.) GoTaq Green Master mix (Promega, USA) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร 2.) ไพรเมอร์ BamAjzkyF ปริมาณ 50 พิโคโมล 3) ไพรเมอร์ BamAjzkyR ปริมาณ 50 พิโคโมล 3.) ตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาณ 10 ไมโครลิตร และ 4.) น้ำที่ปราศจากเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase free water) (ใช้ปรับปริมาตรของปฏิกิริยาให้มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆ ของปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นดังนี้ 1.) ดีเนเจอร์เรชันเริ่มต้น (initial denaturation) ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ 2.) ดีเนเจอร์เรชัน (denaturation) ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3.) แอนนิลลิง (annealing) ใช้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4.) เอ็กซ์เทนชัน (extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำ 34 รอบ และ 5.) เอ็กซ์เทนชันครั้งสุดท้าย (final extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

นำผลผลิตของพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose-gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5% agarose gel ที่แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที แล้วทำการย้อมเจลด้วยเอทิดียมโบรมไนด์ (ethidium bromide) ตรวจสอบการปรากฏของผลผลิตจากพีซีอาร์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV) ตัดแถบเรืองแสงที่มีขนาดตรงกับขนาดของผลผลิตของพีซีอาร์ที่ได้จากการคำนวณ ทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดเจลสำเร็จรูป NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Germany) ด้วยวิธีที่ระบุใน

ชุดสกัด (แสดงในภาคผนวก) เก็บชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป ตั้งชื่อชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนนี้ว่า gE fragment

การโคลน (clone) และการสกัดพลาสมิด (plasmid)

นำ gE fragment ไปทำการเชื่อมต่อ (ligation) เข้าสู่พลาสมิด pGEM-T easy (Promega, USA) โดยผสมสารเคมีต่างๆ ตามคู่มือของชุดสำเร็จ รูป pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA) (แสดงในภาคผนวก) เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด gE pGEM-T

ทำการย้าย (transform) รีคอมบิแนนท์พลาสมิด gE pGEM-T เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM 109 (Promega, USA) โดยใช้วิธีเคมีคัลทรานส์ฟอร์มชันด้วยแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂-induced transformation) (แสดงในภาคผนวก) ได้เป็นรีคอมบิแนนท์อีโคไล gE pGEM-T JM109

เพิ่มปริมาณพลาสมิด gE pGEM-T โดยการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย gE pGEM-T JM109 ใน Difco™ LB Broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นจึงสกัดพลาสมิด gE pGEM-T ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleospin plasmid kit (Macherey-Nagel, germany) โดยปฏิบัติตามคู่มือของชุดสกัดสำเร็จรูป (แสดงในภาคผนวก) เก็บรักษาพลาสมิด gE pGEM-T ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำมาใช้ต่อไป

ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องออโตเมทเตดดีเอ็นเอซีควนเซอร์ (automated DNA sequencer) โดยใช้ไพรเมอร์มาตรฐานคือไพรเมอร์ T7 promotor และไพรเมอร์ SP6 promotor และตรวจสอบยืนยันโดยใช้โปรแกรม คอมพิวเตอร์ Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4.0 (Tamura et al., 2007) เพื่อยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยูนิตข้อ 8 ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 156 ถึง 714 อยู่ภายในพลาสมิด gE pGEM-T (ดังภาพที่ 6)

```

          10          20          30          40          50          60
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GGCGACGATG ACCTCAACGG CGACCTCGAC GGCGACGACC GCCGCGCGGG CTCGCGCTCG

          70          80          90          100         110         120
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GCCCTCGCCT CCCTGAGAGA GGCGCCCCCG GCCCATCTGG TGAACGTGTC CGAGGGCGCC

          130         140         150         160         170         180
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCTCTG

          190         200         210         220         230         240
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CCCGTCCGCG GCTGCGACGC CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC

          250         260         270         280         290         300
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CCGACCTGG TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC

          310         320         330         340         350         360
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
TACCTGCCGC CCGAGGTGCC GCGGCTCCGG CGCGAGCCGC CCATCGTCAC CCCGGAGCGG

          370         380         390         400         410         420
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
TGGTCGCCGC ACCTGAGCGT CCTGCGGGCC ACGCCCAACG ACACGGGCCT CTACACGCTG

          430         440         450         460         470         480
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG

          490         500         510         520         530         540
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CCGGCGGACC CGGTGGGCCC CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC

          550
.....|.....| .....|....
TCGCAGCTCT TCTCGCCC
```

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมจากประเทศมาเลเซีย FJ176390

การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

นำพลาสมิด gE pGEM-T และพลาสมิด pGEX 5x-3 (GE Healthcare, USA) (ภาพที่ 7) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ใช้ในการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดจำเพาะอีโคอาร์วัน (Eco RI) (New England biolab, USA) ด้วยวิธีตามคู่มือของผลิตภัณฑ์ (แสดงในภาคผนวก) การตัดพลาสมิด gE pGEM-T ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอีโคอาร์วันจะได้เป็น gE fragment และ pGEM-T fragment และการตัดพลาสมิด pGEX 5x-3 (GE Healthcare, USA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอีโคอาร์วัน จะได้เป็น pGEX 5x-3 ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง

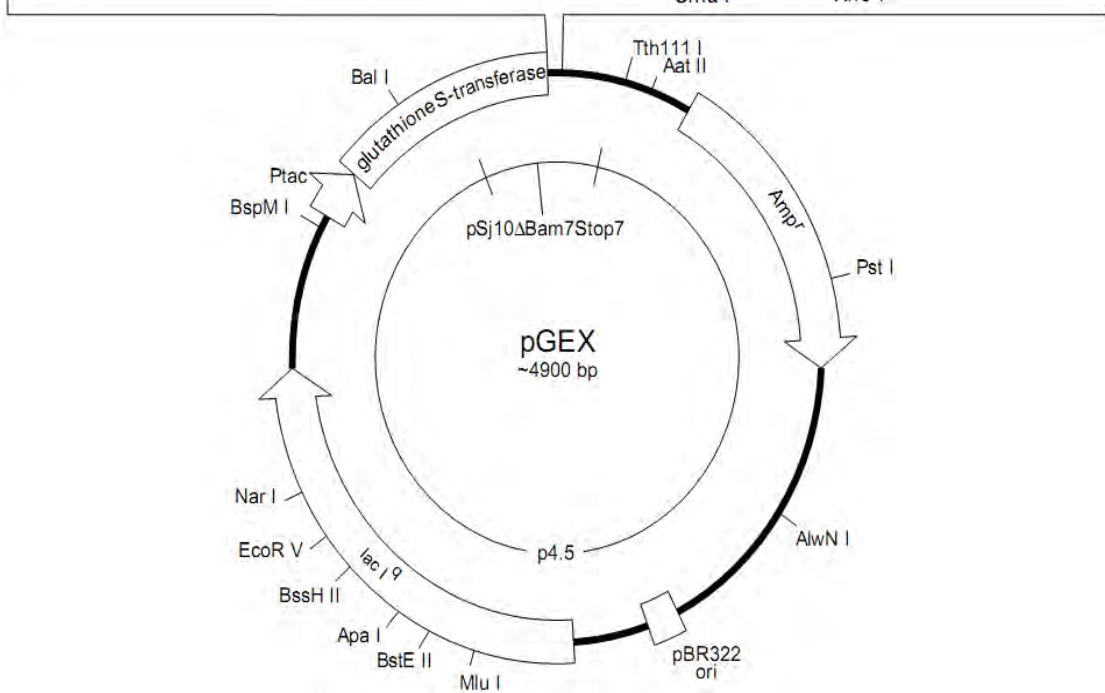
จากนั้นจึงนำพลาสมิดทั้ง 2 ที่ผ่านการตัดย่อยแล้วมา ทดสอบด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ทำการตัดแถบเรืองแสงที่ถูกต้องและนำไป ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, Germany) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำมาใช้ต่อไป

การตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากพลาสมิด pGEX 5x-3 (dephosphorylation)

พลาสมิด pGEX 5x-3 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI แล้วมาทำการตัดหมู่ฟอสเฟตเพื่อป้องกันการเชื่อมต่อดังเอง (self-ligation) โดยใช้เอนไซม์ alkaline phosphatase (New England biolab, USA) ด้วยวิธีการตามคู่มือของผลิตภัณฑ์ (แสดงในภาคผนวก) จากนั้นจึงนำพลาสมิด pGEX 5x-3 ที่ผ่านการตัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้วมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, Germany) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำมาใช้ต่อไป

pGEX-5X-3 (27-4586-01)
Factor Xa

Ile Glu Gly Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
 ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC AGG AAT TCC CGG GTC GAC TCG AGC GGC CGC ATC GTG ACT GAC TGA
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I Stop codons



ภาพที่ 7 ตำแหน่งของ Glutathione S-transferase Factor Xa และพื้นที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction site of restriction enzyme) ของพลาสมิด pGEX 5X-3 ดัดแปลงจากคู่มือ GST Gene Fusion System (Amersham biosciences, UK)

การเชื่อมต่อ (ligation) gE fragments เข้าสู่พลาสมิด pGEX 5x-3

นำ gE fragment ที่ได้จากการตัดออกจาก gE pGEM-T มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEX 5x-3 (GE Healthcare, USA) (ภาพที่ 6) ที่ทำการตัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว โดยนำมาทำปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโดยใช้เอ็นไซม์ T4 DNA ligase (Invitrogen, USA) ด้วยวิธีตามคู่มือของผลิตภัณฑ์ (แสดงในภาคผนวก) ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด gE pGEX 5x-3 หลังจากนั้นจึงทำการย้าย (transform) รีคอมบิแนนท์พลาสมิด gE pGEX 5x-3 เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 (Promega, USA) โดยใช้วิธีเคมีคัลทรานส์ฟอร์มเมชันด้วยแคลเซียมคลอไรด์ (แสดงในภาคผนวก) ภายหลังการทรานส์ฟอร์มเมชันทำการเลือกโคโลนีแบบสุ่มมา 5 โคโลนีต่อ 1 ผลผลิตพีซีอาร์ แล้วทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยเลี้ยงใน Difco™ LB Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12-16 ชั่วโมง ซึ่งจะได้รีคอมบิแนนท์ไอโคไล โดยตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์ *E. coli* นี้ว่า gE pGEX 5X-3 JM109

ทำการตรวจสอบทิศทางของ gE fragment ภายใน gE pGEX 5x-3 โดยใช้วิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์มาตรฐานคือ pGEX 5' ฟอรวอร์ดไพรเมอร์ และใช้ BamAjkzyR รีเวิร์สไพรเมอร์ อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆ ของปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นดังนี้ 1.) ดีเนเจอร์เรชันเริ่มต้น (initial denaturation) ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ 2.) ดีเนเจอร์เรชัน (denaturation) ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3.) แอนนิลลิง (annealing) ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4.) เอ็กซ์เทนชัน (extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที โดยขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำ 34 รอบ และ 5.) เอ็กซ์เทนชันครั้งสุดท้าย (final extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อยืนยันทิศทางที่ถูกต้องควรได้ PCR product ขนาดประมาณ 600 คู่เบส

สกัดพลาสมิดออกจากรีคอมบิแนนท์ไอโคไล gE pGEX 5X-3 JM109 ที่ตรวจสอบทิศทางแล้ว โดยเริ่มจากทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยเลี้ยงใน Difco™ LB Broth ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดออกจาก gE pGEX 5X-3 JM109 โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleospin plasmid kit (Macherey-Nagel, germany) โดยปฏิบัติตามคู่มือของชุดสกัดสำเร็จรูป (แสดงในภาคผนวก) เก็บรักษารีคอมบิแนนท์พลาสมิด gE pGEX 5X-3 ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำมาใช้ต่อไป

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด gE pGEX 5X-3 ส่วนหนึ่งมาทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องอโตเมทเตดดีเอ็นเอซีควนเซอร์ (automated DNA sequencer) โดยใช้

ไพรเมอร์มาตรฐานคือ pGEX 5' ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ และ pGEX 3' รีเวิร์สไพรเมอร์ และตรวจสอบ ยืนยันโดยใช้โปรแกรม MEGA4 เพื่อยืนยันว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยูนิตข้อต่อ 8 และมี ทิศทางที่ถูกต้อง

การย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* ที่มีความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนท์ โปรตีน (expression vector)

ทำการย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิด gE pGEX 5x-3 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สาย พันธุ์ Rosetta DE3 pLysS (EMD Chemicals, USA.) โดยใช้วิธีเคมี คัลทรานซ์ฟอว์เมชันด้วย แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂-induced transformation) ได้เป็นรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย gE pGEX 5X-3 Ros ทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย gE pGEX 5X-3 Ros ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มี ส่วนผสมของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและคลอแรมเฟนิคัลความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 – 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่ได้ผสม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอลอยู่ร้อยละ 50 ในอัตราส่วน 1:1 เก็บ รักษาแบคทีเรียไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำมาใช้ต่อไป

การกระตุ้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำแบคทีเรีย gE pGEX 5X-3 Ros จาก -80 องศาเซลเซียส มาขีดลงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและคลอแรมเฟนิคัลความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยการเลี้ยงใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและคลอแรมเฟนิคัล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบต่อนาที จนอาหารเลี้ยงเชื้อมี optical density ที่ 600 nm เป็น 0.6 ทำการเติม isopropy 1-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส 3-4 ชั่วโมง เก็บแบคทีเรียโดยการปั่นที่ 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 60 นาที เก็บส่วน ตะกอน ทำการกระจายตะกอนแล้วเติมสารละลาย phosphate buffer saline ทำแบคทีเรียให้แตก ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic sonicator) โดยแต่ละหลอดจะทำการให้คลื่นเสียงนาน 30 วินาที สลับกับช่วงพัก 10 วินาที (ON: 30, OFF: 10) ทำซ้ำ 10 - 15 รอบ หรือจนกว่าตัวอย่างจะมี ลักษณะโปร่งแสง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 60 นาที เพื่อแยกส่วน ตะกอนแบคทีเรียออกไป เก็บส่วนใสเป็นโปรตีนละลายน้ำทั้งหมด (soluble protein) ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

การตรวจหารีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มาผสมกับโพลีดีนิงบัฟเฟอร์ (loading buffer) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วมาทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก) ทำการย้อมสีโปรตีนบนแผ่นเจลด้วยสารละลาย SimplyBlue™ (Invitrogen, USA) โดยเทสี SimplyBlue™ พอท่วมเจล และตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วบันทึกผล

