

## บทที่ 2

### สำรวจเอกสาร

- 2.1 ประวัติความเป็นมาของโรคพิษสุนัขบ้า
- 2.2 ชีววิทยาของไวรัสพิษสุนัขบ้า
  - 2.2.1 รูปร่าง
  - 2.2.2 ส่วนประกอบทางเคมี
  - 2.2.3 โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน
- 2.3 genome และ gene organization ของไวรัสพิษสุนัขบ้า
- 2.4 วงชีวิต
- 2.5 Molecular basis of viral pathogenesis
- 2.6 การติดต่อของไวรัสพิษสุนัขบ้า
- 2.7 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

## 2.1 ประวัติความเป็นมาของโรคพิษสุนัขบ้า (28, 29)

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคที่เกิดกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งมนุษย์ โรคนี้เป็นที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยเมโสโปเตเมีย ต่อมาได้มีบันทึกเกี่ยวกับโรคพิษสุนัขบ้าในอีกหลายสมัย อาทิเช่น ในสมัยของ Aristotle (211 ปีก่อนคริสตกาล) และ Celsus (100 ปีก่อนคริสตกาล) ได้บันทึกอาการทางคลินิกตลอดจนอาการเฉพาะของโรค และยังรู้จักวิธีรักษาบาดแผลที่ถูกกัดโดยการจี้ด้วยความร้อน (cauterization)

ระหว่างปี ค.ศ. 1880 ถึง 1893 Pasteur และคณะ ได้ศึกษาถึงโรคพิษสุนัขบ้าอย่างจริงจัง และพบเชื้อจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในสมองสัตว์ นอกจากนี้ ยังพบว่าไวรัสพิษสุนัขบ้าจะเพาะเลี้ยงได้ในสมองของสัตว์เท่านั้นโดยทดลองฉีดไวรัสที่แยกได้จากสมองสุนัขเข้าสมองของสัตว์ชนิดอื่น เช่น กระจ่างหลาย ๆ ครั้ง ซึ่งในปัจจุบันยังเป็นวิธีที่เลียนแบบมาใช้ในการตัดแปลงเชื้อจุลชีพให้อ่อนฤทธิ์ลงในครั้งแรก ๆ ระยะพักตัวตั้งแต่ฉีดไวรัสจนกระทั่งมีอาการและตายจะกินเวลาประมาณ 21 วัน ในครั้งหลังระยะพักตัวจะสั้นลงจนกระทั่งถึงประมาณครั้งที่ 50 ระยะพักตัวจะคงที่คือ ตายทุก ๆ 7 วัน แสดงว่าไวรัสได้เปลี่ยนแปลงไปจนคงที่ซึ่งเรียกว่า fixed virus เพื่อให้แตกต่างจากไวรัสที่แยกได้จากธรรมชาติใหม่ ๆ หรือ street virus แม้ว่าคณะของ Pasteur จะพบเชื้อจุลชีพที่เล็กมากชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสาเหตุของโรค แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นชนิดใด จนกระทั่ง Remlinger (ค.ศ. 1903) พิสูจน์ว่า เชื้อดังกล่าวเป็นไวรัสเพราะสามารถผ่านเครื่องกรองแบคทีเรียได้

## 2.2 ชีววิทยาของไวรัสพิษสุนัขบ้า

### 2.2.1 รูปร่างลักษณะ

ไวรัสพิษสุนัขบ้าจัดอยู่ใน genus Lyssavirus ซึ่งเป็นสมาชิกของวงศ์ Rhabdoviridae ไวรัสในวงศ์นี้พบได้ทั้งในพืช แมลง สัตว์เลือดเย็น และสัตว์เลือดอุ่น (30) ไวรัสนี้มีรูปร่างที่จำเพาะ กล่าวคือมีลักษณะคล้ายลูกปืนปลายด้านหนึ่งโค้งมนส่วนปลายอีกด้านหนึ่งตัดตรง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 180x75 nm. (31) ลักษณะ genome ของไวรัสเป็น RNA สายเดี่ยวขดอยู่ด้วยกันประมาณ 30-35 ขด ซึ่ง genome นี้ถูกล้อมรอบด้วย capsomer และมี envelope ห่อหุ้มอีกชั้นหนึ่ง บนผิวด้านนอกของ envelope มี projection หรือ spike ขนาด 6-7 nm. ยื่นออกมาโดยรอบยกเว้นตรงส่วนด้านปลายตัดซึ่งจะเว้าเข้าไปข้างใน (32) นอกจากจะพบไวรัสที่มีรูปร่างจำเพาะดังกล่าวแล้ว ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อนานหลายวันอาจพบไวรัสที่มีรูปร่างผิดปกติหลาย ๆ แบบได้ เช่นเป็น particle ขนาดสั้นหรือยาวกว่าปกติ หรืออาจมีรูปร่างแบบอักษร x หรือ y (33)

### 2.2.2 ส่วนประกอบทางเคมี

ไวรัสประกอบด้วยกรดไรโบนิวคลีอิก (RNA) ร้อยละ 3.9 ไรบรีน ร้อยละ 67 โปรตีนร้อยละ 26 และมีคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 3 (34)

จากการศึกษาโดยใช้ chemical dissection (35,36,37) พบว่าไวรัสพิษสุนัขบ้าประกอบด้วยไรบรีน 5 ชนิด ได้แก่ glycoprotein, matrix protein, nucleoprotein, non-structural protein และ polymerase protein ตามลำดับ

### 2.2.3 โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนต่าง ๆ

#### Glycoprotein หรือ G protein

G protein เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 78-80 kd โปรตีนนี้เป็นองค์ประกอบของ surface projection (38) มีหน้าที่ที่สำคัญคือ กระตุ้นให้เกิด neutralizing antibody และเป็นตัวให้ภูมิคุ้มกันสัตว์ทดลองและคนอีกด้วย (39) แอนติบอดีต่อ G protein เมื่อมีคอมพลีเมนต์ร่วมด้วยจะทำให้เซลล์ที่มีการติดเชื่อนั้นแตกทำลายได้ นอกจากนี้แอนติบอดีต่อ G protein ของไวรัสพิษสุนัขบ้ามักไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสตัวอื่น ๆ ในกลุ่ม rabies-related virus

