



บทที่ 4 ผลการทดลอง

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกร

การวิเคราะห์เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคและสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ในขั้นต้นของการวิจัยนั้นได้ทำการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละกลุ่มซึ่งจำแนกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสายพันธุ์วัคซีน สายพันธุ์อ้างอิงต่างประเทศ และสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยที่มีรายงานใน Genebank เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SeqPup version 0.6f ร่วมกับโปรแกรม GeneDoc version 2.5.000 เพื่อเรียงลำดับข้อมูลและเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับ DNA แต่ละกลุ่มได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรกลุ่มต่าง ๆ

กลุ่มของสายพันธุ์	ความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรม (ร้อยละ)
1. ระหว่างสายพันธุ์วัคซีน	91.7%
2. ระหว่างสายพันธุ์อ้างอิงต่างประเทศ	71.3%
3. ระหว่างสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย	85.8%
4. ระหว่างทุกกลุ่มสายพันธุ์	79.3%

การวิเคราะห์หารูปแบบการตัดสารพันธุกรรมไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากผลการเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละกลุ่ม ข้อมูลดังกล่าวถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม Clone Manager version 4.01 เพื่อทำการคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีรูปแบบในการตัดที่สามารถจำแนกกลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกรตามที่ต้องการ โดยทำการวิเคราะห์ทีละสายพันธุ์และเปรียบเทียบรูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะจากบริเวณเดียวกันของแต่ละสายพันธุ์ พบว่าผลการวิเคราะห์ดังกล่าวกลุ่มของเอนไซม์ตัด

จำเพาะที่เหมาะสมแต่ละชนิดที่สามารถให้รูปแบบการตัดที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มของสายพันธุ์ไวรัสอหิวาต์สุกรตามที่ต้องการ คือ

1. *Xho* II (*Psu* I) เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความจำเพาะต่อลำดับเบสในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย แต่ไม่จำเพาะต่อสายพันธุ์เวียดนาม สายพันธุ์อ้างอิงในต่างประเทศ และ ALD
2. *Ppu* MI (*Psp* 5II) เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความจำเพาะต่อลำดับเบสในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยและ ALD แต่ไม่ตัดสายพันธุ์เวียดนาม และสายพันธุ์อ้างอิงในต่างประเทศ

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อการตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไวรัสอหิวาต์สุกรแต่กลุ่ม

ชนิดของเอนไซม์ ตัดจำเพาะ	กลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกร		
	สายพันธุ์เวียดนาม และสายพันธุ์ ต่างประเทศ	ALD	สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย
<i>Xho</i> II	-	-	+
<i>Ppu</i> MI	-	+	+

การเพาะแยกเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

จากตัวอย่างทั้งหมด 35 ตัวอย่าง เป็นที่ได้จากสุกรป่วยและแสดงอาการของการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากบริเวณต่าง ๆ ของประเทศไทย มีประวัติดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ตารางการจำแนกกลุ่มของตัวอย่างตามประวัติ

ปีที่เก็บตัวอย่าง (ค.ศ.)	จำนวนตัวอย่าง
1950 – 1998	9
1999	6
2000	8
2001	12

ในการเพาะแยกเชื้อไวรัสฮิวาต์สูกูรจากตัวอย่างซีรัมและ tissue suspension ทั้งหมดจำนวน 35 ตัวอย่าง พบว่า 30 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อไวรัสฮิวาต์สูกูร เมื่อทดสอบด้วยวิธี Immunoperoxidase Test และอีก 5 ตัวอย่างให้ผลลบต่อการทดสอบ ซึ่งจำแนกผลตามประวัติได้ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ตารางการจำแนกกลุ่มของตัวอย่างตามประวัติ จากผลการทดสอบเมื่อทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสฮิวาต์สูกูรด้วยวิธี Immunoperoxidase Test

ปีที่เก็บตัวอย่าง (ค.ศ.)	จำนวนตัวอย่าง	ผลบวก	ผลลบ
1950 – 1998	9	7	2
1999	6	5	1
2000	8	7	1
2001	12	11	1
รวม	35	30	5