การทดสอบด้วยวิธี western immunoblotting

ทำการย้ายโปรตีนที่อยู่บนเจลจากการทำ SDS-PAGE เข้าสู่แผ่น PVDF เมมเบรน (Polyvinylidene Fluoride membrane) ด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 70 นาที จากนั้นทำการทดสอบด้วยโปรตีนบนแผ่น PVDF ด้วยซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมและ ซีรัม สุกรที่ให้ผลลบต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก)

การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ (protein purification)

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี western immunoblotting แล้วมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด bulk GST purification module (GE healthcare, UK) โดยผสม 50% slurry GS4B ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (การเตรียม GS4B matrix ดูรายละเอียดในภาคผนวก) ลงในส่วนที่เป็นโปรตีนละลายน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร (จากขั้นตอนการทำให้แบคทีเรียแตกด้วยวิธี sonication) บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 50 นาที เพื่อให้ GS4B จับกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความแรง 500xg เป็นเวลา 5 นาที (เพื่อให้ GS4B matrix อัดแน่น) ดูดส่วนใสทิ้งไป และเติมสารละลายพีเอเอสเย็น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปใน GS4B matrix กระจายตะกอน GS4B matrix เบาๆ จนมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (เพื่อเป็นการล้างโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องออกจาก GS4B matrix) ปั่นด้วยความแรง 500xg เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป ทำการล้าง GS4B matrix ด้วยวิธีการเดิมอีก 3 ครั้ง ดูด GS4B matrix มาใส่ในโครมาโตกราฟีคอลัมน์ (chromatography column) เติมกลูตาไธโอนอีลูชันบัฟเฟอร์ (glutathione elution buffer) [10 mM glutathione ใน 50 mM Tris-HCl (pH8.0)] ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้สารละลายเป็น fraction โดยแต่ละ fraction มีปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำการสกัดสารละลาย (elute) สลับ

กับการบ่มที่อุณหภูมิห้องจนได้ครบทั้ง 20 fraction รวม fraction ที่ 1 – 5 เข้าด้วยกัน (5 มิลลิลิตร) รวม fraction ที่ 6 – 10 เข้าด้วยกัน (5 มิลลิลิตร) รวม fraction ที่ 11 – 15 เข้าด้วยกัน (5 มิลลิลิตร) และรวม fraction ที่ 15 – 20 เข้าด้วยกัน (5 มิลลิลิตร) เก็บรักษารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

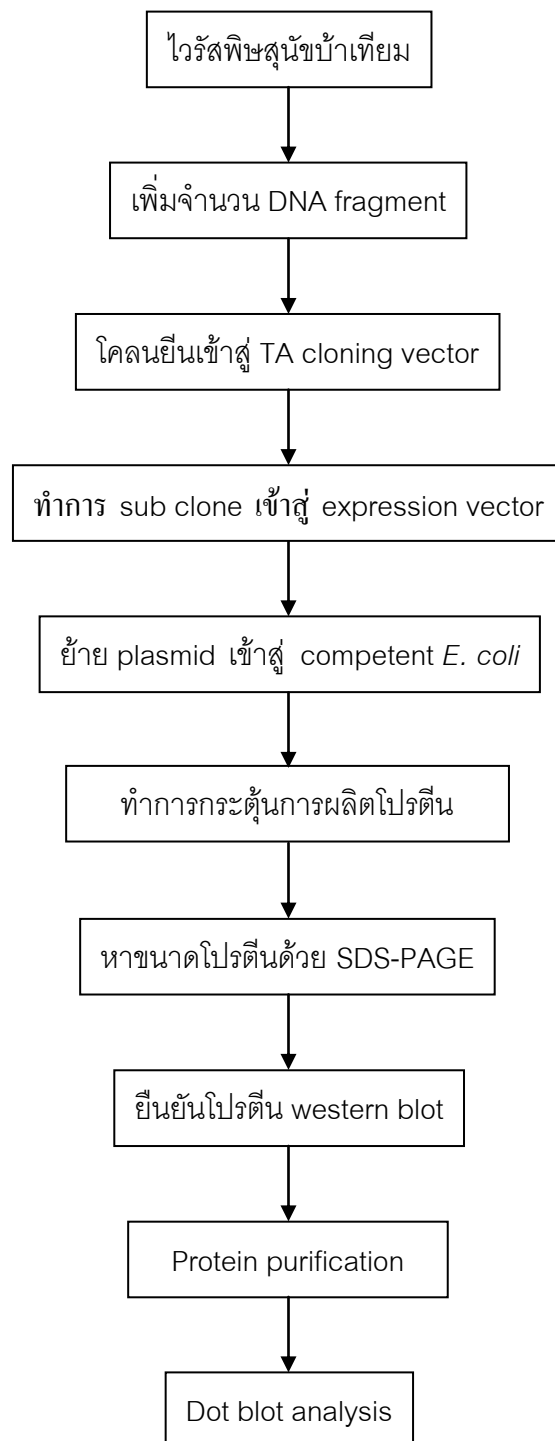
การวัดปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำ รีคอมบิแนนท์โปรตีนมาวัดปริมาณด้วยวิธี Bradford assay โดยการเตรียมชุดทดสอบ Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, USA) นำโปรตีนมาตรฐานจากชุดทดสอบที่มีความเข้มข้นโปรตีน 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับ 1x dye reagent ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำไปวัด optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 595 nm เพื่อทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) หาสมการเส้นตรง นำตัวอย่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการจะวัดปริมาณผสมกับ 1x dye reagent ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำไปวัด optical density ที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่า OD ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีนโดยแทนค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

การนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนมาทำการทดสอบ dot blot analysis

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความสามารถในการจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมด้วยวิธี dot blot (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก) โดยมีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้ นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปริมาณ 2 ไมโครลิตร มาหยดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellulose membrane) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ทำการ blocking ด้วยสารละลาย blocking buffer แล้วบ่มเป็นเวลา ประมาณ 2 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย TBS 3 ครั้ง ทำการเติมแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ซึ่งคือซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมหรือ ซีรัมสุกรที่ให้ผลลบต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม ปริมาณ 8 ไมโครลิตรต่อสารละลาย (BSA 0.4 ml + DSW 3.6 ml) 4 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:200) บ่มที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBS 3 ครั้ง เจือจางแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (secondary enzyme-labeled antibodies) HRP-labeled goat anti-swine immunoglobulin G แล้วบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBS 3 ครั้ง เติมสับสเตรต DAB (3',3'-diaminobenzidine) อ่านผลจากการปรากฏของสีส้ม

สรุปโครงสร้างการวิจัย



ภาพที่ 8 กรอบแนวคิดการวิจัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสส่วน gE ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

ผู้วิจัยทำการสกัดดีเอ็นเอของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม หมายเลข 8NP74 ที่ทำการเพาะเลี้ยงผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงจากหน่วยชั้นสูตโรคสัตว์คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำดีเอ็นเอของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 500 - 600 คู่เบส (ภาพที่ 9)

2. การโคลน (clone) gE fragment เข้าสู่ pGEX 5X-3 vector และการตรวจสอบทิศทาง

นำ gE fragment โคลนเข้าสู่ pGEM-T vector ได้เป็น gE pGEM-T จากนั้นจึงย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้เข้าสู่ *E. coli* JM109 ได้เป็น gE pGEM-T JM109 ทำการคัดเลือกโคลนที่มีทิศทางการเรียงตัวของ gE fragment อย่างถูกต้องด้วยวิธีพีซีอาร์ นำ gE pGEM-T ที่มีทิศทางถูกต้องไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 10) นำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Us8 ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมจากประเทศต่างๆ ที่มีการรายงานใน genbank และทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007) พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอ gE ที่ใช้ในการวิจัยนี้จัดอยู่กลุ่มเดียวกับไวรัสจากประเทศจีน เกาหลีใต้และมาเลเซีย ดังภาพที่ 11

นำพลาสมิด gE pGEM-T ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ EcoRI เพื่อตัดแยกส่วน gE fragment ออกจากพลาสมิด pGEM-T เมื่อทำการทดสอบผลการตัดย่อยด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบมีแถบเรืองแสง 2 แถบ แถบแรกมีขนาดมากกว่า 1 kb ซึ่งน่าจะเป็นส่วนของพลาสมิด pGEM-T ที่ถูกตัด แถบที่สองมีขนาดประมาณ 600 bp ทำการตัดเจลที่แถบที่สอง (ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของ gE fragment ที่ได้จากการคำนวณ) แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Germany) ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์ทำการแบ่งตัวอย่างที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการตรวจสอบซ้ำด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบมีแถบเรืองแสงเพียงแถบเดียวที่ขนาดประมาณ 600 bp เก็บตัวอย่างที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

นำพลาสมิด pGEX 5x-3 (ขนาดประมาณ 4.9 กิโลเบส) มาทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ EcoRI แล้วนำสารสกัดทั้งหมดไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Germany) นำพลาสมิดที่ตัดแล้วไปทำการ Dephosphorylation แล้วนำสารสกัดทั้งหมดไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Germany) ทดสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบแถบเรืองแสงเพียงแถบเดียวที่ ขนาดมากกว่า 1 kb เก็บตัวอย่างที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

นำ gE fragment ที่ตัดจากพลาสมิด gE pGEM-T มาต่อเข้ากับพลาสมิด pGEX 5x-3 ด้วยวิธีไลगेชัน จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ย้ายเข้าสู่แบคทีเรีย JM109 ซึ่งได้เป็น gE pGEX 5x-3 JM109 ทำการคัดเลือกโคลนที่มีการเรียงตัวของ gE fragment ในทิศทางที่ ถูกต้องภายในพลาสมิด pGEX 5x-3 ทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ผลดังภาพที่ 12 เลือก gE pGEX 5x-3 JM109 โคลนที่ 3 และ 5 มาเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด ทำการย้ายพลาสมิดเข้าไปใน แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS (EMD Chemicals, USA.) แล้วทำการ ตรวจสอบทิศทางอีกครั้งได้ผลดังภาพที่ 13

ทำการเลือกพลาสมิด gE pGEX 5x-3 ที่ตรวจทิศทางแล้ว (โคลนที่ 3 และ 5) มา หล่าดับนิวคลีโอไทด์ได้ผลดังภาพที่ 14 ซึ่งมีทิศทางและลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้อง ทำการ วิเคราะห์คำนวณการ translation หล่าดับกรดอะมิโนดังภาพที่ 15 และคำนวณน้ำหนักของ โปรตีนที่จะผลิตโดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0 และมี สัดส่วนของกรดอะมิโนในแต่ละชนิดดังภาพที่ 16 คำนวณได้ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเฉพาะ ส่วน gE ได้ประมาณ 20.9 กิโลดาลตัน เมื่อรวมกับขนาดโปรตีนส่วน Glutathione-S-transferase ที่มีขนาดประมาณ 26 กิโลดาลตัน จะได้ขนาดรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งหมดประมาณ 47 กิโลดาล ตัน

3. ผลการกระตุ้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ผลการกระตุ้นแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่มีพ ลาสมิด gE pGEX 5x-3 เมื่อทำการทดสอบบน SDS-PAGE จะพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 40 kDa ที่มีความหนาแน่นมากกว่า ตัวอย่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่ไม่มีพลาสมิด gE pGEX 5x-3 ดังภาพที่ 17 นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตไปทำ การทดสอบ western blot analysis กับตัวอย่างซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกและผลลบต่อชุดทดสอบ

HerdCheck Anti-ADV gpl (IDEXX, USA.) พบว่าให้ผลบวกกับซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกต่อชุดทดสอบอีไลซาและให้ผลลบกับซีรัมสุกรที่ให้ผลลบต่อชุดทดสอบอีไลซา ดังภาพที่ 18

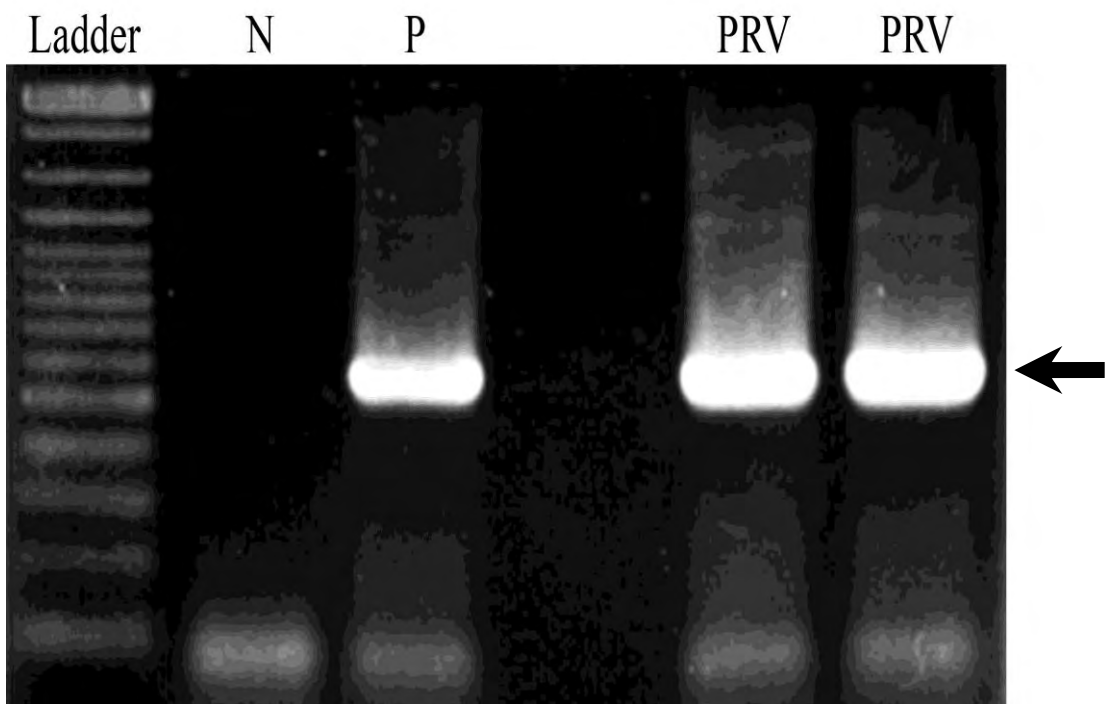
นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด bulk GST purification module (GE healthcare, UK) แล้วนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละ fraction มาทดสอบ SDS-PAGE ได้ผลดังภาพที่ 19 นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปทำการทดสอบ western blot analysis กับตัวอย่างซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกต่อชุดทดสอบ HerdCheck Anti-ADV gpl (IDEXX, USA.) พบว่าให้ผลบวกดังภาพที่ 20

4. ผลการวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว fraction ที่ 4 ไปคำนวณหาความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, USA) โดยได้กราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 21) ที่มีสมการเส้นตรงคือ $y = 0.8726x - 0.0213$ เมื่อแทนค่าการดูดกลืนแสงของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้จะได้ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตจากการเลี้ยงแบคทีเรียปริมาตร 250 มิลลิลิตรเป็น 179 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตรคิดเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งหมด 895 มิลลิกรัม

5. ผลการทดสอบ dot blot analysis

นำซีรัมที่ให้ผลบวกหรือลบต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมที่ทดสอบด้วยชุดอีไลซา HerdCheck Anti-ADV gpl (IDEXX, USA.) มาทดสอบ dot blot analysis (ภาพที่ 22) ได้ผลสอดคล้องกับผลจากชุดอีไลซา



ภาพที่ 9 gE fragment ที่มีขนาดประมาณ 573 คู่เบส (แถบ PRV ตำแหน่งลูกศร) ที่แสดงบน 1.5% agarose gel electrophoresis Ladder คือ 100 คู่เบสดีเอ็นเอแลตเตอร์ N คือ ตัวอย่างควบคุมลบ P คือ ตัวอย่างควบคุมบวก


```

                                10          20          30          40          50
4 gE pGEM-T(gE)  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
GGCGACGATG ACCTCAACGG CGACCTCGAC GGCGACGACC GCCGCGCGGG
6 gE pGEM-T(gE)  GGCGACGATG ACCTCAACGG CGACCTCGAC GGCGACGACC GCCGCGCGGG
FJ176390 Malaysia GGCGACGATG ACCTCAACGG CGACCTCGAC GGCGACGACC GCCGCGCGGG
Clustal Consensus *****

                                60          70          80          90          100
4 gE pGEM-T(gE)  CTTCGGCTCG GCCCTCGCCT CCCTGAGGGA GGCGCCCCCG GCCCATCTGG
6 gE pGEM-T(gE)  CTTCGGCTCG GCCCTCGCCT CCCTGAGGGA GGCGCCCCCG GCCCATCTGG
FJ176390 Malaysia CTTCGGCTCG GCCCTCGCCT CCCTGAGAGA GGCGCCCCCG GCCCATCTGG
Clustal Consensus ***** **

                                110         120         130         140         150
4 gE pGEM-T(gE)  TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
6 gE pGEM-T(gE)  CGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
FJ176390 Malaysia TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
Clustal Consensus *****

                                160         170         180         190         200
4 gE pGEM-T(gE)  GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
6 gE pGEM-T(gE)  GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
FJ176390 Malaysia GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
Clustal Consensus *****

                                210         220         230         240         250
4 gE pGEM-T(gE)  CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
6 gE pGEM-T(gE)  CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
FJ176390 Malaysia CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
Clustal Consensus *****

                                260         270         280         290         300
4 gE pGEM-T(gE)  TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
6 gE pGEM-T(gE)  TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
FJ176390 Malaysia TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
Clustal Consensus *****

                                310         320         330         340         350
4 gE pGEM-T(gE)  TACCTGCCGC CCGAGGTGCC GCGGCTCCGG CGCGAGCCGC CCATCGTCAC
6 gE pGEM-T(gE)  TACCTGCCGC CCGAGGTGCC GCGGCTCCGG CGCGAGCCGC CCATCGTCAC
FJ176390 Malaysia TACCTGCCGC CCGAGGTGCC GCGGCTCCGG CGCGAGCCGC CCATCGTCAC
Clustal Consensus *****

                                360         370         380         390         400
4 gE pGEM-T(gE)  CCCGGAGCGG TGGTCGCCGC ACCTGAGCGT CCTGCGGGCC ACGCCCAACG
6 gE pGEM-T(gE)  CCCGGAGCGG TGGTCGCCGC ACCTGAGCGT CCTGCGGGCC ACGCCCAACG
FJ176390 Malaysia CCCGGAGCGG TGGTCGCCGC ACCTGAGCGT CCTGCGGGCC ACGCCCAACG
Clustal Consensus *****
```

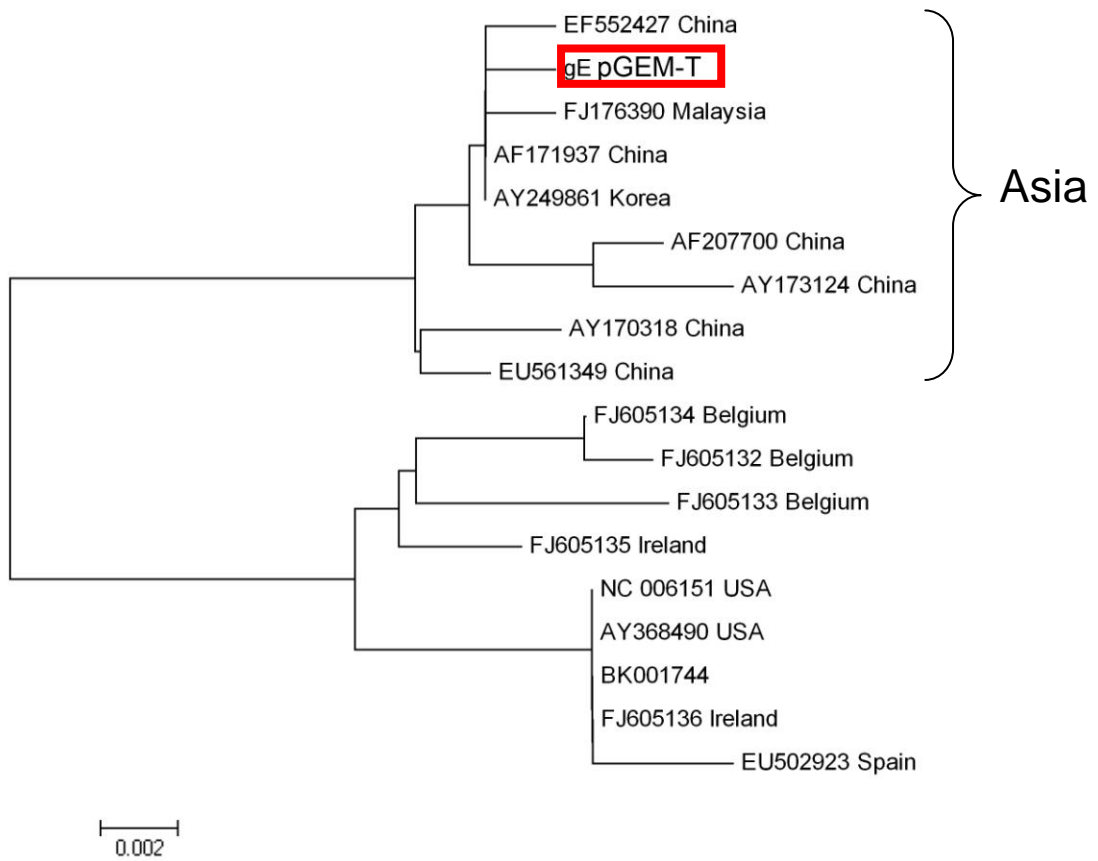
```

                                410          420          430          440          450
    4 gE pGEM-T(gE)      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    6 gE pGEM-T(gE)      ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    FJ176390 Malaysia    ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    Clustal Consensus    *****
                                460          470          480          490          500
    4 gE pGEM-T(gE)      TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    6 gE pGEM-T(gE)      TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    FJ176390 Malaysia    TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    Clustal Consensus    *****
                                510          520          530          540          550
    4 gE pGEM-T(gE)      .....|...| .....|...| .....|...| .....|...| .....|...|
    6 gE pGEM-T(gE)      CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
    FJ176390 Malaysia    CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
    Clustal Consensus    *****

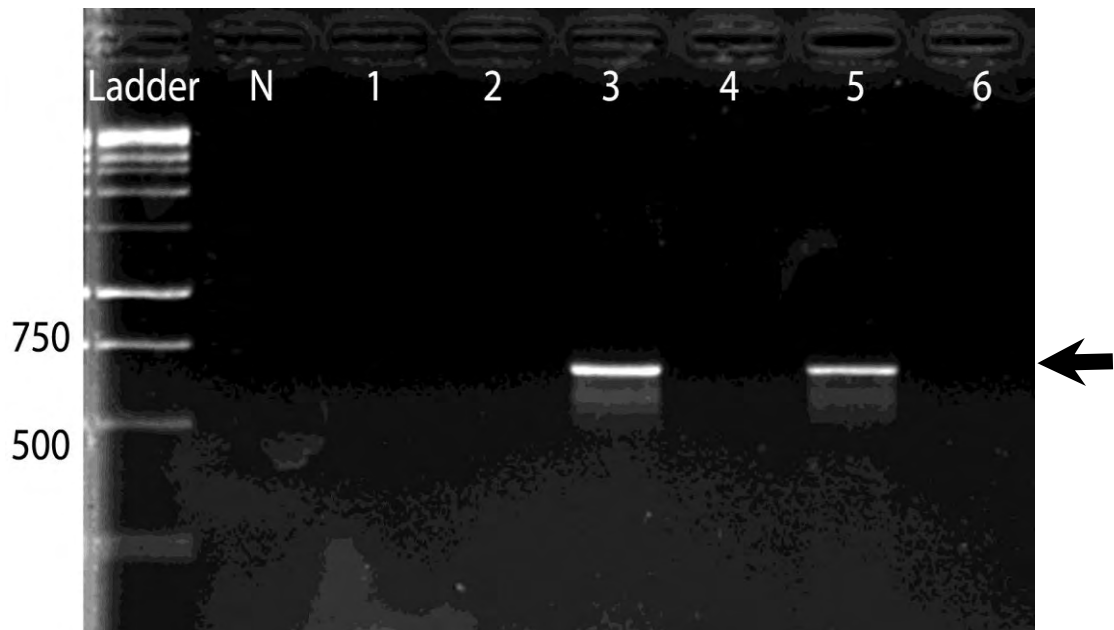
    4 gE pGEM-T(gE)      ....|...
    6 gE pGEM-T(gE)      TCTCGCCC
    FJ176390 Malaysia    TCTCGCCC
    Clustal Consensus    *****

```

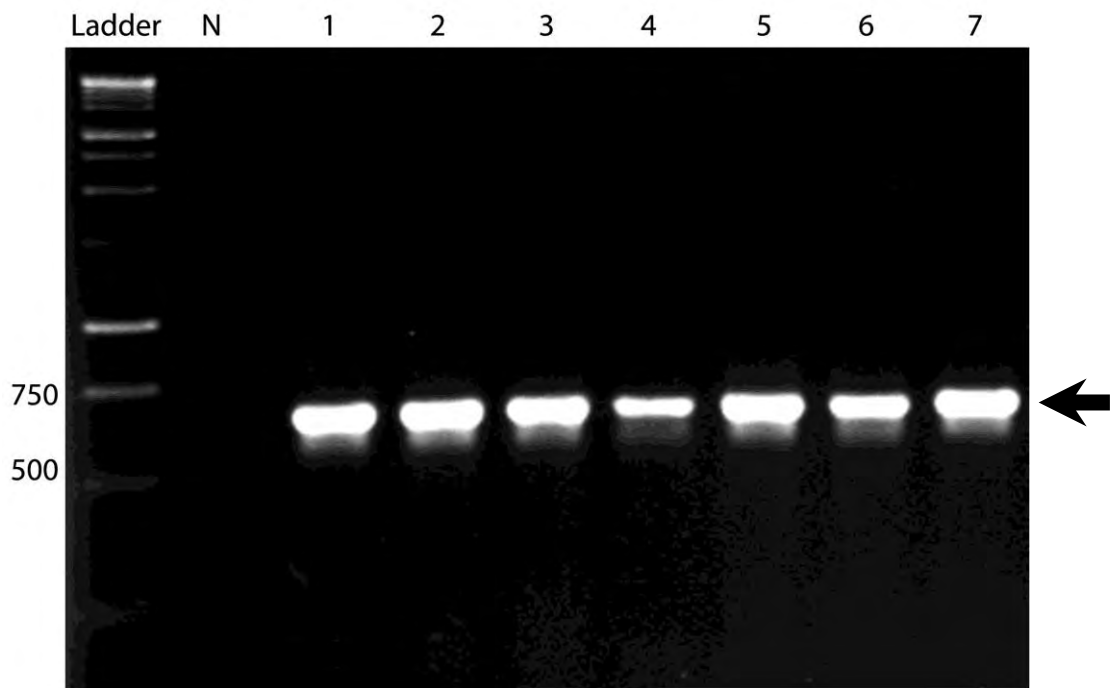
ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วน gE ของพลาสมิด gE pGEM-T ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มีพลาสมิด gE pGEM-T (gE pGEM-T JM109) 4 gE pGEM-T และ 6 gE pGEM-T คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมที่ใช้ในการวิจัย FJ176390 Malaysia คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Us8 ในไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมจากประเทศมาเลเซีย



ภาพที่ 11 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ส่วน gE fragment ใน gE pGEM-T เมื่อเปรียบเทียบกับ Us8 ยีนจากไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมของประเทศต่างๆที่มีข้อมูลอยู่ใน genbank



ภาพที่ 12 การตรวจสอบทิศทางของ gE fragment ภายใน gE pGEX 5x-3 Ladder คือ 1000 คู่เบสดีเอ็นเอแลดเดอร์ N คือ ตัวอย่างควบคุมลบ แถวที่ 1-6 คือ ตัวอย่างพลาสมิดจากแบคทีเรีย gE pGEX 5x-3 JM109 โคลนที่ 1-6 โดยโคลนที่มีทิศทางที่ถูกต้องคือ โคลนที่ 3 และ 5 (ตำแหน่งลูกศร)