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ glycoprotein จากไวรัส 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ERA, CVS และ PV (40, 41, 42) พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโน 524 residues และบริเวณ antigenic domain มีความเหมือนกัน (homology) ประมาณร้อยละ 94 ถ้าเกิดการกลายพันธุ์หรือ mutation ที่จุดใดจุดหนึ่งบนบริเวณดังกล่าวจะมีผลทำให้ pathogenicity นั้นเปลี่ยนแปลง (43) ดังจะได้อธิบายต่อไป

#### Matrix protein หรือ M protein

M protein เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22-25 kd ประกอบด้วยกรดอะมิโน 202 residues ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมต่อระหว่าง glycoprotein และ nucleocapsid protein (44)

### Ribonucleoprotein หรือ N protein

N protein เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 58-62 kd โปรตีนชนิดนี้อยู่เป็นส่วนประกอบของ nucleocapsid ซึ่งจะรวมอยู่กับ RNA จึงเรียกว่า ribonucleocapsid protein หรือ ribonucleoprotein แอนติบอดีต่อโปรตีนนี้จะทำให้ complement fixing activity แต่ไม่ทำให้ neutralizing activity ซึ่ง N protein นี้จะช่วย G protein ใ้ การสร้าง neutralizing antibody มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น และตัวของ N protein ใดๆสามารถป้องกันโรคในสัตว์ทดลองได้โดยไม่ผ่านระบบแอนติบอดี อย่างไรก็ตาม สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ N protein ได้ในน้ำเหลืองของผู้ที่ได้รับวัคซีน (45) N protein จะเกาะเรียงตัวอยู่กับสาย RNA เพื่อป้องกันสาย RNA ไม่ให้ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ ribonuclease และรักษาสภาพของ RNA genome ใ้มี configuration ที่เหมาะสมกับการ transcription และ replication (46)

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nucleoprotein จากไวรัส 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ERA, CVS และ PV (42, 47, 48) พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโน 450 residues และมีความเหมือนกันร้อยละ 98-99 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเป็นโปรตีนที่ถูกอนุรักษ์ กล่าวคือ มีความเหมือนกันระหว่างไวรัสสายพันธุ์ต่าง ๆ มากที่สุด

จากการศึกษาต่อมาพบว่า N protein เป็นโปรตีนที่ถูกเติมฟอสเฟต (phosphorylation) ที่ serine ตำแหน่ง 389 (49) นอกจากนี้ N protein ของไวรัสพิษสุนัขบ้ายังมีความคล้ายคลึงบางส่วนกับ N protein ของ rabies-related virus อีกด้วย

### Non structural protein หรือ NS protein

NS protein เป็นโปรตีนที่มีขนาด 47-55 kd มีหน้าที่ที่สำคัญ กล่าวคือ เมื่อรวมกับ L protein แล้วเป็น active complex ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น RNA polymerase เอนไซม์นี้ใช้ในการ transcription และ replication ของไวรัส

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ NS protein พบว่า NS protein ประกอบด้วยกรดอะมิโน 297 residues และมีความเหมือนกันร้อยละ 92-98 ในสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน ได้แก่ ERA, CVS และ PV (46)

### The RNA-dependent RNA polymerase หรือ L protein

L protein เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของไวรัส กล่าวคือ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 244 kd ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2,142 residues สำหรับ L gene นั้นมีความยาวประมาณร้อยละ 54 ของความยาว genome ทั้งหมด (50) L protein นั้นจะทำงานร่วมกับ NS protein เป็นเอนไซม์ RNA polymerase

L protein ของไวรัสพิษสุนัขบ้ามีความเหมือนกันกับ L protein ของ vesicular stomatitis virus ถึงร้อยละ 33 ซึ่งนับว่ามีความเหมือนกันมากกว่าโปรตีนอื่น ๆ และนอกจากนี้ยังมีบางส่วนที่คล้ายคลึงกับ L protein ของ Sendai virus และ Newcastle disease virus ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Paramyxoviridae อีกด้วย (51) ความคล้ายคลึงของ L

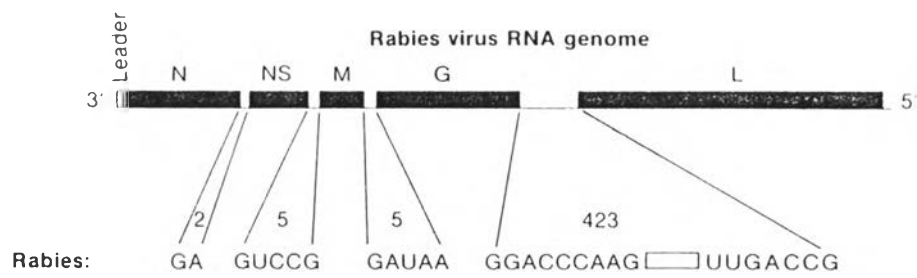
protein ในกลุ่มของ unsegmented negative-strand RNA virus นั้น บ่งชี้ว่าไวรัสกลุ่มนี้มีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน การวิวัฒนาการนี้ยังคง ดำรง L protein ไว้ ซึ่งโปรตีนนี้มีบทบาทสำคัญในการ transcription และ replication ของไวรัส (52)

### 2.3 Rabies virus genome size and organization

genome ของไวรัสพิษสุนัขบ้ามีลักษณะเป็น RNA สายเดี่ยวที่มีน้ำหนัก วมเลกุลประมาณ  $4.6 \times 10^6$  dalton Tordo และคณะ (42) พบว่า สาย RNA นี้ประกอบขึ้นจาก nucleotide จำนวน 11,932 nucleotides ซึ่งเป็นที่รวมของ 6 genes อันได้แก่ leader gene และอีก 5 genes คือ N, NS, M, G และ L gene ตามลำดับซึ่งจะเหมือนกับลำดับ gene ของ VSV