การตรวจหา RNA ของไวรัสฮิวมาตัสสุกรโดยวิธี RT-PCR

Primer gp55.1 และ gp55.2

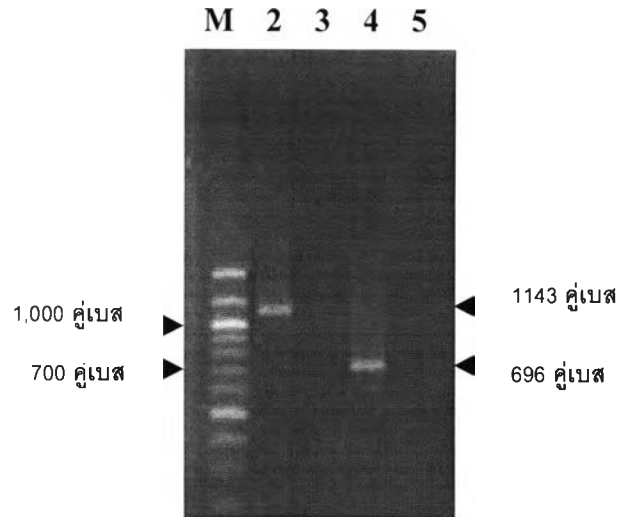
จากการเพาะเลี้ยงไวรัสฮิวมาตัสสุกรสายพันธุ์มาตรฐาน ALD นำมาสกัดแยก RNA และทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer gp55.1 และ gp55.2 ในการเพิ่มจำนวน ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

Gp55.1 5' GCC GCC GAA TTC ATG CGG CTA GCC TGC AAG GAA GA 3'
(35 mers)

Gp55.2 5' GGC GGC GTC GAC TCA GGC GAG TTG TTC TGT TAY AAC TA 3'
(38 mers)

เนื่องจาก primer คู่ดังกล่าวถูกออกแบบมาให้จำเพาะต่อบริเวณของ gp55 (E2) และมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มส่วนของเบสที่ใช้ในการโคลนนิ่ง (Kitikoon, 1998) primers คู่นี้จึงมีความไว (sensitivity) ต่ำ และให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างใหญ่ คือ 1,143 คู่เบส จึงทำการเปลี่ยนคู่ของ primers เพื่อลดขนาดของผลิตภัณฑ์ โดยนำ primer gp55.3 มาใช้แทน primer gp55.1 ซึ่งผลจากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมระหว่าง primer gp55.3 และ gp55.2 จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 696 คู่เบส

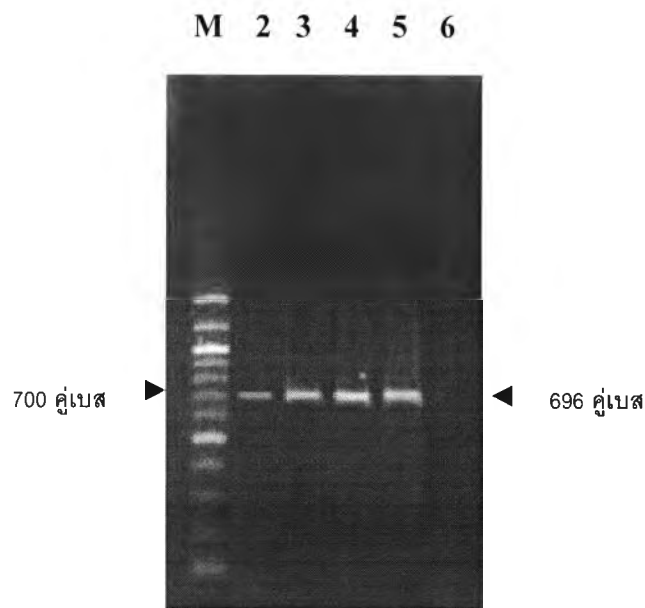
Gp55.3 5' ACA ACT CTG AGA ACA GCC GTG G 3'
(22 mers)



รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย primers 2 คู่ คือ gp55.1:gp55.2 (1143 คู่เบส) และ gp55.3:gp55.2 (696 คู่เบส) non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ (M = 100 bp ladder marker, 2-3 = RT-PCR gp55.1:gp55.2, 4 = ควบคุมผลลบ และ 5-6 = RT-PCR gp55.3:gp55.2 และ 7 = ควบคุมผลลบ ตามลำดับ)