ภาพที่ 13 การตรวจสอบทิศทางของ gE fragment ภายใน gE pGEX 5x-3 Ladder คือ 1000 คู่เบสดีเอ็นเอแลดเดอร์ N คือ ตัวอย่างควบคุมลบ แถวที่ 1-7 คือ ตัวอย่างพลาสมิดจากแบคทีเรีย gE pGEX 5x-3 Ros โคลนที่ 1-7 (ตำแหน่งลูกศร)

```

      10      20      30      40      50
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
GGTCGTGGGA TCCCAGGAA TTCGATTGGA TCCGCCGGCG ACGATGACCT CAACGGCG

      70      80      90      100     110
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
CTCGACGGCG ACGACCGCCG CGCGGGCTTC GGCTCGGCC TCGCCTCCCT GAGGGAGG

     130     140     150     160     170
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
CCCCGGGCC ATCTGGCGAA CGTGTCCGAG GGCGCCAAC TCACCCTCGA CGCGCGCG

     190     200     210     220     230
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
GACGGCGCCG TGCTGGCCGG GATCTGGACG TTCCTGCCCG TCCGCGGCTG CGACGCCG

     250     260     270     280     290
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
TCGGTGACCA CGGTGTGCTT CGAGACCGCG TGCCACCCGG ACCTGGTGCT GGGCCCGC

     310     320     330     340     350
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
TGCGTCCCGG AGGCCCCGGA GATGGGCATC GGCGACTACC TGCCGCCCGA GGTGCCCG

     370     380     390     400     410
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
CTCCGGCGCG AGCCGCCCAT CGTCACCCCG GAGCGGTGGT CGCCGCACCT GAGCGTCC

     430     440     450     460     470
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
CGGGCCACGC CCAACGACAC GGGCCTCTAC ACGCTGCACG ACGCCTCGGG GCCGCGGG

     490     500     510     520     530
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
GTGTTCTTTG TGGCGGTGGG CGACCGGCCG CCCGCGCCGG CGGACCCGGT GGGCCCCG

     550     560     570     580     590
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....
CGCCACGAGC CCGCTTCCA CGCGCTCGGC TTCCACTCGC AGCTCTTCTC GCCC

```

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด gE pGEX 5x-3 ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่มีพลาสมิด gE pGEX 5x-3 (gE pGEX 5x-3 Ros) โดยตำแหน่งที่ 1-6 เป็นส่วนหนึ่งของ factor Xa ตำแหน่งที่ 37 เป็นต้นไปเป็นส่วนของ gE

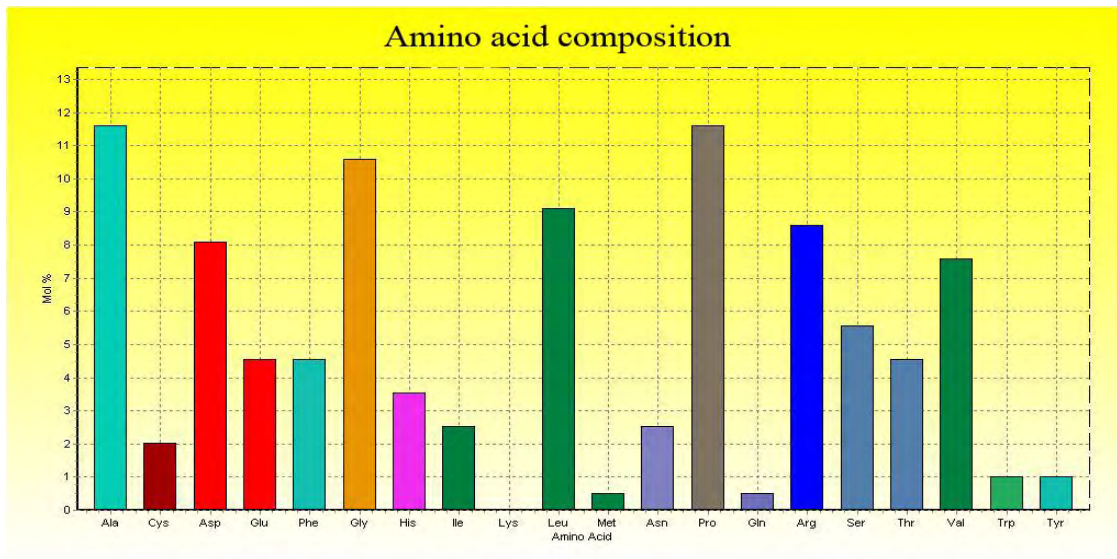
```
          10          20          30          40          50
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GDDLNGDLD GDDRAGFGS ALASLREAPP AHLANVSEGA NFDLDARGDG

          60          70          80          90          100
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
AVLAGIWTFE PVRGCDVSV TVVCFETACH PDLVLGRACV PEAPEMGIGD

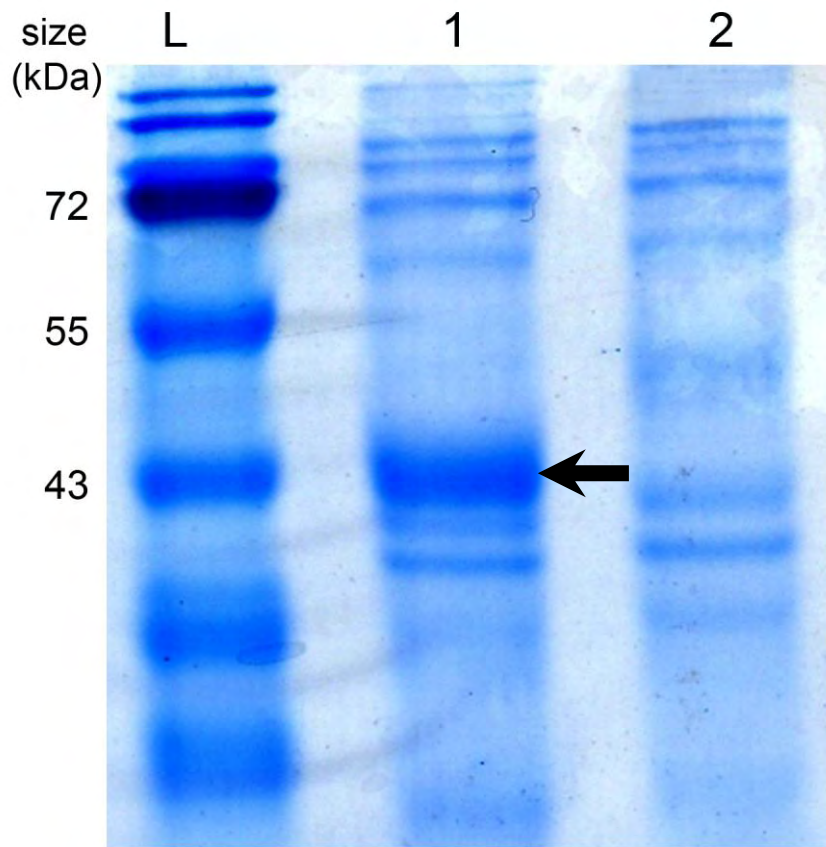
          110         120         130         140         150
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
YLPPEVPRLR REPPIVTPER WSPHLSVLRA TPNDTGLYTL HDASGPRAVF

          160         170         180
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.
FVAVGDRPPA PADPVGPARH EPRFHALGFH SQLEFSP
```

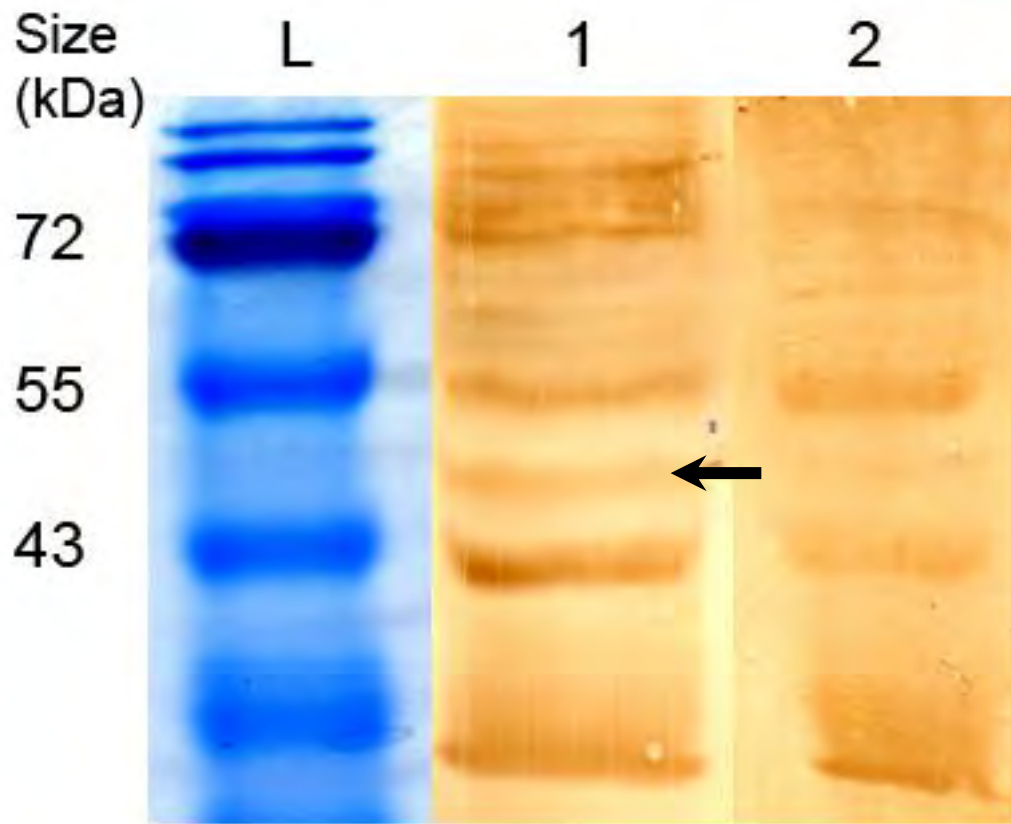
ภาพที่ 15 ลำดับกรดอะมิโนเฉพาะส่วน gE ที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน gE ของพลาสมิด gE pGEX 5x-3 ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่มีพลาสมิด gE pGEX 5x-3 (gE pGEX 5x-3 Ros)



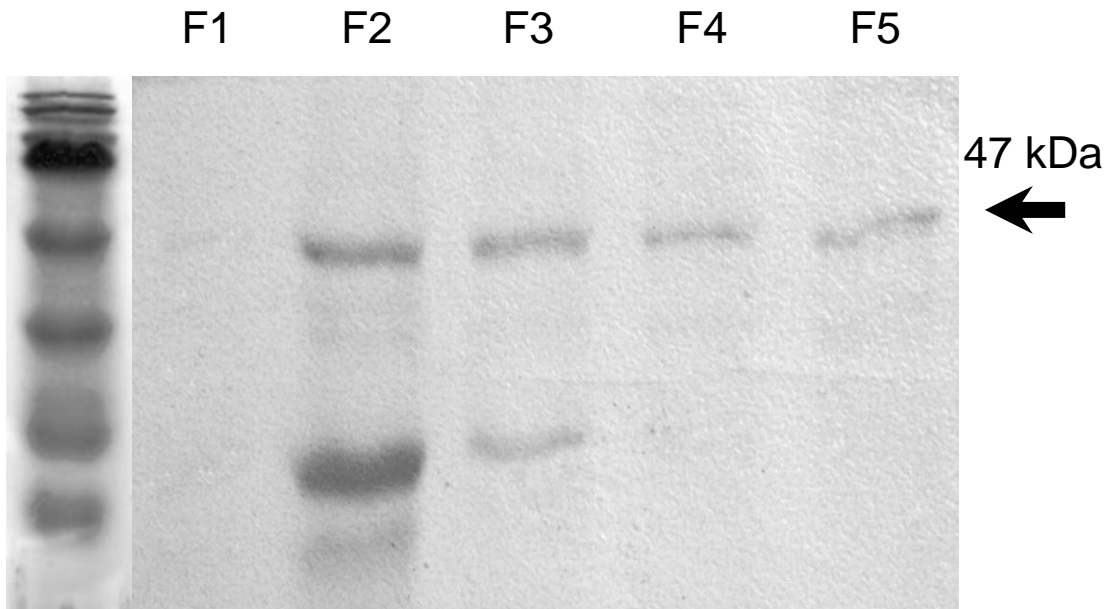
ภาพที่ 16 สัดส่วนชนิดกรดอะมิโนเฉพาะส่วน gE ที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน gE ของพลาสมิด gE pGEX 5x-3 ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่มีพลาสมิด gE pGEX 5x-3 (gE pGEX 5x-3 Ros)



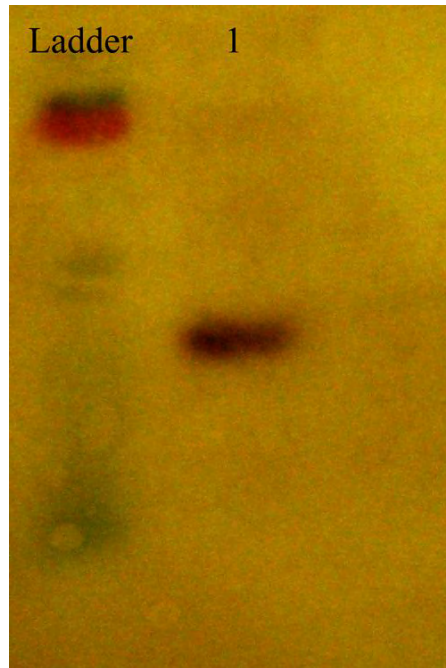
ภาพที่ 17 SDS-PAGE แถว L คือ โปรตีนแลคโตส แถว 1 คือ โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่มีพลาสมิด gE pGEX 5x-3 (ลูกศรชี้) แถวที่ 2 คือ โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่ไม่มี gE fragment