ขนาดความยาวของ gene แต่ละส่วนนั้นไม่เท่ากัน เช่น L gene จะมีขนาด 56-58 nucleotides ขึ้นกับชนิดของ host (53) สำหรับ gene N, NS, M, G และ L ของไวรัสพิษสุนัขบ้า 3 สายพันธุ์ ERA, CVS-11 และ PV strain นั้น มีขนาดเท่ากันกล่าวคือ 1424, 991, 805, 1675, 6426 nucleotides ตามลำดับ (ดังรูปที่ 1) โดยมี intergenic sequence ระหว่าง N-NS, NS-M, M-G และ G-L ขนาด 2, 5, 5 และ 423 nucleotides ตามลำดับ ซึ่งต่างจาก VSV ที่มีความยาวของ intergenic sequence คงที่ คือ 2 nucleotides โดยมีลำดับของ nucleotide เป็น GA หรือ CA เท่านั้น (42, 47, 54)

ข้อมูลทางพันธุกรรมซึ่งปรากฏอยู่บนสาย RNA นี้ถูกถอดรหัสหรือ transcribe และ translate ไปเป็นโปรตีนต่าง ๆ ได้ 5 ชนิด ซึ่งก็คือโปรตีน N, NS, M, G และ L ดังได้กล่าวแล้ว (55, 56, 57)



รูปที่ 1 แสดง Rabies virus genome



## 2.4 วงชีวิต

วงชีวิตของไวรัสพิษสุนัขบ้า สามารถแบ่งได้หลายขั้นตอนคล้ายกับไวรัสทั่ว ๆ ไป ได้แก่ adsorption, fusion, penetration, replication, transcription, translation, envelopment และ budding (58, 59)

เมื่อไวรัสเกาะกับ receptor site บน susceptible cell ซึ่งเรียกว่า adsorption, envelope ของไวรัสจะหลอมตัวรวมกับเยื่อเซลล์ของ host ขั้นตอนนี้เรียกว่า fusion แล้ว genome ของไวรัสผ่านเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์หรือที่เรียกว่า penetration หลังจากนั้นจะเกิด transcription และต่อด้วย translation เพื่อให้ได้ proteins นอกจากนี้ยังเกิด replication ขึ้นด้วย

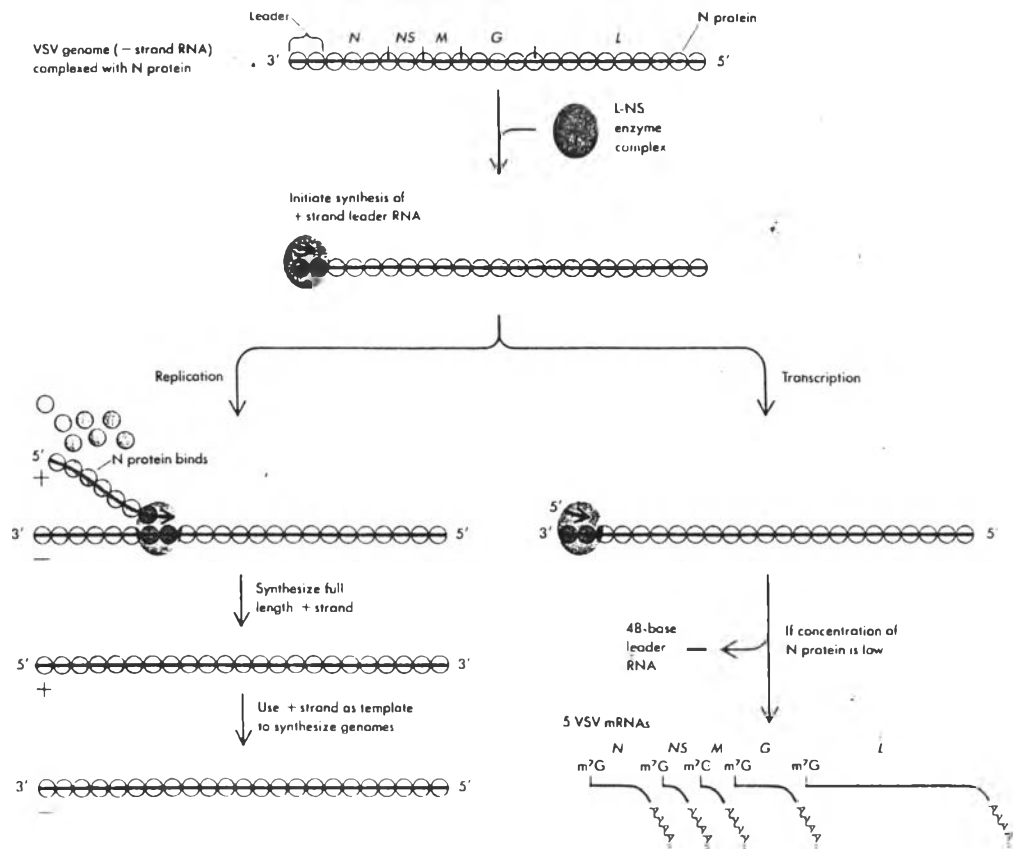
การศึกษาเกี่ยวกับ replication ของไวรัสพิษสุนัขบ้า นั้น มักจะใช้ VSV เป็นแบบในการศึกษา เนื่องจาก VSV เป็นไวรัสที่ไม่มีอันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์ และสามารถเจริญได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังได้กล่าวแล้วว่า genome ของไวรัสในวงศ์นี้เป็น negative-strand RNA ซึ่งหมายความว่า parental RNA ไม่สามารถทำหน้าที่เป็น messenger RNA ได้ รวมทั้งไม่สามารถ replicate ได้ นอกจากจะมีการสร้าง positive sense genome ก่อน ไวรัสในกลุ่มนี้จึงมีเอนไซม์ RNA polymerase อยู่ภายในตัวไวรัสด้วย จากการทดลองกับ VSV ในหลอดทดลองในระบบ cell free โดยใช้ mild detergent กำจัด envelope ออกและเติม nucleoside triphosphate, buffer และ salt ในปริมาณและควบคุมสภาวะให้เหมาะสม จะพบว่าการสังเคราะห์ positive-strand RNA และ mRNA ทั้ง 5 ชนิดเหมือนกับที่พบใน infected cell ซึ่ง mRNA ทั้ง 5 ชนิดที่สังเคราะห์ได้