ก. การหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR

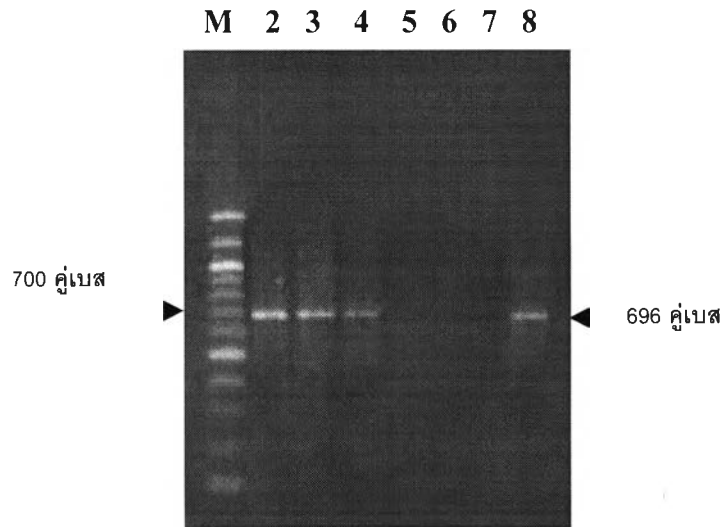
การหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหาบริเวณที่จำเพาะต่อ gp55 ของไวรัสฮิวมาตัสกร โดยใช้ primer gp55.3 และ gp55.2 นั้น ทำโดยการเติม $MgCl_2$ ในแต่ละปฏิกิริยา PCR ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกัน คือ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ในสภาวะการทดลองเดียวกัน โดยใช้ RNA ของไวรัสฮิวมาตัสกรสายพันธุ์ ALD ในการทดสอบ โดยมี non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ primer gp55.3 และ gp55.2 นั้น อยู่ระหว่าง 1.5 ถึง 2.5 mM ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย primer gp55.3 และ gp55.2 ในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD เมื่อทำการเติม $MgCl_2$ ลงในปฏิกิริยา PCR ในปริมาณที่แตกต่างกัน (M = 100 bp ladder marker, 2 – 5 = ALD ในปฏิกิริยาที่เติม $MgCl_2$ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามลำดับ, 6 = ควบคุมผลลบ)

ข. ความไวของเทคนิค RT-PCR

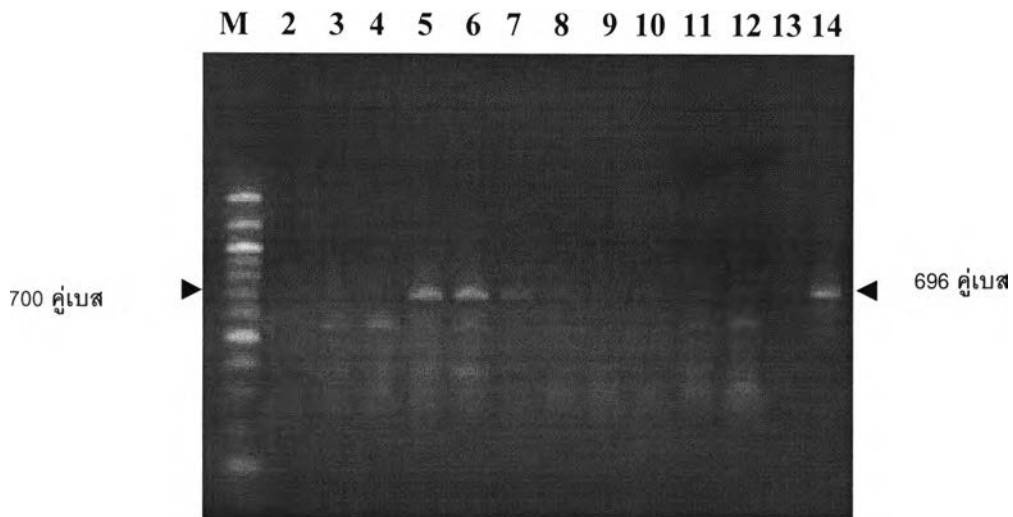
ประเมินความไวของเทคนิค RT-PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรโดยใช้ primers gp55.3 และ gp55.2 ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 696 คู่เบส นั้นทำโดยการเจือจางไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่ละ 10 เท่าของความเข้มข้น ตั้งแต่ 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร จนถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร และตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรโดยวิธี RT-PCR ซึ่งมี non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าวิธีดังกล่าวมีความไวในการตรวจหา RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรได้ 10^3 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงความไวของเทคนิค RT-PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers gp55.3 และ gp55.2 ในการตรวจหา RNA ของไวรัสฮิวมาตัสกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้นเจือจางทีละ 10 เท่า จาก 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร ถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับ non-infected SK-6 cell culture (M = 100 bp ladder marker, 2 - 6 = gp55.3: gp55.2 RT-PCR product ของสายพันธุ์อ้างอิง ALD ที่ปริมาณไวรัส 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ, 7 = ควบคุมผลลบ และ 8 = ควบคุมผลบวก)