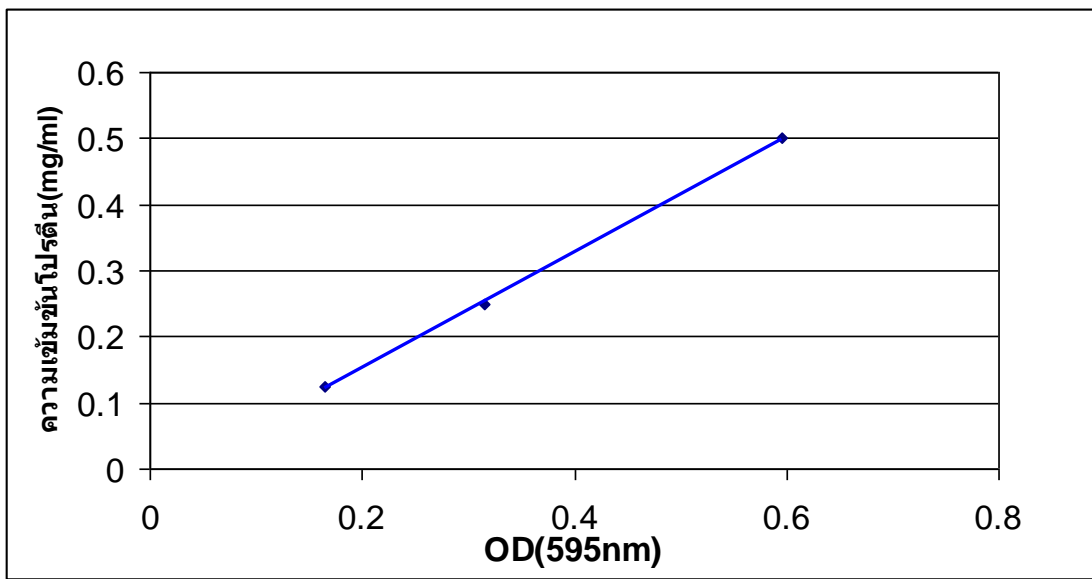
ภาพที่ 18 Western blot analysis แถว L คือ โปรตีนแลตเตอร์ แถว 1 คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่มี gE fragment เมื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมสุกที่ให้ผลบวกกับไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมด้วยวิธีอิลไลซา ลูกศรแสดงตำแหน่งของรีคอมบิแนนท์โปรตีน แถว 2 คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่มี gE fragment เมื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมสุกที่ให้ผลลบกับไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมด้วยวิธีอิลไลซา



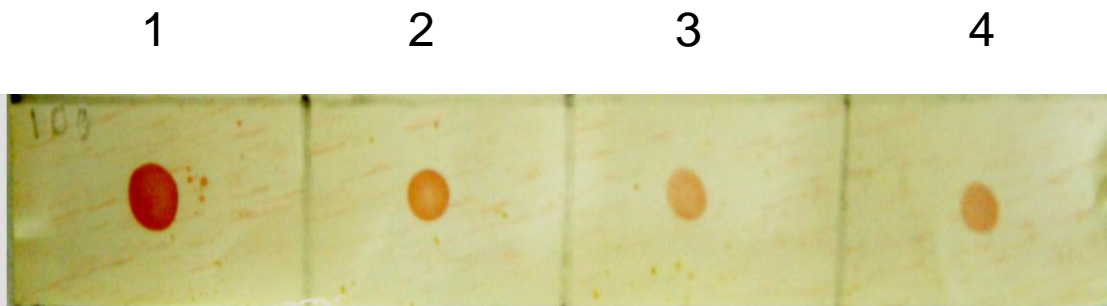
ภาพที่ 19 SDS-PAGE แถวที่ 1 จากรีคอมบิแนนท์โปรตีน fraction 1 แถวที่ 2 จากรีคอมบิแนนท์โปรตีน fraction 2 แถวที่ 3 จากรีคอมบิแนนท์โปรตีน fraction 3 แถวที่ 4 จากรีคอมบิแนนท์โปรตีน fraction 4 แถวที่ 5 จากรีคอมบิแนนท์โปรตีน fraction 5 ลูกศรชี้ตำแหน่งขนาดประมาณ 47 kDa



ภาพที่ 20 แถวที่ 1 western blot analysis ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยใช้
ซีรัมสุกที่ให้ผลบวกกับไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมด้วยวิธีอิลไลซา



ภาพที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและ optical density ที่ความยาวคลื่น 595 nm คำนวณสมการเส้นตรงได้ $y = 0.8726x - 0.0213$



ภาพที่ 22 dot blot analysis ทำการทดสอบโดยใช้ซีรัมที่ให้ผลบวกต่อชุดอีไลซา HerdCheck Anti-ADV gpl (IDEXX, USA.) แถวที่ 1 ทำการหยดรีคอมบิแนนท์โปรตีนปริมาณ 100 ng แถวที่ 2 ทำการหยดรีคอมบิแนนท์โปรตีนปริมาณ 50 ng แถวที่ 3 ทำการหยดรีคอมบิแนนท์โปรตีนปริมาณ 25 ng แถวที่ 4 ทำการหยดโปรตีนปริมาณ 12.5 ng

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากส่วนหนึ่งของยีนยูนิค็อกซ์ 8 ของไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่มีพลาสมิด gE pGEX 5x-3 โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 47 กิโลดาลตัน โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้นั้นสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมได้และสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้

2. อภิปรายผลการวิจัย

การผลิตโปรตีนโดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมนั้นนิยมใช้สิ่งมีชีวิตที่ทำงานเป็นเซลล์โฮสต์ ในการผลิตโปรตีนอยู่ 2 กลุ่ม คือสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต (prokaryote) และยูคาริโอต (eukaryote) ในกลุ่มโปรคาริโอตนิยมใช้แบคทีเรีย *E. coli* ส่วนกลุ่มยูคาริโอตนั้นนิยมใช้ ยีสต์ เซลล์แมลง (insect cells) หรือเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) เป็นต้น การใช้แบคทีเรีย *E. coli* มีข้อดีหลายประการ คือ สามารถผลิตโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว ผลิตได้ปริมาณสูง ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและผลิตจำนวนมาก ค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ก็มีข้อเสียคือ โปรตีนที่มีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) จะผลิตได้ยาก โปรตีนที่ผลิตได้จะไม่ผ่านกระบวนการ post-translational modification เช่น glycosylation โปรตีนที่ผลิตได้มักจะอยู่ในรูปของอินคลูชันบอดี้ (inclusion bodies) ทำให้ยากต่อการทำให้บริสุทธิ์ (Demain and Vaishnav, 2009) โปรตีนที่ได้อาจเกิดการเสียสภาพ (denature) หรือพับไม่ถูกต้อง (refolding) (Choi and Lee, 2004; Maldonado et al., 2007)

จากที่กล่าวมาข้อด้อยของการใช้แบคทีเรีย *E. coli* นั้นข้อที่จะมีผลกระทบกับโปรตีนที่ผู้วิจัยทำการศึกษาคือ โปรตีนที่ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมผลิตจากยีน Us 8 นั้นเป็นไกลโคโปรตีน (ไกลโคโปรตีนอื่น) ซึ่งอาจมีปัญหาในแง่ของความสามารถจับกับแอนติบอดีของสุกรที่ติดเชื้อได้ แต่จากการศึกษาการแสดงออกของยีน Us 8 ในแบคทีเรีย *E. coli* ที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. coli* สามารถจับกับแอนติบอดีของสุกรที่ติดเชื้อได้ (Yong et al., 2005) และมีการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจ latex agglutination (Yong et al., 2005) ดังนั้นในแง่คุณสมบัติในการเป็นโปรตีนที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมนั้นน่าจะสามารถใช้งานได้ แม้ว่าโครงสร้างบางอย่างของรีคอมบิแนนท์

โปรตีนจะมีความแตกต่างจากโปรตีนที่ไวรัสผลิตตามธรรมชาติก็ตาม ซึ่งการใช้แบคทีเรีย *E.coli* ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน gE เพื่อนำมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบนั้นได้มีการใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งการพัฒนา latex agglutination test (Yong et al., 2005) และอีไลซา (Ro et al., 1995) แต่ นอกจากการใช้แบคทีเรียแล้วยังมีการใช้ยีสต์และแบคคูลิวไรรัส (Baculovirus) ในการผลิตโปรตีนเพื่อพัฒนาชุดทดสอบเช่นกัน (Banks, 1994; Ao et al., 2003; Gomez-Sebastian et al., 2008) ในส่วนของโปรตีนที่ผลิตในงานวิจัยนี้นั้นเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากแบคทีเรีย *E.coli* ที่มีโปรตีน Glutathione S-transferase (GST) ติดอยู่ที่ปลายด้าน N-Terminal

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดสอบหาลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ซึ่งทำให้ไม่สามารถยืนยันได้ว่าลำดับกรดอะมิโนนั้นตรง ตามที่ผู้วิจัยทำการคำนวณจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ แต่ผู้วิจัยได้พยายามทดสอบด้วยวิธีอื่นๆ เพื่อยืนยันชนิดและคุณสมบัติของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบทิศทางของพลาสมิด gE pGEX 5x-3 เพื่อยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และ มีทิศทางถูกต้อง นอกจากนี้ยังทำการทดสอบ western blot analysis และ dot blot analysis เพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่สามารถจับกับแอนติบอดีจากซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกต่อชุดอีไลซา HerdCheck Anti-ADV gpl (IDEXX, USA) ดังนั้นจึงสามารถอนุมานได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้มีคุณสมบัติถูกต้องตามที่คาดหวัง

ในส่วนของความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้นั้น จากผลการทดลองยังพบว่าความบริสุทธิ์ที่ได้ยังไม่น่าพอใจเท่าที่ควรเนื่องจากยังสามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนขนาดอื่นๆ ปรากฏอยู่บนเจลของ SDS-PAGE (ภาพที่ 19) ใน fraction 2 และ 3 ทำให้ผู้วิจัยต้องเลือกนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน fraction ที่สูงขึ้นเพื่อให้ได้ระดับความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนมากขึ้นซึ่งทำให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของ รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่จะนำไปใช้ลดลง เนื่องจากหากนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีโปรตีนบางส่วนของแบคทีเรียไปใช้ในการผลิตชุดทดสอบอาจทำให้เกิดปัญหาผลบวกลวง (false positive) ได้

3. ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากปัญหาในแง่ความบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทำให้ได้ปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่จะนำไปใช้ได้ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นอาจพิจารณาทางแก้ปัญหาได้ดังนี้ 1) เพิ่มปริมาณการผลิตขึ้นเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่มากพอแต่จะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการผลิตโปรตีน 2) พิจารณาเปลี่ยนชุดการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นทำให้ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่บริสุทธิ์ตั้งแต่ fraction ต้นๆ 3) พิจารณาเปลี่ยนชนิดของพลาสมิดที่ใช้เพื่อให้ได้รีคอม

บีแนนท์โปรตีนที่ง่ายในการทำให้บริสุทธิ์เช่น ใช้พลาสมิดกลุ่มที่ให้โปรตีน His tag 4) เปลี่ยนไปใช้ระบบการผลิตโปรตีนของยีสต์เนื่องจากสุกเร็วโดยทั่วไปไม่สร้างแอนติบอดีต่อยีสต์ทำให้ไม่ต้องกังวลในการนำโปรตีนที่มีการปนเปื้อนเล็กน้อยมาใช้เป็นชุดทดสอบ

รีคอมบีแนนท์โปรตีนที่ผู้วิจัยผลิตขึ้นมาในงานวิจัยนี้ สามารถนำไปพัฒนาชุดทดสอบโรคพิษสุนัขบ้าเทียมทั้งในรูปแบบของ ชุดทดสอบแบบอิมมูโนโครมาโตกราฟีฟลักซึ่งยังไม่เคยมีใครพัฒนาสำหรับตรวจโรคพิษสุนัขบ้าเทียมมาก่อน หรือนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจอีไลซ่าเพื่อทดแทนการนำเข้าชุดทดสอบจากต่างประเทศ ซึ่งในผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรนำไปพัฒนาทั้งสองแบบเนื่องจากแต่ละแบบมีข้อดีที่แตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์การใช้งานคือ ชุดตรวจอีไลซ่าสามารถใช้ได้ดีในการตรวจเพื่อบอกสถานะของโรคภายในฟาร์มเหมาะแก่การใช้ในการสำรวจโรคประจำปีหรือตรวจเฝ้าระวัง ส่วนชุดอิมมูโนโครมาโตกราฟีฟลักเหมาะสำหรับการตรวจที่ต้องการผลรวดเร็วและพกพาติดตัวไปใช้ในภาคสนามได้สะดวกเช่น ในกรณีการตรวจก่อนรับสุกรเข้าฟาร์มหรือตรวจบนรถขนส่งสุกร เป็นต้น นอกจากนี้จากการประเมินของผู้วิจัยชุดอิมมูโนโครมาโตกราฟีฟลัก มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าชุดตรวจอีไลซ่า ดังนั้นจึงควรที่จะทำการวิจัยต่อไปเพื่อให้ประสบความสำเร็จในการผลิตชุดทดสอบโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในอนาคตซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการเคลือบโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส หาปริมาณคอนจูเกตแอนติบอดีที่เหมาะสม ประกอบเป็นชุดทดสอบและทำการทดสอบหาความไวและความจำเพาะ

หลังจากสามารถทำการผลิตชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพน่าพอใจในระดับห้องปฏิบัติการสำเร็จแล้ว ควรมีการวิจัยเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม สำหรับการผลิตรีคอมบีแนนท์โปรตีนในคราวละมากขึ้น ควรทำการปรับระดับการผลิตจากระดับห้องปฏิบัติการมาในระดับอุตสาหกรรมโดยปรับเปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิมาเป็นการเลี้ยงในระบบหมัก (fermentation) ที่สามารถควบคุมองค์ประกอบต่างๆที่มีผลในการผลิตรีคอมบีแนนท์โปรตีนเช่น ปริมาณออกซิเจน ความเป็นกรดต่าง และความเร็วในการกวน เพื่อให้ได้รีคอมบีแนนท์โปรตีนปริมาณมากและมีความสม่ำเสมอในแต่ละรอบการผลิต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

มาโนช เฟื่องฟูพงศ์ 2546. ครั้งแรกของรายงานโรคพิษสุนัขบ้าเทียมในประเทศไทย ใน: โรคพิษสุนัขบ้าเทียมในประเทศไทย. อัจฉริยา ไสละสูต (บรรณาธิการ) พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ปออยท์กราฟิค. 8.

ภาษาอังกฤษ

Kluge, J. P., G. W. Beran, H. T. Hill, and K. B. Platt. 1999. Pseudorabies (Aujeszky's disease), In: Diseases of swine, 8th ed., B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, and T. J. Taylor (ed.), Ames, Iowa, Iowa State University Press, p. 233-246.

Ao, J. Q., Wang, J. W., Chen, X. H., Wang, X. Z. and Long, Q. X. 2003. Expression of pseudorabies virus gE epitopes in *Pichia pastoris* and its utilization in an indirect PRV gE-ELISA. *J. Virol. Methods.*, 114 (2): 145-150.

Banks, M. 1994. Aujeszky's disease ELISA using baculovirus expressed glycoproteins. *Acta. Vet. Hung.*, 42 (2-3): 359-367.

Ben-Porat, T., DeMarchi, J., Pendry, J., Veach, R. A. and Kaplan, A. S. 1986. Proteins specified by the short unique region of the genome of pseudorabies virus play a role in the release of virions from certain cells. *J. Virol.*, 57 (1): 191-196.