นี้สามารถ translate ว่าเป็นโปรตีนต่าง ๆ ได้แก่ G, M, N, NS และ L protein (55, 56, 60)

ในปี 1980 Leppert และคณะ (61) ได้เสนอโมเดลของการ transcription และ replication ในแง่ที่ว่าทั้งสองกระบวนการดำเนินไปโดยอาศัยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และ N protein จะเป็นตัวควบคุมกระบวนการทั้งสอง กล่าวคือถ้า N protein มีปริมาณมากพอจะเข้าจับตรงบริเวณ initiation site ของ leader gene และเอนไซม์สร้างสาย positive strand RNA อย่างรวดเร็ว กระบวนการนี้เรียกว่า replication ในทางกลับกันถ้าความเข้มข้นของ N protein ต่ำลง ทำให้ไม่มี N protein ไปจับที่สาย RNA ผลก็คือมีการ transcribe ให้ mRNA ชนิดต่างๆรวมทั้ง N-mRNA ซึ่งจะ translate ได้เป็น N protein ต่อไป ผลก็คือโปรตีนจะมีความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้เกิดกระบวนการ replication ดังรูปที่ 2

นอกจากนี้เอนไซม์ RNA polymerase ยังสามารถคะตะลิสต์ (catalyst) ได้ถึง 6 ปฏิกริยา ได้แก่ การสร้างสาย RNA (RNA synthesis) polyadenylation และอีก 4 ปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องกับการ capping (62)

เมื่อผ่านกระบวนการ replication ได้ virus RNA และ transcription ได้โปรตีนต่างๆ ที่เป็นโครงสร้างของไวรัสแล้ว ribonucleocapsid นี้จะได้ envelope จากเยื่อเซลล์ของ host ที่มี glycoprotein แทรกอยู่ (incorporate) หลังจากนั้นตัวไวรัสถูกปลดปล่อยออกสู่นอกเซลล์โดยวิธีการที่เรียกว่า budding จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า มี focal lysis เกิดเป็นแห่ง ๆ ตรงกับตำแหน่งที่มีไวรัสสะสมอยู่ (63)



รูปที่ 2 แสดงโมเดลของ transcription และ replication ของ negative stranded RNA virus

## 2.5 Molecular basis of viral pathogenesis

การติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าทั้งในคนและสัตว์ ส่วนใหญ่เกิดจากการที่ไวรัสเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลหรือรอยถลอก เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะตรวจพบเชื้อในบริเวณนั้นระยะหนึ่ง Dean และคณะ (64) ทดลองฉีดเชื้อ fixed virus เข้าอุ้งเท้าหนูแล้วตัดขาข้างนั้นออกภายใน 4 ชม. ทำให้หนูไม่ป่วยเป็นโรคพิษสุนัขบ้า คณะของ Schindler (65) สามารถตรวจพบแอนติเจนรอยวิธี FAT ภายใน 6 ชม.หลังฉีด fixed virus การศึกษานกส้อมสเตอร์แรกเกิดความกระจ่างมากขึ้นเมื่อ Murphy (3, 4, 66, 67) ฉีดไวรัสเข้ากล้ามเนื้อขาของลูกส้อมสเตอร์แล้วตรวจพบไวรัสเพิ่มจำนวนในกล้ามเนื้อบริเวณนั้น เริ่มจากเห็นเป็นจุดเรืองแสงเล็ก ๆ ในกล้ามเนื้อก่อนต่อมาเพิ่มขนาดขึ้นเห็นเป็นกลุ่ม เมื่อนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบไวรัสออกจาก plasma-membrane ของกล้ามเนื้อโดยการ budding

การตรวจพบไวรัสนี้จะพบเป็นระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นไวรัสจะหายไปเป็นระยะที่เรียกว่า eclipse period ซึ่งระยะนี้ไวรัสอาจเริ่มเดินทางตามแขนงประสาทสู่ระบบประสาทส่วนกลางก็ได้ Baer และคณะ (68, 69) พบว่าไวรัสเดินทางด้วยอัตราเร็วประมาณ 3 มม.ต่อ ชม. ในระยะนี้ถ้าเส้นประสาทถูกตัดออกก็จะทำให้สัตว์ทดลองนั้นไม่ติดเชื้อ

ไวรัสเดินทางตามแขนงประสาทสู่ระบบประสาทส่วนกลาง และเพิ่มจำนวนครั้งแรกที่ตำแหน่ง spinal ganglia หรือ dorsal root ganglion ซึ่งสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี FAT จากนั้นไวรัสจะกระจายเข้าสู่สมองส่วนต่าง ๆ อย่างรวดเร็วโดยผ่านทาง brainstem