ค. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างด้วยเทคนิค RT-PCR

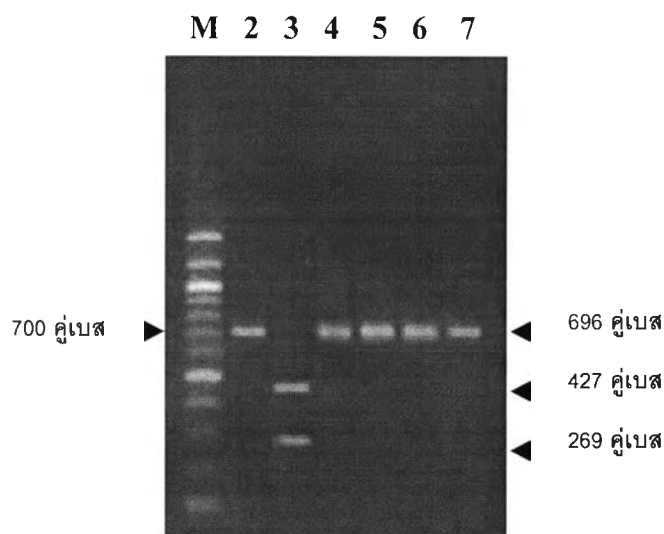
เมื่อทำการนำตัวอย่าง RNA ของไวรัสฮิวมาตัสกรที่ให้ผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อไวรัสเป็นบวกมาทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primers gp55.3 และ gp55.2 ซึ่งจะได้ผลผลิตของสารพันธุกรรมขนาด 696 คู่เบส แต่พบว่าผลของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสตัวอย่างจากพื้นที่ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลายมากกว่าผลิตภัณฑ์เป้าหมาย และให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ต้องการค่อนข้างต่ำซึ่งไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรด้วย primers gp55.3 และ gp55.1 (M = 100 bp ladder marker, 2 - 12 = gp55.3:gp55.2 RT-PCR product ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรต่าง ๆ, 13 = ควบคุมผลลบ และ 14 = ควบคุมผลบวก)

ง. การตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทดสอบผลความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ gp55 ขนาด 696 คู่เบส ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และสายพันธุ์ Chinese พบว่าให้รูปแบบการตัดตามที่คาดไว้ ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงผลการตัดสาย DNA ในบริเวณ gp55 ของส่วนผลผลิตขนาด 696 คู่เบส ของไวรัสฮิวมาตัสกรสายพันธุ์ ALD และ Chinese ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI ตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 – 4 ALD uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 5 – 7 = สายพันธุ์วัคซีน uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ)

การออกแบบและคัดเลือก primers

ทำการเลือกออกแบบ primers จากบริเวณ gp55 ของไวรัสฮิวมาตัสกร โดยนำ ลำดับสารพันธุกรรมในบริเวณดังกล่าวของสายพันธุ์ต่างๆ มาทำการเปรียบเทียบและวิเคราะห์หา การออกแบบ primers ด้วยโปรแกรม Oligos version 8.0 ได้ primers ที่จำเพาะต่อบริเวณ gp55 และครอบคลุมบริเวณที่ทำการวิเคราะห์ว่าจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด คือ *Xho* II และ *Ppu* MI ทั้งหมด 8 สาย คือ

Forward primers

1F: 5' CGGCTAGCCTGCAAGGAAGAYYACA 3'

6F: 5' GATGACTTCGGGTTCCGGDCTGTGCC 3'

A8: 5' CCAYTTCCGTGACATTCGAGCTCCT 3'

A12: 5' AAATGGGAGATGACTTCGRGTTCCGG 3'

Reverse primers

1R: 5' TAGCTGTCCCTGGGCTCATARTACTT 3'

2R: 5' TCAAACCAGTACTGATACTCGCCCTT 3'

4R: 5' CCACCACCAAGACAACRAATTCTGCG 3'