Bouma, A. 2005. Determination of the effectiveness of Pseudorabies marker vaccines in experiments and field trials. *Biologicals.*, 33 (4): 241-245.

Brack, A. R., Klupp, B. G., Granzow, H., Tirabassi, R., Enquist, L. W. and Mettenleiter, T. C. 2000. Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J. Virol.*, 74 (9): 4004-4016.

Card, J. P. and Enquist, L. W. 2001. Transneuronal circuit analysis with pseudorabies viruses. *Curr. Protoc. Neurosci.*, Chapter 1 Unit 1 5.

- Chen, H. T., Zhang, J., Ma, L. N., Ma, Y. P., Ding, Y. Z., Liu, X. T., Chen, L., Ma, L. Q., Zhang, Y. G. and Liu, Y. S. 2009. Rapid pre-clinical detection of classical swine fever by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Mol. Cell. Probes.*, 23 (2): 71-74.
- Choi, J. H. and Lee, S. Y. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64 (5): 625-635.
- Corn, J. L., Stallknecht, D. E., Mechlin, N. M., Luttrell, M. P. and Fischer, J. R. 2004. Persistence of pseudorabies virus in feral swine populations. *J. Wildl. Dis.*, 40 (2): 307-310.
- de Wind, N., Domen, J. and Berns, A. 1992. Herpesviruses encode an unusual protein-serine/threonine kinase which is nonessential for growth in cultured cells. *J. Virol.*, 66 (9): 5200-5209.
- Demain, A. L. and Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.*, 27 (3): 297-306.
- Deruelle, M. J., Van den Broeke, C., Nauwynck, H. J., Mettenleiter, T. C. and Favoreel, H. W. 2009. Pseudorabies virus US3- and UL49.5-dependent and -independent downregulation of MHC I cell surface expression in different cell types. *Virology.*, 395 (2): 172-181.
- En, F. X., Wei, X., Jian, L. and Qin, C. 2008. Loop-mediated isothermal amplification establishment for detection of pseudorabies virus. *J. Virol. Methods.*, 151 (1): 35-39.
- Favoreel, H. W., Nauwynck, H. J., Halewyck, H. M., Van Oostveldt, P., Mettenleiter, T. C. and Pensaert, M. B. 1999. Antibody-induced endocytosis of viral glycoproteins and major histocompatibility complex class I on pseudorabies virus-infected monocytes. *J. Gen. Virol.*, 80 (Pt 5) 1283-1291.
- Favoreel, H. W., Van Minnebruggen, G., Adriaensen, D. and Nauwynck, H. J. 2005. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of

an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102 (25): 8990-8995.

Ferrari, M., Gualandi, G. L., Corradi, A., Monaci, C., Romanelli, M. G., Tosi, G. and Cantoni, A. M. 1998. Experimental infection of pigs with a thymidine kinase negative strain of pseudorabies virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21 (4): 291-303.

Ferrari, M., Mettenleiter, T. C., Romanelli, M. G., Cabassi, E., Corradi, A., Dal Mas, N. and Silini, R. 2000. A comparative study of pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. *J. Comp. Pathol.*, 123 (2-3): 152-163.

Foley, P. L. and Hill, R. E., Jr. 2005. Regulatory considerations for marker vaccines and diagnostic tests in the U.S. *Biologicals.*, 33 (4): 253-256.

Foti, M., Bottari, T., Daidone, A., Rinaldo, D., De Leo, F., Foti, S. and Giacobello, C. 2008. Serological survey on Aujeszky's disease, swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in Italian pigs. *Pol. J. Vet. Sci.*, 11 (4): 323-325.

Glass, C. M., McLean, R. G., Katz, J. B., Maehr, D. S., Cropp, C. B., Kirk, L. J., McKeirnan, A. J. and Evermann, J. F. 1994. Isolation of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus from a Florida panther. *J. Wildl. Dis.*, 30 (2): 180-184.

Gomez-Sebastian, S., Perez-Filgueira, D. M., Gomez-Casado, E., Nunez, M. C., Sanchez-Ramos, I., Tabares, E. and Escribano, J. M. 2008. DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. *J. Virol. Methods.*, 153 (1): 29-35.

Huang, C., Hung, J. J., Wu, C. Y. and Chien, M. S. 2004. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Vet. Microbiol.*, 101 (3): 209-214.

- Iglesias, G. J., Trujano, M., Lokensgard, J. and Molitor, T. 1992. Study of the potential involvement of pseudorabies virus in swine respiratory disease. *Can. J. Vet. Res.*, 56 (1): 74-77.
- Jacobs, L. and Kimman, T. G. 1994. Epitope-specific antibody response against glycoprotein E of pseudorabies virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1 (5): 500-505.
- Karger, A. and Mettenleiter, T. C. 1993. Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. *Virology.*, 194 (2): 654-664.
- Katayama, S., Yoshiki, K., Okada, N., Kokubu, T. and Shimizu, Y. 1998. Efficacy of a mixed glycoprotein vaccine against pseudorabies in pregnant sows. *J. Vet. Med. Sci.*, 60 (1): 23-27.
- Kimman, T. G., Binkhorst, G. J., van den Ingh, T. S., Pol, J. M., Gielkens, A. L. and Roelvink, M. E. 1991. Aujeszky's disease in horses fulfils Koch's postulates. *Vet. Rec.*, 128 (5): 103-106.
- Kimman, T. G., Pol, J. M., de Wind, N., Oei-Lie, N., Berns, A. J. and Gielkens, A. L. 1992. Role of different genes in the virulence and pathogenesis of Aujeszky's disease virus. *Vet. Microbiol.*, 33 (1-4): 45-52.
- Kit, S. 1990. Genetically engineered vaccines for control of Aujeszky's disease (pseudorabies). *Vaccine.*, 8 (5): 420-424.
- Klupp, B. G., Kern, H. and Mettenleiter, T. C. 1992. The virulence-determining genomic BamHI fragment 4 of pseudorabies virus contains genes corresponding to the UL15 (partial), UL18, UL19, UL20, and UL21 genes of herpes simplex virus and a putative origin of replication. *Virology.*, 191 (2): 900-908.
- Knapp, A. C., Husak, P. J. and Enquist, L. W. 1997. The gE and gI homologs from two alpha herpesviruses have conserved and divergent neuroinvasive properties. *J. Virol.*, 71 (8): 5820-5827.

- Komaromi, M. and Szabo, I. 2005. Eradication of Aujeszky's disease from a large-scale pig farm. *Acta. Vet. Hung.*, 53 (4): 515-524.
- Lee, C. S., Moon, H. J., Yang, J. S., Park, S. J., Song, D. S., Kang, B. K. and Park, B. K. 2007. Multiplex PCR for the simultaneous detection of pseudorabies virus, porcine cytomegalovirus, and porcine circovirus in pigs. *J. Virol. Methods.*, 139 (1): 39-43.
- Ma, W., Lager, K. M., Richt, J. A., Stoffregen, W. C., Zhou, F. and Yoon, K. J. 2008. Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20 (4): 440-447.
- Maes, R. K., Sussman, M. D., Vilnis, A. and Thacker, B. J. 1997. Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Vet. Microbiol.*, 55 (1-4): 13-27.
- Maldonado, L. M., Hernandez, V. E., Rivero, E. M., Barba de la Rosa, A. P., Flores, J. L., Acevedo, L. G. and De Leon Rodriguez, A. 2007. Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta. *Biomol. Eng.*, 24 (2): 217-222.
- Martinez-Lopez, B., Carpenter, T. E. and Sanchez-Vizcaino, J. M. 2009. Risk assessment and cost-effectiveness analysis of Aujeszky's disease virus introduction through breeding and fattening pig movements into Spain. *Prev. Vet. Med.*, 90 (1-2): 10-16.
- Mellencamp, M. W., O'Brien, P. C. and Stevenson, J. R. 1991. Pseudorabies virus-induced suppression of major histocompatibility complex class I antigen expression. *J. Virol.*, 65 (6): 3365-3368.
- Mettenleiter, T. C. 2000. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999. *Vet. Res.*, 31 (1): 99-115.

- Mettenleiter, T. C. 2002. Brief overview on cellular virus receptors. *Virus. Res.*, 82 (1-2): 3-8.
- Mettenleiter, T. C. 2003. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus. Res.*, 92 (2): 197-206.
- Mulder, W. A., Jacobs, L., Priem, J., Kok, G. L., Wagenaar, F., Kimman, T. G. and Pol, J. M. 1994. Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system. *J. Gen. Virol.*, 75 (Pt 11) 3095-3106.
- Muller, T., Batza, H. J., Schluter, H., Conraths, F. J. and Mettenleiter, T. C. 2003. Eradication of Aujeszky's disease in Germany. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.*, 50 (5): 207-213.
- Narita, M., Kawashima, K., Matsuura, S., Uchimura, A. and Miura, Y. 1993. Pneumonia in pigs inoculated with pseudorabies virus by means of a bronchoscope. *J. Comp. Pathol.*, 109 (4): 335-344.
- Nauwynck, H., Glorieux, S., Favoreel, H. and Pensaert, M. 2007. Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract. *Vet. Res.*, 38 (2): 229-241.
- Nauwynck, H. J. and Pensaert, M. B. 1992. Abortion induced by cell-associated pseudorabies virus in vaccinated sows. *Am. J. Vet. Res.*, 53 (4): 489-493.
- Nawynck, H. J. and Pensaert, M. B. 1995. Cell-free and cell-associated viremia in pigs after oronasal infection with Aujeszky's disease virus. *Vet. Microbiol.*, 43 (4): 307-314.
- Pasick, J. 2004. Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication. *Anim. Health. Res. Rev.*, 5 (2): 257-262.

- Pensaert, M., Labarque, G., Favoreel, H. and Nauwynck, H. 2004. Aujeszky's disease vaccination and differentiation of vaccinated from infected pigs. *Dev. Biol. (Basel)*, 119 243-254.
- Pomeranz, L. E., Reynolds, A. E. and Hengartner, C. J. 2005. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69 (3): 462-500.
- Rauh, I. and Mettenleiter, T. C. 1991. Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration. *J. Virol.*, 65 (10): 5348-5356.
- Ro, L. H., Lai, S. S., Hwang, W. L., Chou, H. H., Huang, J. N., Chang, E. L. and Yang, H. L. 1995. Cloning and expression of an antigenic domain of glycoprotein gE of pseudorabies virus in *Escherichia coli* and its use as antigen in diagnostic assays. *Am. J. Vet. Res.*, 56 (5): 555-561.
- Rziha, H. J., Mettenleiter, T. C., Ohlinger, V. and Wittmann, G. 1986. Herpesvirus (pseudorabies virus) latency in swine: occurrence and physical state of viral DNA in neural tissues. *Virology.*, 155 (2): 600-613.
- Sedlak, K., Bartova, E. and Machova, J. 2008. Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *J. Wildl. Dis.*, 44 (3): 777-780.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24 (8): 1596-1599.
- Tanaka, S. and Mannen, K. 2008. Pregnancy and parturition of mice latently infected with Pseudorabies virus. *Exp. Anim.*, 57 (2): 149-152.
- Thiery, R., Pannetier, C., Rziha, H. J. and Jestin, A. 1996. A fluorescence-based quantitative PCR method for investigation of pseudorabies virus latency. *J. Virol. Methods.*, 61 (1-2): 79-87.

- Tummaruk, P., Kesdangsakonwut, S. and Kunavongkrit, A. 2009. Relationships among specific reasons for culling, reproductive data, and gross morphology of the genital tracts in gilts culled due to reproductive failure in Thailand. *Theriogenology.*, 71 (2): 369-375.
- Tummaruk, P. and Tantilertcharoen, R. 2008. Reproductive data and incidence of some reproductive diseases in gilts culled due to reproductive disturbance in Thailand. *Proceeding of 15th Congress of the Federation of Asian Veterinary Association, Bangkok, Thailand., 27-30 October*
- Van de Walle, G. R., Favoreel, H. W., Nauwynck, H. J., Mettenleiter, T. C. and Pensaert, M. B. 2003. Transmission of pseudorabies virus from immune-masked blood monocytes to endothelial cells. *J. Gen. Virol.*, 84 (Pt 3): 629-637.
- van Oirschot, J. T., Gielkens, A. L., Moormann, R. J. and Berns, A. J. 1990. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.*, 23 (1-4): 85-101.
- Vengust, G., Valencak, Z. and Bidovec, A. 2005. Presence of antibodies against Aujeszky's disease virus in wild boar (*Sus scrofa*) in Slovenia. *J. Wildl. Dis.*, 41 (4): 800-802.
- Wilson, S., Doster, A. R., Hoffman, J. D. and Hygnstrom, S. E. 2009. First record of Pseudorabies in feral swine in Nebraska. *J. Wildl. Dis.*, 45 (3): 874-876.
- Wittmann, G. 1991. Spread and control of Aujeszky's disease (AD). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 14 (2): 165-173.
- Wittmann, G., Jakubik, J. and Ahl, R. 1980. Multiplication and distribution of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus in vaccinated and non-vaccinated pigs after intranasal infection. *Arch. Virol.*, 66 (3): 227-240.
- Wyckoff, A. C., Henke, S. E., Campbell, T. A., Hewitt, D. G. and VerCauteren, K. C. 2009. Feral swine contact with domestic swine: a serologic survey and assessment of potential for disease transmission. *J. Wildl. Dis.*, 45 (2): 422-429.

- Yong, T., Huan-chun, C., Shao-bo, X., Ya-li, Q., Qi-gai, H. and Yu-qi, R. 2005. Development of a latex agglutination test using the major epitope domain of glycoprotein E of pseudorabies virus expressed in *E. coli* to differentiate between immune responses in pigs naturally infected or vaccinated with pseudorabies virus. *Vet. Res. Commun.*, 29 (6): 487-497.
- Yoon, H. A., Eo, S. K., Aleyas, A. G., Cha, S. Y., Lee, J. H., Chae, J. S., Jang, H. K., Cho, E. G. and Song, H. J. 2006. Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. *J. Vet. Med. Sci.*, 68 (2): 143-148.
- Yoon, H. A., Eo, S. K., Aleyas, A. G., Park, S. O., Lee, J. H., Chae, J. S., Cho, J. G. and Song, H. J. 2005. Molecular survey of latent pseudorabies virus infection in nervous tissues of slaughtered pigs by nested and real-time PCR. *J. Microbiol.*, 43 (5): 430-436.
- Yue, F., Cui, S., Zhang, C. and Yoon, K. J. 2009. A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *Virus. Genes.*, 38 (3): 392-397.