การแพร่กระจายของไวรัสในระบบประสาทส่วนกลางนั้นรวดเร็วมาก ที่สำคัญคือการแพร่จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง (cell to cell transmission) หรือโดย transynaptic spread ซึ่งมีหลักฐานจากการที่ Iwasaki และคณะ (70) ได้ทดลองในลูกหนูโดยฉีด fixed virus จำนวนมากเข้าสมองแล้ว เชื้อแพร่ไปอย่างรวดเร็ว การแพร่ดังกล่าวผ่านทาง retrograde fast axonal transport (200-400 มม./วัน) จากการทดลองเดียวกันนี้ ยังสามารถตรวจพบไวรัส budding ออกจาก plasma membrane ในระยะแรกของการติดเชื้อ และพบไวรัสใน intercellular space ซึ่งอาจเป็นอีกทางหนึ่งที่ไวรัสสามารถผ่านไปสู่เซลล์ทั้งไกลและใกล้ได้ นอกจากนี้ ในการทดลองของ Schneider (71) โดยฉีดไวรัสเข้าสมองหนู แทนที่จะพบการติดเชื้อในเซลล์บริเวณเข็มแทง กลับพบการติดเชื้อเกิดขึ้นในเซลล์สมองทั้งสองข้างพร้อม ๆ กันในตำแหน่งที่ตรงกัน และพบการติดเชื้อในไขสันหลังด้วย รวมทั้งจากรายงานของ Kent (75) ที่สามารถแยกไวรัสจากน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าในระยะต้นได้ ทำให้คิดว่าไวรัสน่าจะกระจายทางน้ำไขสันหลังได้ด้วย อย่างไรก็ตามการแพร่ทางน้ำไขสันหลังยังไม่ได้รับการยืนยันจากการทดลองในระยะต่อมานัก

ไวรัสที่เพิ่มจำนวนในเซลล์ประสาทจะเดินทางออกจากระบบประสาทไปยังอวัยวะต่าง ๆ ตามแขนงประสาท มักพบการติดเชื้อใน sensory nerve ending ของผิวหนังบริเวณศีรษะซึ่งเป็นส่วนที่ใกล้ระบบประสาทส่วนกลางมากที่สุดได้เสมอโดยเฉพาะในระยะท้ายของโรค นอกจากนี้อวัยวะที่พบไวรัสรองจากระบบประสาทคือ ต่อมน้ำลาย

กล่าวโดยสรุป การติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในคนและสัตว์อาจแบ่งเป็น 5 ระยะคือ 1) ระยะที่ไวรัสเข้าทางบาดแผลหรือเยื่อ 2) ระยะที่ไวรัสเดินทางจากตำแหน่งที่เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) 3) ระยะเพิ่มจำนวน

ในระบบประสาทส่วนกลาง 4) ระยะที่ไวรัสเดินทางออกจากระบบประสาทส่วนกลาง และ 5) ระยะสุดท้ายเป็นการติดเชื้อของอวัยวะอื่น ๆ นอกกระบบประสาท (72)

ดังได้กล่าวแล้วว่า G protein มีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อ เนื่องจากโปรตีนนี้เป็นส่วนประกอบของ spike ที่ไวรัสเข้ายึดติดกับ receptor site บน susceptible cell(73) ดังนั้นจึงมีผู้พยายามศึกษาถึงโครงสร้างระดับโมเลกุล หรือ molecular structure กับหน้าที่ทางชีวภาพของ glycoprotein โดยใช้ monoclonal antibodies เป็นตัวจำแนกหรือวิเคราะห์ epitopes ของโปรตีนร่วมกับการศึกษาโดยอาศัย physical mapping พบว่า non-pathogenic strain หรือ mutant ซึ่งเกิดจากการ selection โดย immunologic pressure จากการทดลองใช้ monoclonal antibody หลายตัว เช่น monoclonal antibody 194-2 และ 248-8 พบว่า non-pathogenic strain ไม่ถูก neutralized ทั้งนี้เนื่องจาก non-pathogenic strain มีการแทนที่กรดอะมิโน (amino acid substitution) ที่ตำแหน่ง 333 โดยเปลี่ยนจาก arginine เป็น glutamine ใน CVS strain และ arginine ถูกเปลี่ยนเป็น isoleucine ใน ERA strain (74) ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้มีการเปลี่ยนแปลงเพียงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของกรดอะมิโนจะส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแอนติเจน (antigen characteristic) และคุณสมบัติทางชีวภาพ (biological characteristic) ของไวรัส (75)

การศึกษาเกี่ยวกับการแทนที่ arginine ที่ตำแหน่ง 333 นั้น ทำโดยเปรียบเทียบความสามารถของ pathogenic parent CVS และ non-pathogenic CVS (mutant) ในแง่ของการแพร่ (spread) ออกจาก

inoculation site ทั้งในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และหลอดทดลอง (*in vitro*)

หลังจากฉีด parent CVS และ mutant เข้าสู่สมอง (76) พบว่าไม่มีความแตกต่างของการ distribution ในเซลล์สมอง แต่จะต่างในแง่ของความเร็วในการแพร่กระจายไปทั่วสมอง จำนวนเซลล์สมองที่ติดเชื้อ และระดับของการเกิด cellular necrosis ซึ่งจะต่ำลงในหนูที่ฉีดด้วย mutant ต่อมา Kucera และคณะ (77) inoculate ไวรัสเข้าตาหนูบริเวณ anterior chamber เพื่อที่จะศึกษาถึงการเดินทางสู่สมองของไวรัส พบว่า parent strain มีเส้นทางที่เข้าสู่ CNS และมีอัตราการ spread ต่างจาก mutant โดยที่ parent strain จะผ่านสู่ CNS ทาง oculomotor fiber (nerve 3), retinopetal fiber และ ophthalmic nerve (nerve V<sub>1</sub>) ขณะที่ mutant นั้น penetrate ผ่านทาง nerve V<sub>1</sub> เท่านั้น และพบว่าการติดเชื้อที่เลนส์ด้วย นอกจากนี้ Torres(78) และคณะ พบว่าเมื่อ inoculate mutant ลงบนลิ้นของหนู mice เชื้อจะ replicate และ diffuse ออกจากบริเวณที่ inoculate มาก ก่อนที่จะเดินทางสู่สมอง

สำหรับการทดลองในหลอดทดลอง เพื่อศึกษาว่าการ spread แบบ cell to cell ของ mutant แตกต่างจาก parent strain หรือไม่(78) uly ใช้ mouse neuroblastoma cell (C 1300 clone NA) เป็นแบบในการศึกษาเพราะสะท้อนให้เห็นถึง neuronal cell ของสัตว์มากที่สุด จากการทดลองพบว่า mutant ไม่สามารถ spread สู่เซลล์ใกล้เคียงที่ยังไม่มีการติดเชื้อซึ่งต่างจาก parent strain ขอบกพร่องของ mutant นี้ อาจเป็นผลมาจากการถูกแทนที่ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 333