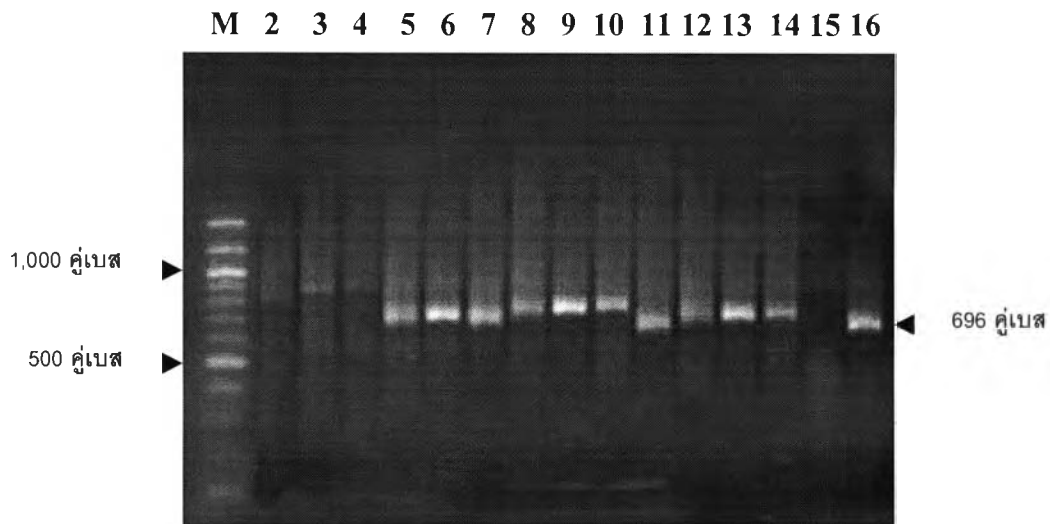
6R: 5' TTCCTCCYAACAGTGCTACCACCACC 3'

หมายเหตุ: Universal degenerate code: M=A/C, R=A/G, W=A/T, S=G/C, Y=C/T, K=G/T, V=A/C/T, H=A/C/T, D=A/G/T, N=A/G/C/T

ทดลองทำการเพิ่มจำนวนไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ด้วย two-steps RT-PCR โดยใช้ primer ทั้ง 13 คู่ โดยใช้ condition ดังต่อไปนี้

RT condition :	Extension	42 ^o C	30 minutes	
	Denature	94 ^o C	2 minutes	
PCR condition :	Denature	94 ^o C	30 seconds	} 35 cycles
	Annealing	55 ^o C	30 seconds	
	Extension	72 ^o C	1 minutes	
	Last extension	72 ^o C	10 minutes	1 cycles

หลังจากการทำ RT-PCR ด้วย condition ดังกล่าว พบว่าคู่ที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบ ได้แก่ 6F-2R, 6F-4R, A8-1R, A8-2R, A8-4R, A8-6R, A12-1R, A12-2R, A12-4R และ A12-6R โดยมีการเพิ่มจำนวนของ primer gp55.3 และ gp55.2 เป็นตัวควบคุมผลบวก และ non-infected SK- 6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

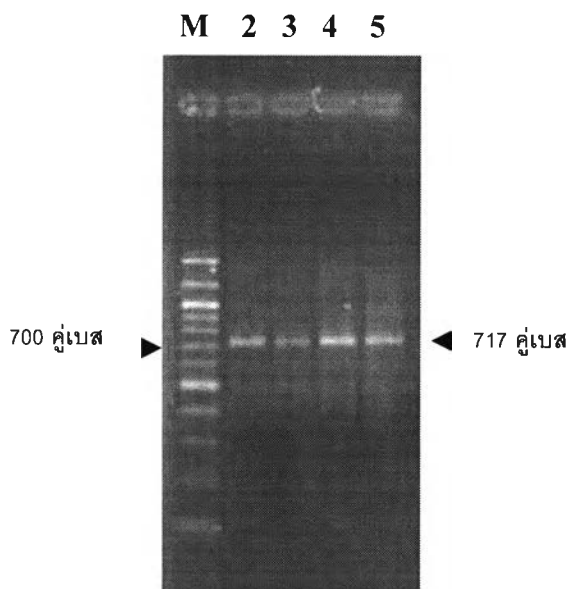


รูปที่ 4.6 แสดง PCR product ของ primer 13 คู่ ตามลำดับ โดยมี PCR product ของ primer gp55.3 และ gp55.2 เป็นตัวควบคุม (M = 100 bp ladder marker, 2-14 = PCR product ของ primer 1F-1R, 1F-4R, 1F-6R, 6F-2R, 6F-4R, A8-1R, A8-2R, A8-4R, A8-6R, A12-1R, A12-2R, A12-4R และ A12-6R ตามลำดับ, 15 = ควบคุมผลลบ และ 16 = ควบคุมผลบวก)

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า primers ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนมีทั้งหมด 4 คู่ คือ A8-1R, A8-4R, A12-1R และ A12-4R และได้ทำการคัดเลือก primer เพียงคู่เดียวคือ A8-1R มาใช้ในการเพิ่มจำนวนไวรัสฮิวมาตัส และดำเนินการศึกษาต่อไป