ภาคผนวก

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin RNA Virus (Macherey-Nagel, Germany)

- 1) นำสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัสอยู่มา 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 600 ไมโครลิตร RAV1 buffer ที่มี Carrier RNA ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
- 2) ทำการเติมเอทานอล (96-100%) 600 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 10-15 วินาที
- 3) นำ NucleoSpin® RNA Virus Columns ใส่ลงใน collection tubes แล้วเติมสารผสมในขั้นตอนที่ 2 ลงไป 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวใน collection tubes ที่ทำซ้ำจนสารผสมในขั้นตอนที่ 2 หมดแล้วเปลี่ยน collection tubes ใหม่
- 4) เติม buffer RAW 500 ไมโครลิตรลงใน NucleoSpin® RNA Virus Column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวใน collection tubes ที่ทิ้ง
- 5) เติม buffer RAV3 600 ไมโครลิตรลงใน NucleoSpin® RNA Virus Column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวใน collection tubes ที่ทิ้ง เปลี่ยน collection tubes ใหม่
- 6) เติม buffer RAV3 200 ไมโครลิตรลงใน NucleoSpin® RNA Virus Column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวใน collection tubes ที่ทิ้ง เปลี่ยน collection tubes ใหม่
- 7) นำ NucleoSpin® RNA Virus Columns ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำที่ปราศจากอาร์เอ็นเอส (RNase free water) ที่นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ต่อไป

การสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดเจลสำเร็จรูป NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Germany)

- 1.) ตัดแถบอะกาโรสเจลที่สนใจใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 600 ไมโครลิตร buffer NT นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-10 นาที พลิกหลอดเป็นระยะจนกว่าเจลจะละลายหมด
- 2.) นำ NucleoSpin® Extract II column ใส่ลงใน collection tubes แล้วเติมสารผสมในขั้นตอนที่ 1 ลงไป 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวใน collection tubes ทิ้ง ทำซ้ำจนสารผสมในขั้นตอนที่ 2 หมด
- 3.) เติม buffer NT3 600 ไมโครลิตรลงใน NucleoSpin® Extract II column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวใน collection tubes ทิ้ง
- 4.) นำ NucleoSpin® Extract II column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวใน collection tubes ทิ้ง
- 5.) นำ NucleoSpin® Extract II column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
- 6.) เติมน้ำที่ปราศจากอาร์เอ็นเอส (RNase free water) ที่นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เก็บผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ต่อไป

การเชื่อมต่อกับ gE fragment เข้าสู่พลาสมิด pGEM-Teasy

ทำการผสมสารเคมีตามสัดส่วนดังนี้ 2X Rapid Ligation Buffer ปริมาณ 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร pGEM®-T Easy Vector (50ng) 1 ไมโครลิตร gE fragment 3 ไมโครลิตร นำสารผสมทั้งหมดปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

การ transformation เข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109

นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ที่มีความพร้อมในการรับพลาสมิด (competent cells) (ขั้นตอนการเตรียมแสดงในภาคผนวก) มาผสมรวมกับ gE pGEM-T บ่มบน น้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วนำกลับไปบ่มบน น้ำแข็ง 2 นาที เติม Difco™ LB Broth (Becton Dickinson, USA) 800 ไมโครลิตร และบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เขย่านำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูด ส่วนใสทิ้ง นำส่วนที่เหลือ (แบคทีเรียที่ transform แล้ว) มาเลี้ยงบนใน LB agar (เตรียมโดยใส่ agar technical (Becton Dickinson, USA) 17 กรัม ลงใน Difco™ LB Broth 1 ลิตร) ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin เข้มข้น 100 ug/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12-16 ชั่วโมง แล้วทำการเลือก โคลนีสีขาว โดยทำการเลือกแบบสุ่มมา 5 โคลนีต่อ 1 PCR product แล้วทำการเพิ่มจำนวน แบคทีเรียโดยเลี้ยงใน Difco™ LB Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12-16 ชั่วโมง

การสกัดพลาสมิด gE pGEM-T ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleospin plasmid kit (Macherey-Nagel, germany)

- 1.) นำแบคทีเรียปริมาณ 3 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้ง
- 2.) เติม buffer A1 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex
- 3.) เติม buffer A2 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดเบาๆ 6-8 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จนสารผสมใส
- 4.) เติม buffer A3 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดเบาๆ 6-8 ครั้ง
- 5.) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส
- 6.) นำ NucleoSpin® Plasmid Column ใสลงใน collection tubes แล้วเติม ส่วนใสของสารผสมในขั้นตอนที่ 5 ลงไป 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวใน collection tubes ทิ้ง ทำซ้ำจน สารผสมในขั้นตอนที่ 2 หมด

- 7.) เติม buffer A4 600 ไมโครลิตรลงใน NucleoSpin® Plasmid Column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวใน collection tubes ที่เปลี่ยน collection tubes ใหม่
- 8.) นำ NucleoSpin® Plasmid Column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวใน collection tubes ที่เปลี่ยน
- 9.) นำ NucleoSpin® Extract II column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำที่ปราศจากอาร์เอ็นเอส (RNase free water) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เก็บพลาสมิดที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ต่อไป

การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

ทำการผสมสารเคมีตามสัดส่วนดังนี้ 10x buffer ปริมาณ 3 ไมโครลิตร น้ำที่ปราศจากเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase free water) 17 ไมโครลิตร เอนไซม์ EcoRI 1 ไมโครลิตร พลาสมิด 9 ไมโครลิตร นำสารเคมีผสมทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที

การตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากพลาสมิด(dephosphorylation)

ทำการผสมสารเคมีตามสัดส่วนดังนี้ เอนไซม์ alkaline phosphatase (New England biolab, USA) 3 ไมโครลิตร NEBuffer 3 (10X) 3.65 ไมโครลิตร พลาสมิด pGEX 5x-3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI แล้ว 30 ไมโครลิตร นำสารผสมทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที

การเชื่อมต่อ (ligation) gE fragments เข้าสู่พลาสมิด pGEX 5x-3

ทำการผสมสารเคมีตามสัดส่วนดังนี้ 5x ligase reaction buffer ปริมาณ 4 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, USA) 1 ไมโครลิตร พลาสมิด pGEX 5x-3 5 ไมโครลิตร gE fragment 10 ไมโครลิตร นำสารผสมทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

การย้าย (transform) รีคอมบิแนนท์พลาสมิด gE pGEX 5x-3 เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 (Promega, USA)

ทำการละลาย competent cells (แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS ที่เตรียมให้พร้อมในการรับพลาสมิด) แล้วนำ ligation product ทั้งหมด ใส่เข้าไปใน competent cells บ่มบนน้ำแข็ง 30 นาที นำไปบ่มในน้ำที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 1 นาที แล้วนำกลับไปบ่มบนน้ำแข็ง 2 นาที เติมน้ำ Difco™ LB Broth (Becton Dickinson, USA) 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง) เขย่านำไปปั่น 8000 รอบต่อนาที 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง นำส่วนที่เหลือมาเลี้ยงแบคทีเรียที่ transform แล้วใน LB agar (เตรียมโดยใส่ agar technical (Becton Dickinson, USA) 17 กรัม ลงใน Difco™ LB Broth 1 ลิตร) ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin และ Chloramphenicol เข้มข้น 100 ug/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12-16 ชั่วโมง

การเตรียมแบคทีเรีย *E. coli* และการทรานส์ฟอร์มเมชัน

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. นำแบคทีเรียที่สนใจ (*E. coli* สายพันธุ์ JM 109 และสายพันธุ์ Rosetta DE3 pLysS) โคโลนีเดี่ยว มาเพิ่มจำนวนโดยใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ปริมาตร 5 มิลลิเมตร บ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง
2. นำแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 มิลลิเมตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ปริมาตร 50 มิลลิเมตร แล้วบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. ปั่นตกตะกอนแบคทีเรียที่ 1,500 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
4. ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสออกและทำการกระจายตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตรประมาณ 10 มิลลิตร
5. ตั้งบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วทำการปั่นตกตะกอน (ดังข้อ 3)
6. ดูดสารละลายส่วนใสออกและทำการกระจายตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 3 มิลลิเมตรและกลีเซอรอลปริมาตร 300 ไมโครลิตร
7. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร และทำการเก็บที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานต่อไป
8. นำแบคทีเรีย *E. coli* (200 ไมโครลิตร) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ เรียบร้อยแล้วที่อยู่ในหลอดทดลอง 1.5 ไมโครลิตร ออกมาจากอุณหภูมิ -80°C แล้วนำมาตั้งไว้บนน้ำแข็งให้ละลาย
9. เติมน้ำคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pGEM-T-Easy ลงไปในแบคทีเรีย ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นตั้งหลอดทดลองไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

10. นำหลอดทดลองจากข้อ j) มาอุ่นที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 2 นาที จากนั้น เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และทำการบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
11. ปั่นตะกอนแบคทีเรียที่ 8,000 g เป็นเวลา 1 นาที
12. คูดส่วนใต้งั่งประมาณ 600 ไมโครลิตร
13. กระจายตะกอนแบคทีเรียแล้วทำการเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB/Amp/X-Gal/IPTG ชนิดวุ้นที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ
14. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง (ข้ามคืน)
15. เลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีเป็นสีขาวมาใช้งานต่อไป

การเตรียมการทดสอบ SDS-PAGE Analysis

เตรียมน้ำประปาล้างกระจก spacer และ short plate ขจัดคราบออกให้หมด ประกอบเข้ากับขอบกระจก (casting frame) กดล็อกบานพับคู่พร้อมกับกดกระจกให้แน่น ทดลองใช้น้ำเปล่าเติมลงในช่องกระจกให้มั่นใจว่าไม่มีการรั่วซึม แล้วเสียบลงกับฐานเตรียมวุ้น (casting strand) ที่มีฟองน้ำรองไว้ เตรียม 12 % separating polyacrylamide gel และ 5 % stacking polyacrylamide gel ตามสูตรในตารางที่ 2 เท 12 % separating gel ลงไป แต่อย่าให้ถึงระดับขอบกระจกเติมเอทานอลลงไปเพื่อทำให้ผิววุ้นเรียบ แล้วตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งวุ้นแข็ง เทเอทานอลทิ้งไปแล้วใช้กระดาษทิชชูซับให้แห้ง เตรียม 5 % stacking gel ตามสูตรในตารางที่ 1 โดยเท 5 % stacking gel จนถึงขอบกระจก เสียบหัวลงไปในร่องระหว่างกระจก และรอจนวุ้นแข็งตัวถอดแผ่นกระจกที่มีวุ้นออกจากขอบกระจก นำมาประกอบเข้ากับเครื่อง BIO-RAD Mini-PROTEAN II Cell (Bio-Rad Laboratories, USA) กดล็อกบานพับให้แน่น แล้วนำลงใส่ใน chamber ของเครื่อง เติม 1X glycine Buffer ลงในช่องกลาง กรณีน้ำไม่รั่วสามารถเติม บัฟเฟอร์เพียงครั้งหนึ่งได้ กรณีน้ำรั่วต้องเทให้ท่วมเกือบเต็ม โดยต้องให้ระดับบัฟเฟอร์อยู่ที่ระดับบนของขอบกระจกพอดี หยอดโปรตีน marker ladder และโปรตีนที่ผสมกับโพลีดีนบัฟเฟอร์ที่ต้มแล้ว หลุมละ 10 ไมโครลิตรจนครบ ปรับกระแสไฟฟ้าเป็น 40 mA ใช้เวลาในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ประมาณ 1 ชั่วโมง (ปรับตามความเหมาะสมโดยดูจาก marker)

ตารางที่ 2 สูตรการเตรียม 12 % Separating และ 5 % Stacking polyacrylamide gel

สารเคมี	12 % Separating gel	5 % Stacking gel
DW	3.1 ml	3.55 ml
40% polyacrylamide	680 µl	550 µl
1.5 M Tris – HCl, pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris – HCl, pH 6.8	-	2.1 ml
10% (w/v) SDS	100 µl	50 µl
10 % APS	40 µl	20 µl
TEMED	20 µl	12 µl

ส่วนประกอบ loading buffer สำหรับผสมตัวอย่างโปรตีนในการทดสอบ SDS-PAGE

glycerol 3 ml 20% SDS 3 ml beta-mercaptoethanol 1.6 ml 1M Tris-HCl pH6.8 2.4 ml bromophenol blue 0.006 กรัม จะได้ loading buffer 10 ml

วิธี Western Blot Analysis

การถ่ายโปรตีนจาก SDS-PAGE ลงไปในไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 70 นาที ทำการ blocking non-specific protein binding site โดยใช้ BSA (bovine serum albumin) 1 ml ผสมกับน้ำกลั่น 9 ml แล้วบ่มเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ภายหลังจาก Blocking solution ทิ้งแล้วล้างด้วย TBS 3 ครั้ง ทำการเติมแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ซึ่งคือซีรัมสุกรที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียมหรือซีรัมสุกรที่ให้ผลลบต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม ปริมาณ 8 ไมโครลิตรต่อสารละลาย (BSA 0.4 ml + DSW 3.6 ml) 4 ml (อัตราส่วน 1:200) แล้ววางบน plate shaker ซ้ำมคั้น เทแอนติบอดีปฐมภูมิออก แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBS 3 ครั้ง เจือจางแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (secondary enzyme-labeled antibodies) ได้แก่ HRP-labeled goat anti-swine immunoglobulin G แล้วบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBS 3 ครั้ง เติมสับสเตรต DAB (3',3'-diaminobenzidine) อ่านผลจากการติดสีสั้แล้วถ่ายภาพ

การเตรียม GS4B matrix สำหรับการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์

นำ GS4B matrix (GE healthcare, UK) ปริมาตร 1.33 ml มาปั่นด้วยความแรง 500xg เวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป (GS4B matrix เดิมจะอยู่ในสารละลายที่มี 20% ethanol ซึ่งถ้าไม่ทำการล้างออก ethanol ที่เหลืออยู่อาจรบกวนปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไปได้) เติม PBS เย็น ปริมาตร 10 ml ลงไปใน GS4B matrix กระจายตะกอน GS4B matrix เบาๆ จนมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นด้วยความแรง 500xg เวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไปเติม PBS เย็น ปริมาตร 1 ml ลงไป ซึ่งจะได้เป็น 50% slurry GS4B ปริมาตร 2 ml

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ดแอสเส (Bradford assay)