กล่าวโดยสรุป pathogenic parent CVS และ mutant นั้นมีความแตกต่างกันหลายประการซึ่งความแตกต่างเหล่านี้ อาจเนื่องมาจาก fusion

function ของ G protein ใน mutant ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปจาก parent strain ก็ได้

## 2.6 การติดต่อ

การติดต่อส่วนใหญ่เกิดจากการที่ถูกสัตว์ซึ่งมีเชื้อไวรัสกัดหรือเลียและไวรัสผ่านทางน้ำลายเข้าสู่บาดแผลหรือรอยถลอกหรือเยื่อ การติดต่อทางอื่นอาจเกิดขึ้นได้ กล่าวคือโรคการหายใจ จากการศึกษาพบว่าค้างคาวที่ติดเชื้อมนุษย์สามารถตรวจพบไวรัสได้ในทางเดินหายใจ และเมื่อทดลองติดเชื้อมนุษย์โดยหยอดจมูกของหนู mice สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่เยื่อจมูกและ olfactory bulb

ส่วนการติดเชื้อมนุษย์โดยการกินนั้น Soave (79) ทำการทดลองในหนู mice และพบว่าไวรัสพิษสุนัขบ้าสามารถติดต่อโดยการกินได้

การติดต่อของโรคระหว่างคนกับคนนั้นเป็นไปได้ในกรณีของการผ่าตัด เปลี่ยนกระจกตา โดยได้รับบริจาคลูกตาจากผู้เสียชีวิตด้วยโรคพิษสุนัขบ้า (80) ส่วนการติดโรคโดยเชื้อผ่านทางรกเข้าไปสู่ embryo เกิดได้เฉพาะในสัตว์เท่านั้นในมนุษย์ยังไม่มีรายงานว่ามีการติดเชื้อในครรภ์



## 2.7 Laboratory diagnosis

การตรวจหาไวรัสพิษสุนัขบ้าทางห้องปฏิบัติการมีความสำคัญมาก เพื่อเป็นการวินิจฉัยแยกจากรกที่ทำให้เกิดอาการทางสมองอื่น ๆ ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของ Paralytic rabies ซึ่งมีลักษณะคล้ายโรคประสาทส่วนปลายอักเสบ สำหรับการตรวจน้ำไขสันหลังในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าโดยทั่วไป (8) มักไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เด่นชัด เช่น พบแรงดันสูงขึ้นเล็กน้อย จำนวนเซลล์ ระดับน้ำตาล และระดับโปรตีนเปลี่ยนแปลงบ้าง แต่มักอยู่ในเกณฑ์ปกติ ยกเว้นรายที่มีการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองร่วมด้วย จึงพบจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงขึ้น ซึ่งอาจสูงถึง 125 เซลล์/มม<sup>3</sup>

การตรวจที่จะช่วยวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้ามีหลายวิธี เช่น virus isolation, FAT จากสิ่งส่งตรวจอันได้แก่ เนื้อสมอง น้ำลาย หรือผิวหนัง เป็นต้น

ในปี คศ.1903 Aldelchi Negri ได้บรรยายถึงลักษณะของ inclusion body ที่พบอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ประสาทที่ติดเชื้อ ซึ่งต่อมาได้รับชื่อว่า Negri body ตามผู้ค้นพบ Negri body จัดเป็นลักษณะ pathognomonic ของโรคที่มีขนาดประมาณ 2-30 nm. รูปร่างกลมหรือรูปไข่ ติดสีม่วงแดงเมื่อย้อมด้วย Seller's stain การตรวจพบ Negri body ในเนื้อสมองนี้ถือเป็นลักษณะจำเพาะที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้ามาจนกระทั่งถึงปี 1958 แต่เนื่องจากการย้อมดู Negri body นั้นมีความไวอยู่ระหว่างร้อยละ 50-60 (81) ดังนั้นจึงถูกแทนที่ด้วยการทดสอบอื่นที่ให้ผลแม่นยำกว่าเช่น FAT, MIT, dot immunoblot, RTCIT และ RREID เป็นต้น นอกจากนี้การตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้าโดยวิธีเทคนิค nested PCR ยังเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับช่วยวินิจฉัยโรคอีกทางหนึ่งด้วย

### 2.7.1 Fluorescent Antibody Test (FAT)

FAT ถูกนำมาใช้ตั้งแต่ปี 1950 โดย Coons และ Kaplan (82) และได้พัฒนาใช้ fluorescein isothiocyanate ย้อม tissue ต่าง ๆ มากมาย (83) ต่อมาปี 1973 Dean และคณะดัดแปลงแก้ไข FAT จนสามารถใช้เป็นวิธีการตรวจหาห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ (84)

FAT เป็นวิธีทดสอบทางอิมมูน กระทำด้วยยาฆ่าเชื้อแอนติบอดีต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าติดฉลากด้วยสารเรืองแสงบางชนิด เช่น fluorescein isothiocyanate และแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงนี้จะเกาะกับแอนติเจนของไวรัสบนสไลด์เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) จะให้แสงสีเขียวอมเหลือง จากการศึกษาของห้องปฏิบัติการ Albany สหรัฐอเมริกา ระหว่างปี 1966-1970 โดยทดสอบกับสมองจำนวน 15,000 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธีนี้ 802 จากตัวอย่างที่บวกจริง 804 ตัวอย่าง ซึ่งมีเพียง 2 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ผลลบ และนอกจากนี้ FAT ยังใช้ตรวจสิ่งส่งตรวจชนิดอื่นนอกเหนือจากเนื้อสมองได้ เช่น ต่อมไทรอยด์และผิวหนัง เป็นต้น (85) จากการศึกษาของสถาบัน French National Reference Center for Rabies เปรียบเทียบ FAT กับ RTCIT โดยตรวจกับตัวอย่างจำนวน 15,248 ตัวอย่าง พบว่ามีความสัมพันธ์กันถึงร้อยละ 99.75 และไม่พบว่า FAT มี false negative (86)