ก. การหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR

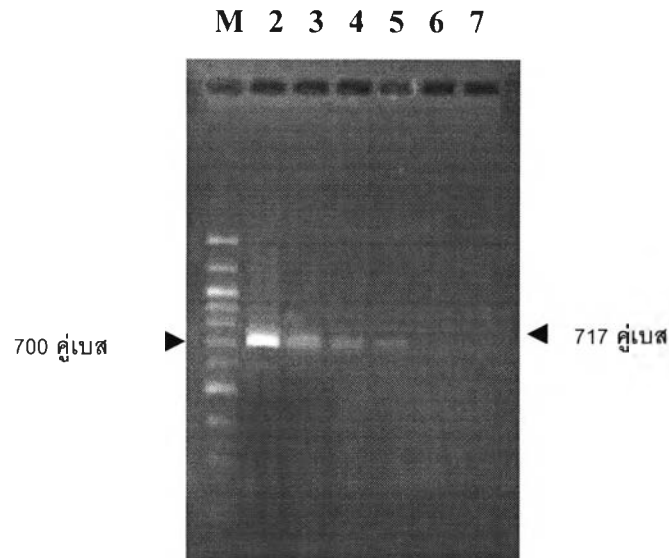
การหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหาบริเวณที่จำเพาะต่อ gp55 ของไวรัสฮิวมาตัส โดยให้ primer A8 และ 1R นั้น ทำโดยการเติม $MgCl_2$ ในแต่ละปฏิกิริยา PCR ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกัน คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ในสถานะการทดลองเดียวกัน โดยใช้ RNA ของไวรัสฮิวมาตัสสายพันธุ์ ALD ในการทดสอบ โดยมี non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ primer A8 และ 1R นั้น มีค่าเท่ากับ 2.0 mM ดังแสดงในรูปที่



รูปที่ 4.7 แสดงการหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย primer A8 และ 1R ในการตรวจหา RNA ของไวรัสฮิวมาตัสสกุรสายพันธุ์ ALD เมื่อทำการเติม $MgCl_2$ ลงในปฏิกิริยา PCR ในปริมาณที่แตกต่างกัน (M = 100 bp ladder marker, 2 – 5 = ALD ในปฏิกิริยาที่เติม $MgCl_2$ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามลำดับ)

ข. ความไวของเทคนิค RT-PCR

ประเมินความไวของเทคนิค RT-PCR ในการเพิ่มจำนวนบริเวณ gp55 ของไวรัสฮิวมาตัสสกุรโดยใช้ primers A8 และ 1R ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 717 คู่เบส นั้นทำโดยการเจือจางไวรัสฮิวมาตัสสกุรสายพันธุ์ ALD ที่ละ 10 เท่าของความเข้มข้น ตั้งแต่ 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร จนถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร และตรวจหา RNA ของไวรัสฮิวมาตัสสกุรโดยวิธี RT-PCR ซึ่งมี non-infected SK-6 cell culture เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าวิธีดังกล่าวมีความไวในการตรวจ RNA ของไวรัสฮิวมาตัสสกุรได้ 10^2 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.8



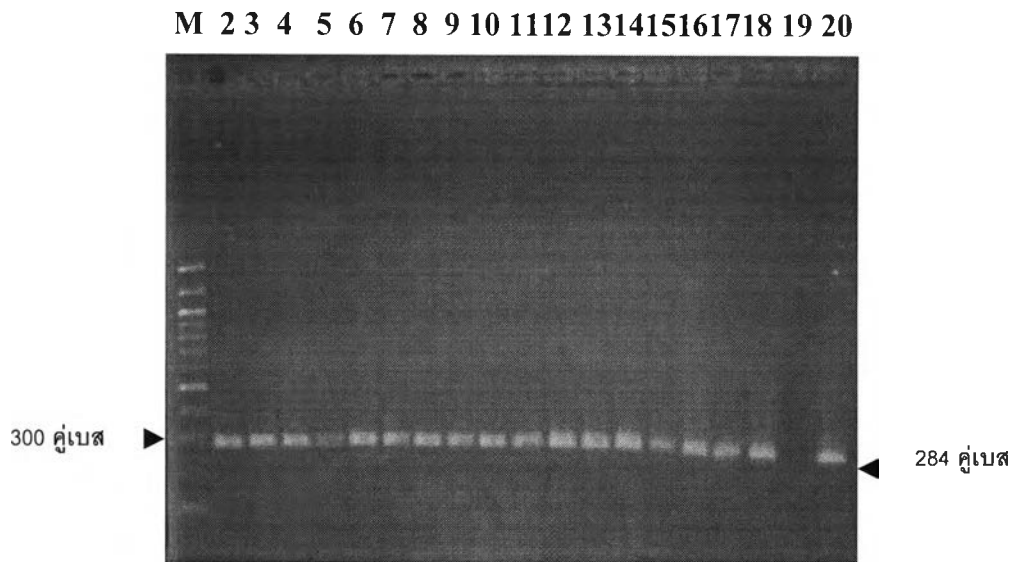
รูปที่ 4.8 แสดงความไวของเทคนิค RT-PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ 1R ในการตรวจหา RNA ของไวรัสฮิวมาตัสกรสายพันธุ์ ALD ที่ความเข้มข้นเจือจางทีละ 10 เท่า จาก 10^5 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร ถึง 1 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับ non-infected SK-6 cell culture (M = 100 bp ladder marker, 2 - 6 = A8: 1R RT-PCR product ของสายพันธุ์อ้างอิง ALD ที่ปริมาณไวรัส 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 TCID₅₀ ต่อ 50 ไมโครลิตรตามลำดับ, 7 = ควบคุมผลลบ)