เตรียมชุดทดสอบ Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, USA) โดยดูสารละลายโปรตีนมาตรฐานขนาด 125 250 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารละลายโปรตีนที่ต้องการวัดปริมาณมาอย่างละ 20 ไมโครลิตร เติม 1x Dye Reagent ลงในสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) จดบันทึกค่าการดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้จากการวัดสารละลายโปรตีนมาตรฐานไปสร้างเป็นสมการเส้นตรง $y=ax+b$ โดยค่า y คือความเข้มข้นโปรตีน ค่า x คือค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างไปแทนค่าในสมการเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน

แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Us8 ของไวรัสพิษสุนัขบ้าที่แยกได้จากแต่ละประเทศ
gE pGEX (gE174-516) ไวรัสพิษสุนัขบ้าที่เทียบที่ใช้ในการวิจัยนี้

	10	20	30	40	50
AY249861 Korea	GGCGACGATG	ACCTCAACGG	CGACCTCGAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
NC_006151 USA	GGCGACGATG	ACCTCGACGG	CGACCTCAAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
AY170318 China	GGCGACGATG	ACCTCAACGG	CGACCTCGAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
AF207700 China	GACGACGATG	ACCTCAACGG	CGACCTCGAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
EU561349 China	GGCGACGATG	ACCTCAACGG	CGACCTCGAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
FJ605136 Ireland	GGCGACGATG	ACCTCGACGG	CGACCTCAAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
FJ605135 Ireland	GGCGACGATG	ACCTCGACGG	CGACCTCAAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
FJ605134 Belgium	GGCGACGATG	ACCTCTACGG	CGACCTCAAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
FJ605133 Belgium	GGCGACGATG	ACCTCGACGG	CGACCTCGAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
FJ605132 Belgium	GGCGACTATG	ACCTCTACGG	CGACCTCAAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
AY368490 USA	GGCGACGATG	ACCTCGACGG	CGACCTCAAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
AY173124 China	GACGACGATG	ACCTCAACGG	CGACCTCGGC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
AF171937 China	GGCGACGATG	ACCTCAACGG	CGACCTCGAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
BK001744	GGCGACGATG	ACCTCGACGG	CGACCTCAAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
FJ176390 Malaysia	GGCGACGATG	ACCTCAACGG	CGACCTCGAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
EF552427 China	GGCGACGATG	ACCTCAACGG	CGACCTCGAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
EU502923 Spain	GGCGACAATG	ACCTCGACGG	CGACCTCAAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
gE pGEX (gE156-714)	GGCGACGATG	ACCTCAACGG	CGACCTCGAC	GGCGACGACC	GCCGCGCGGG
Clustal Consensus	* **** *	*****	***** *	*****	*****

	60	70	80	90	100
AY249861 Korea	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCGCCCCG	GCCCATCTGG
NC_006151 USA	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCATCTGG
AY170318 China	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCGCCCCG	GCCCATCTGG
AF207700 China	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCGCCCCG	GCCCATCTGG
EU561349 China	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCATCTGG
FJ605136 Ireland	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCACCTGG
FJ605135 Ireland	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCACCTGG
FJ605134 Belgium	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCACCTGG
FJ605133 Belgium	CTTCGGCTCT	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCACCTGG
FJ605132 Belgium	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCACCTGG
AY368490 USA	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCATCTGG
AY173124 China	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCGCCCCG	GCCCATCTGG
AF171937 China	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCGCCCCG	GCCCATCTGG
BK001744	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCATCTGG
FJ176390 Malaysia	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGAGA	GGCGCCCCG	GCCCATCTGG
EF552427 China	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCGCCCCG	GCCCATCTGG
EU502923 Spain	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCACCCCCG	GCCCATCTGG
gE pGEX (gE156-714)	CTTCGGCTCG	GCCCTCGCCT	CCCTGAGGGA	GGCGCCCCG	GCCCATCTGG
Clustal Consensus	*****	*****	***** **	*** *****	***** **

```

                                110          120          130          140          150
    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AY249861 Korea      TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
NC_006151 USA      TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
AY170318 China     TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
AF207700 China     TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
EU561349 China     TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
FJ605136 Ireland   TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
FJ605135 Ireland   TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
FJ605134 Belgium   TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
FJ605133 Belgium   TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
FJ605132 Belgium   TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
AY368490 USA       TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
AY173124 China     TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
AF171937 China     TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
BK001744           TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
FJ176390 Malaysia TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
EF552427 China     TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
EU502923 Spain     TGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
gE pGEX (gE156-714) CGAACGTGTC CGAGGGCGCC AACTTCACCC TCGACGCGCG CGGCGACGGC
Clustal Consensus ***** ***** ***** ***** *****

```

```

                                160          170          180          190          200
    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AY249861 Korea      GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
NC_006151 USA      GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
AY170318 China     GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
AF207700 China     GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
EU561349 China     GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
FJ605136 Ireland   GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
FJ605135 Ireland   GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
FJ605134 Belgium   GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
FJ605133 Belgium   GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
FJ605132 Belgium   GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
AY368490 USA       GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
AY173124 China     GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
AF171937 China     GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
BK001744           GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
FJ176390 Malaysia GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
EF552427 China     GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
EU502923 Spain     GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
gE pGEX (gE156-714) GCCGTGCTGG CCGGGATCTG GACGTTCCCTG CCCGTCCGCG GCTGCGACGC
Clustal Consensus ***** ** ***** ***** ***** *****

```

```
                210          220          230          240          250
...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
AY249861 Korea   CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
NC_006151 USA    CGTGTCGGTG ACCATGGTGT GCTTCGAGAC CGCCTGCCAC CCGGACCTGG
AY170318 China  CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGGC CGCGTGCTAC CCGGACCTGG
AF207700 China  CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
EU561349 China  CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
FJ605136 Ireland CGTGTCGGTG ACCATGGTGT GCTTCGAGAC CGCCTGCCAC CCGGACCTGG
FJ605135 Ireland CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
FJ605134 Belgium CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCCTGCCAC CCGGACCTGG
FJ605133 Belgium CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCCTGCCAC CCGGACCTGG
FJ605132 Belgium CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCCTGCCAC CCGGACCTGG
AY368490 USA    CGTGTCGGTG ACCATGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
AY173124 China  CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCCTGCCAC CCGGACCTGG
AF171937 China  CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
BK001744        CGTGTCGGTG ACCATGGTGT GCTTCGAGAC CGCCTGCCAC CCGGACCTGG
FJ176390 Malaysia CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
EF552427 China  CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
EU502923 Spain  CGTGTCGGTG ACCATGGTGT GCTTCGAGAC CGCCTGCCAC CCGGACCTGG
gE pGEX (gE156-714) CGTGTCGGTG ACCACGGTGT GCTTCGAGAC CGCGTGCCAC CCGGACCTGG
Clustal Consensus **** *  **** *  ***** *  *** ** *  *****
```

```
                260          270          280          290          300
...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
AY249861 Korea   TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
NC_006151 USA    TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGCGGGG CATCGGCGAC
AY170318 China  TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
AF207700 China  TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAT
EU561349 China  TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
FJ605136 Ireland TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGCGGGG CATCGGCGAC
FJ605135 Ireland TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGCGGGG CATCGGCGAC
FJ605134 Belgium TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGCGGGG CATCGGCGAC
FJ605133 Belgium TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGCGGGG CATCGGCGAC
FJ605132 Belgium TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGCGGGG CATCGGCGAC
AY368490 USA    TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGCGGGG CATCGGCGAC
AY173124 China  TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
AF171937 China  TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
BK001744        TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGCGGGG CATCGGCGAC
FJ176390 Malaysia TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
EF552427 China  TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG TATCGGCGAC
EU502923 Spain  TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGCGGGG CATCGGCGAC
gE pGEX (gE156-714) TGCTGGGCCG CGCCTGCGTC CCCGAGGCC CGGAGATGGG CATCGGCGAC
Clustal Consensus ** ***** ***** ***** ***** ** *  *****
```

```

                                310          320          330          340          350
    ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
AY249861 Korea  TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
NC_006151 USA   TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCAG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
AY170318 China  TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
AF207700 China  TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
EU561349 China  TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CTATCGTCAC
FJ605136 Ireland TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCAG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
FJ605135 Ireland TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
FJ605134 Belgium TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
FJ605133 Belgium TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
FJ605132 Belgium TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
AY368490 USA    TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCAG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
AY173124 China  TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
AF171937 China  TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
BK001744       TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCAG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
FJ176390 Malaysia TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
EF552427 China  TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
EU502923 Spain  TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCAG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
gE pGEX (gE156-714) TACCTGCCGC  CCGAGGTGCC  GCGGCTCCGG  CGCGAGCCGC  CCATCGTCAC
Clustal Consensus *****

```

```

                                360          370          380          390          400
    ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
AY249861 Korea  CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGAGCGT  CCTGCGGGCC  ACGCCCAACG
NC_006151 USA   CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGACCCT  CCGGCGGGCC  ACGCCCAACG
AY170318 China  CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGAGCGT  CCTGCGGGCC  ACGCCCAACG
AF207700 China  CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGATCGT  CCTGCGGGCC  ACGCCCAACG
EU561349 China  CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGAGCGT  CCTGCGGGCC  ACGCCCAACG
FJ605136 Ireland CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGACCCT  CCGGCGGGCC  ACGCCCAACG
FJ605135 Ireland CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGACCCT  CCAGCGGGCC  ACGCCCAACG
FJ605134 Belgium CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGACCCT  CCAGCGGGCC  ACGCCCAACG
FJ605133 Belgium CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGACCCT  CCAGCGGGCC  ACGCCCAACG
FJ605132 Belgium CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGACCCT  CCAGCGGGCC  ACGCCCAACG
AY368490 USA    CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGACCCT  CCGGCGGGCC  ACGCCCAACG
AY173124 China  CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGATCGT  CCTGCGGGCC  ACGCCCAACG
AF171937 China  CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGAGCGT  CCTGCGGGCC  ACGCCCAACG
BK001744       CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGACCCT  CCGGCGGGCC  ACGCCCAACG
FJ176390 Malaysia CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGAGCGT  CCTGCGGGCC  ACGCCCAACG
EF552427 China  CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGAGCGT  CCTGCGGGCC  ACGCCCAACG
EU502923 Spain  CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGACCCT  CCGGCGGGCC  ACGCCCAACG
gE pGEX (gE156-714) CCCGGAGCGG  TGGTCGCCGC  ACCTGAGCGT  CCTGCGGGCC  ACGCCCAACG
Clustal Consensus *****

```

```

                                410          420          430          440          450
    AY249861 Korea      ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    NC_006151 USA       ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    AY170318 China     ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    AF207700 China     ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    EU561349 China     ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    FJ605136 Ireland   ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    FJ605135 Ireland   ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    FJ605134 Belgium   ACACGGGCCT CTACACGCTA CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    FJ605133 Belgium   ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    FJ605132 Belgium   ACACGGGCCT CTACACGCTA CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    AY368490 USA       ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    AY173124 China     ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    AF171937 China     ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    BK001744           ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    FJ176390 Malaysia  ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    EF552427 China     ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    EU502923 Spain     ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    gE pGEX (gE156-714) ACACGGGCCT CTACACGCTG CACGACGCCT CGGGGCCGCG GGCCGTGTTC
    Clustal Consensus ***** ***** ***** ***** *****

```

```

                                460          470          480          490          500
    AY249861 Korea      TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    NC_006151 USA       TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGGCCC CGGTGGGCCC
    AY170318 China     TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    AF207700 China     TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    EU561349 China     TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    FJ605136 Ireland   TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGGCCC CGGTGGGCCC
    FJ605135 Ireland   TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGGCCC CGGTGGGCCC
    FJ605134 Belgium   TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGGCCC CGGTGGGCCC
    FJ605133 Belgium   TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGGCCC CGGTGGGCCC
    FJ605132 Belgium   TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGGCCC CGGTGGGCCC
    AY368490 USA       TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGGCCC CGGTGGGCCC
    AY173124 China     TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCAC
    AF171937 China     TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    BK001744           TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGGCCC CGGTGGGCCC
    FJ176390 Malaysia  TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    EF552427 China     TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    EU502923 Spain     TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGTGGGCCC CGGTGGGCCC
    gE pGEX (gE156-714) TTTGTGGCGG TGGGCGACCG GCCGCCCGCG CCGGCGGACC CGGTGGGCCC
    Clustal Consensus ***** ***** ***** *** ** * ***** *

```



```

                    510          520          530          540          550
    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AY249861 Korea      CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
NC_006151 USA       CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
AY170318 China     CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
AF207700 China     CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
EU561349 China     CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
FJ605136 Ireland   CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
FJ605135 Ireland   CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
FJ605134 Belgium   CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
FJ605133 Belgium   CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
FJ605132 Belgium   CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
AY368490 USA       CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
AY173124 China     CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
AF171937 China     CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
BK001744           CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
FJ176390 Malaysia CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
EF552427 China     CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
EU502923 Spain     CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGTT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
gE pGEX(gE156-714 CGCGCGCCAC GAGCCCCGCT TCCACGCGCT CGGCTTCCAC TCGCAGCTCT
Clustal Consensus *****

```

```

    ....|...
AY249861 Korea      TCTCGCCC
NC_006151 USA       TCTCGCCC
AY170318 China     TCTCGCCC
AF207700 China     TCTCGCCC
EU561349 China     TCTCGCCC
FJ605136 Ireland   TCTCGCCC
FJ605135 Ireland   TCTCGCCC
FJ605134 Belgium   TCTCGCCC
FJ605133 Belgium   TCTCGCCC
FJ605132 Belgium   TCTCGCCC
AY368490 USA       TCTCGCCC
AY173124 China     TCTCGCCC
AF171937 China     TCTCGCCC
BK001744           TCTCGCCC
FJ176390 Malaysia TCTCGCCC
EF552427 China     TCTCGCCC
EU502923 Spain     TCTCGCCC
gE pGEX(gE156-714 TCTCGCCC
Clustal Consensus *****

```

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.สพ. ศุภฤกษ์ นันทวัน ณ อยุธยา เกิดเมื่อวันที่ 26 พฤศจิกายน พ.ศ.2523 ที่ จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2547 ปฏิบัติงานในตำแหน่งผู้ช่วยผู้จัดการแผนกวิชาการ สุนัข และที่ปรึกษาฝ่ายวิชาการสุกรทำหน้าที่ควบคุมฟาร์มสุกรป้อนพันธุ์เป็นระยะเวลา 4 ปี ได้เข้า ศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชา พยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ. 2552