กล่าวโดยสรุป FAT เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูง แต่อย่างไรก็ตาม านกรณีของคนที่คาดว่าได้รับเชื้อ (human exposure) สิ่งส่งตรวจที่ให้ผลลบด้วยวิธีนี้ก็ต้องตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่นต่อไป

### 2.7.2 Mouse Inoculation Test (MIT)

การทดสอบโดยฉีดเข้าสัตว์ทดลอง สามารถใช้สัตว์ทดลองหลายชนิด เช่น กระจ่าง หนูขาว และแฮมสเตอร์ เป็นต้น ในปี 1935 Webster และคณะ (87) แยกเชื้อไวรัสโดยฉีดเข้าสมองหนูขาวพันธุ์ Swiss albino เพราะหนูขาวไวต่อการรับเชื้อ แพร่พันธุ์ได้รวดเร็ว เลี้ยงง่าย ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมแก่การนำสัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการ

วิธีฉีดไวรัสเข้าสมองหนูขาวนี้ องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้เป็นวิธีที่มาตรฐานยืนยันผลของ FAT มาตั้งแต่ปี 1973 (88) และปัจจุบันสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ยังคงใช้วิธีนี้อยู่เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจแยกเชื้อที่มีปริมาณน้อยจากตัวอย่างที่ FAT ให้ผลลบได้ สิ่งส่งตรวจที่นำขึ้นนอกเหนือจากเนื้อสมองแล้วยังสามารถตรวจได้จากเนื้อเยื่อชนิดอื่น เช่น ต่อมน้ำลาย เป็นต้น

MIT เป็นวิธีที่ง่าย มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ต้องใช้เวลาเนิ่นนานจึงจะทราบผล เนื่องจาก street rabies virus มีระยะฟักตัวประมาณ 7-20 วัน ซึ่งปกติจะต้องเฝ้าสังเกตอาการทุกวันเป็นเวลา 28 วัน หลังฉีดไวรัส

### 2.7.3 Dot immunoassay

การตรวจทางน้ำเหลือง เป็นการตรวจเพื่อหาระดับแอนติบอดีก่อนและหลังการฉีดวัคซีน อาจใช้ในการพิสูจน์สายพันธุ์หรือศึกษาในแง่ของระบาดวิทยา แต่ไม่นิยมมาใช้เพื่อการวินิจฉัยการติดเชื้อ เพราะเมื่อมีการสัมผัสสารมักจะตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเมื่อผู้ป่วยเริ่มมีอาการแล้วจึงตรวจพบแอนติบอดีซึ่งจะสูง

ขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงระยะสุดท้ายของโรค แต่พบได้เพียง 1 ใน 3 ของผู้ป่วยทั้งหมด

การตรวจทางน้ำเหลืองนิยมใช้วิธี neutralization โดยทำในสัตว์ทดลอง เช่น หนูขาวหรือในเซลล์เพาะเลี้ยง สำหรับการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น Smith, Yager และ Baer(89) ได้พัฒนา Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) ให้สามารถรายงานผลการทดสอบได้ใน 24 ชม. และให้ผลดีเท่าเทียมกับการหาระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธี mouse neutralization test

Heberling และคณะ (90,91) ได้นำ dot immunoassay มาใช้สำหรับตรวจหาแอนติบอดี พบว่า มีความไวและความจำเพาะสูง

นอกจาก dot immunoassay จะใช้ตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองแล้ว หน่วยวิจัยและพัฒนา สภากาชาดไทย (92) ได้พัฒนาเป็นวิธีที่ใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนของไวรัส จากการวิจัยพบว่า ถ้าสิ่งส่งตรวจนั้นเป็นเนื้อสมองบริเวณ brainstem จะมีความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 88 ซึ่งจะเห็นได้ว่าไม่สามารถนำมาทดแทน FAT หรือ MIT ได้ แม้ว่าวิธีการทดสอบนี้จะใช้เวลาเพียง 6 ชม.ก็ตาม

#### 2.7.4 Rabies Tissue Culture Infection Test (RTCIT)

โดยทั่วไป MIT ใช้สำหรับทดสอบยืนยันผลลบจาก FAT แต่มีข้อเสียเรื่องเวลาดังได้กล่าวแล้ว สำหรับ RTCIT เป็นอีกการทดสอบหนึ่งที่ดี เนื่องจากใช้เวลาเพียง 48 ชม. ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด baby hamster kidney cell-21 หรือ BHK-21 (93) จากการทดลองในระยะแรกพบว่า RTCIT เป็นการทดสอบที่มีความไวเท่ากับ MIT แต่จากการศึกษาต่อมาบ่งชี้ว่าตัวอย่าง

ที่เน่าสลาย (decomposed sample) จะมี inhibitory substance ซึ่งสามารถรบกวนการทดสอบนี้ได้

ปี 1987 Rudd และคณะ (94) เปรียบเทียบความไวของการตรวจไวรัสระหว่าง BHK-21 กับ neuroblastoma cell line (C 1300) พบว่า neuroblastoma cell line ให้ความไวสูงกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดแรก แต่อย่างไรก็ตามอีก 2 ปีต่อมา Rudd (95) รายงานการตรวจไวรัสโดยใช้ neuroblastoma cell line ว่ามีข้อจำกัดเมื่อใช้ตรวจตัวอย่างที่ทิ้งไว้ 3 วัน

#### 2.7.5 Rapid Rabies Enzyme Immunodiagnosis (RREID)

Perrin และคณะ (96) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสพิษสุนัขบ้าโดยอาศัย enzyme linked immunosorbent assay หรือ ELISA แบบ sandwich technique จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ 6 แห่งโดยเปรียบเทียบระหว่าง FAT และ RREID พบว่ามีความสัมพันธ์ร้อยละ 89.7-99.2