ค. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างด้วยเทคนิค RT-PCR

เมื่อทำการนำตัวอย่าง RNA ของไวรัสฮิวมาตัสกรที่ให้ผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อไวรัสเป็นบวกมาทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเบื้องต้นได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกเมื่อทำการทดสอบด้วย primers 324 และ 326 ที่จำเพาะต่อส่วน 5' non-coding region (Vilcek and Belak, 1998) ได้จำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อทดสอบยืนยันว่าตัวอย่างนั้นทำการสกัดแล้วมี RNA อยู่จริง โดยผลผลิตที่ได้จะมีขนาด 284 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.9

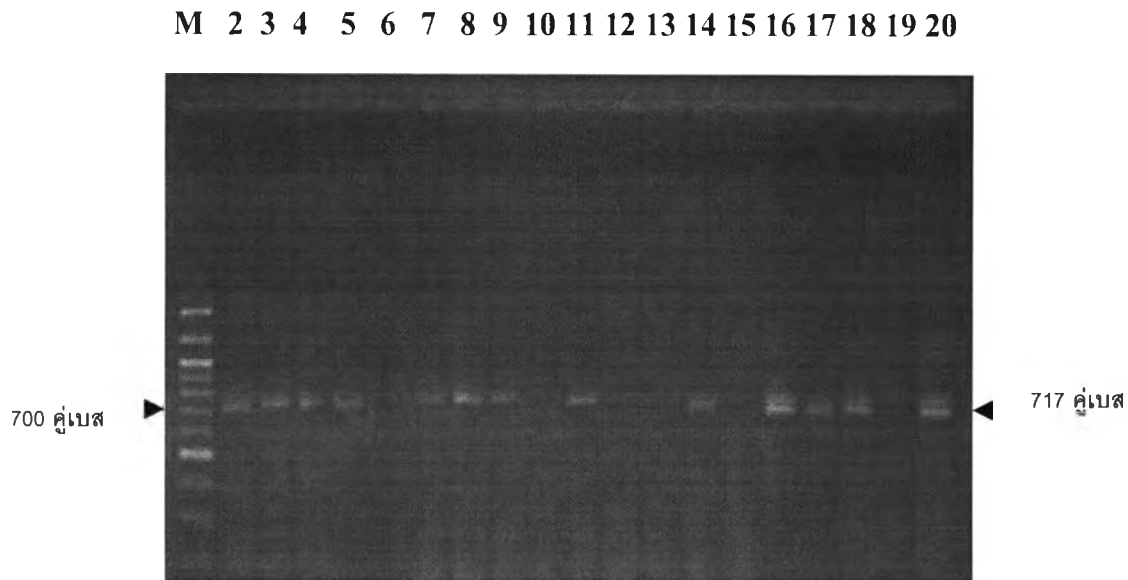
324 5' ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA 3' (21 mers)

326 5' TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC 3' (21 mers)



รูปที่ 4.9 แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรด้วย primers 324 และ 326 ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 284 คู่เบส โดยมีสายพันธุ์ ALD และ non-infected SK-6 cell culture เป็นควบคุมผลบวกและลบตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 - 18 = 324:326 RT-PCR product ของตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทย, 19 = ควบคุมผลลบ และ 20 = ควบคุมผลบวก)

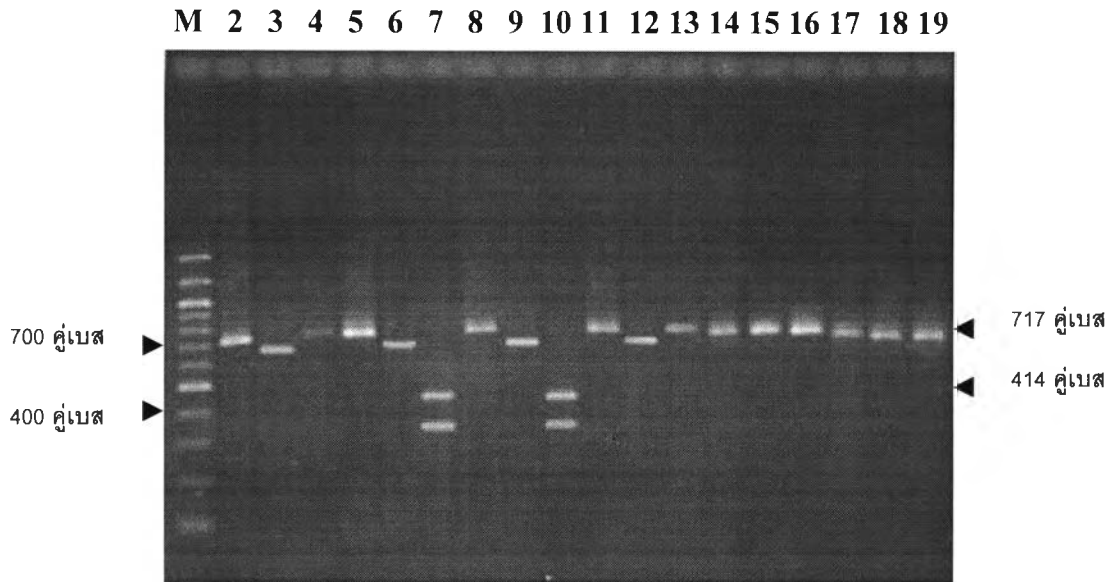
เมื่อนำ RNA ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรที่ให้ผลบวกเมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers 324 และ 326 ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง มาทำการเพิ่มจำนวนด้วย primers A8 และ R1 พบว่าสามารถทำการเพิ่มจำนวนได้ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง



รูปที่ 4.10 แสดงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ gp55 ของตัวอย่างไวรัสอหิวาต์สุกรด้วย primers A8 และ 1R ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 717 คู่เบส โดยมีสายพันธุ์ ALD และ non-infected SK-6 cell culture เป็นควบคุมผลบวกและลบตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 - 18 = A8:1R RT-PCR product ของตัวอย่างที่แยกได้ในประเทศไทยตัวอย่างที่ 1 ถึง 17 ตามลำดับ, 19 = ควบคุมผลลบ และ 20 = ควบคุมผลบวก)

ง. การตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทดสอบผลความจำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ gp55 ด้วย primers A8 และ 1R ขนาด 717 คู่เบส ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และสายพันธุ์ Chinese และจากตัวอย่างมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าให้รูปแบบการตัดดังแสดงในตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.11 แสดงผลการตัดสาย DNA ในบริเวณ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนได้ และสายพันธุ์ Chinese ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* II และ *Ppu* MI ตามลำดับ (M = 100 bp ladder marker, 2 – 4 = ALD uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 5 – 7 = ตัวอย่างที่ 1 uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 8 – 10 = ตัวอย่างที่ 4 uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 11 – 13 = ตัวอย่าง 13 uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ, 14 – 16 = ตัวอย่าง 13 uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ และ 17 – 19 = สายพันธุ์วัคซีน uncut, ตัดด้วย *Ppu* MI และ *Xho* II ตามลำดับ)



ตารางที่ 4.5 แสดงผลของการตัดสาย DNA ของตัวอย่างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ชนิดของรูปแบบ*	RT-PCR (primers A8:1R)	RFLPs		จำนวนตัวอย่าง
		<i>Xho</i> II	<i>Ppu</i> MI	
1	+	-	-	4
2	+	-	+	2
3	+	+	+	9
ND**	-	-	-	5
รวม				20

* รูปแบบที่ 1 คือ กลุ่มของสายพันธุ์เวียดนามและสายพันธุ์ต่างประเทศ

รูปแบบที่ 2 คือ สายพันธุ์ ALD

รูปแบบที่ 3 คือ กลุ่มของสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

** ND คือ ตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนด้วย primer A8 และ 1R ได้

ตารางที่ 4.6 แสดงตัวอย่างที่เก็บได้ในปีต่าง ๆ และรูปแบบการตัดด้วย Restriction enzyme ของตัวอย่าง

ปีที่เก็บตัวอย่าง (ค.ศ.)	รูปแบบการตัดด้วย Restriction enzyme			รวม
	1	2	3	
1950 – 1998	-	-	2	2
1999	1	1	1	3
2000	1	1	2	4
2001	2	1	3	6
รวม	4	3	8	15