วิธีนี้เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่ไม่มีกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงหรือจำนวนตัวอย่างมีปริมาณมาก ซึ่ง RREID เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถทดแทน FAT ได้ แต่ยังไม่สามารถนำผลเพื่อมาใช้ตัดสินใจในการให้การรักษาได้ เนื่องจากยังมีความไวต่ำกว่า FAT

### 2.7.6 Nested Polymerase Chain Reaction

(Nested PCR)

ความก้าวหน้าทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ได้รุดหน้าไปมากโดยเฉพาะเทคนิคด้าน recombinant DNA และด้านพันธุวิศวกรรม ทำให้นักวิทยาศาสตร์มีความรู้ความเข้าใจดียิ่งขึ้นเกี่ยวกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ตลอดจนสาเหตุของโรคที่มนุษย์กำลังเผชิญอยู่ รวมทั้งการแสวงหาแนวทางป้องกันและบำบัดรักษาโรคต่อไป

เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีการเพิ่ม DNA ในหลอดทดลอง คิดขึ้นโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันชื่อ Kary Mullis เมื่อปี 1985 (97, 98, 99) ซึ่งหลักการเริ่มจากการเลือกชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวนและสังเคราะห์ DNA เริ่มต้นที่จำเพาะ (specific primer) ที่มีขนาดประมาณ 15-30 nucleotide (100) โดยมีลำดับเบส complementary กับ DNA ส่วนหัวและท้ายของ gene ที่เราต้องการเพิ่มจำนวนนั้น เมื่อให้ความร้อน  $94^{\circ}\text{C}$  กับสาย DNA หรือ starting template จะทำให้ DNA 2 สายแยกออกจากกัน เปิดทางให้ specific primers เข้าจับกับ DNA แต่ละสายที่อุณหภูมิพอเหมาะ ซึ่งนับเป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์สาย DNA และการสังเคราะห์นี้จะดำเนินไปได้โดยอาศัยเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่อุณหภูมิ  $72^{\circ}\text{C}$  เมื่อการสังเคราะห์เสร็จสิ้นลงในรอบแรกจะได้ DNA 2 โมเลกุล และจากหลักการนี้ จะเห็นได้ว่า ถ้าเริ่มต้นจาก DNA 1 copy เมื่อผ่านกระบวนการสังเคราะห์ DNA ในรอบที่  $n$  จะทำให้ได้โมเลกุลของ DNA เพิ่มมากขึ้นเป็นทวีคูณ คือ  $2^n$  โดยทั่วไปการเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR นี้จะทำประมาณ 20-30 รอบ ซึ่งจะได้ DNA จำนวนมากหลายพันล้านโมเลกุลภายในเวลาเพียง 2-3 ชม. เท่านั้น (101)

จึงนับว่าเทคนิค PCR มีประโยชน์มากสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมของจุลชีพจากสิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณน้อย ซึ่งจะมีประโยชน์มหาศาลต่อการช่วยวินิจฉัยทางการแพทย์ในอนาคต

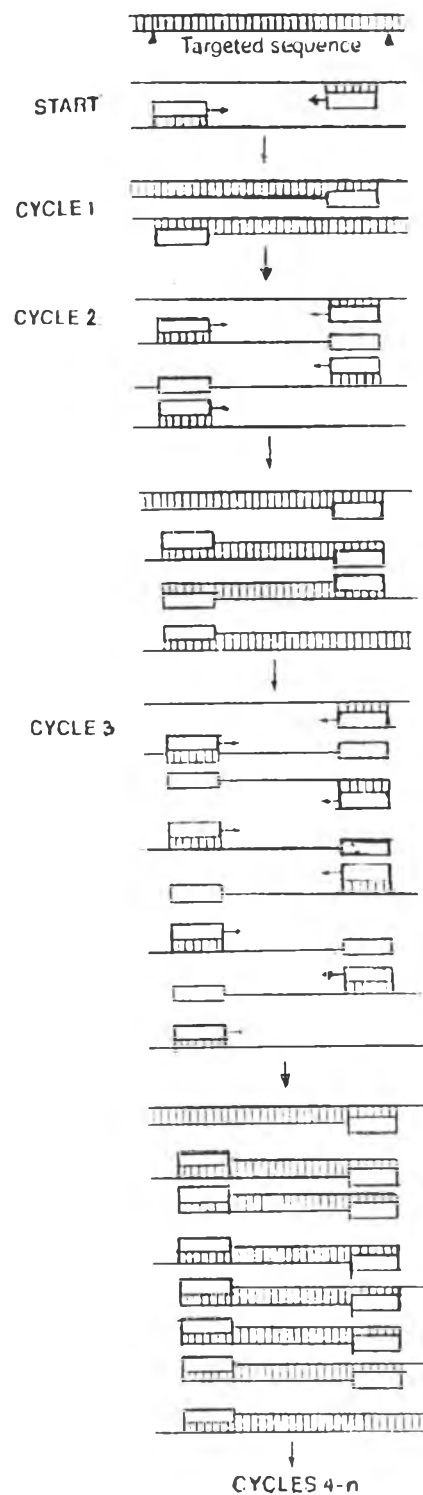
ดังได้กล่าวแล้วว่า nucleoprotein gene ของไวรัสพิษสุนัขบ้า เป็น gene ที่มีลักษณะอนุรักษ์ (conservative gene) (24) ดังนั้นส่วนของ RNA ที่เราต้องการเพิ่มจำนวน (target region) คือ nucleoprotein gene ซึ่งอยู่บน viral RNA genome และ N-mRNA

เนื่องจากไวรัสพิษสุนัขบ้ามี genome เป็น RNA จึงจำเป็นต้องเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA เสียก่อน โดยอาศัย primers และปฏิกิริยา reverse transcription, primer ตัวแรกนั้นมีชื่อว่า TH1 ซึ่ง complementary กับปลาย 3' ของ N gene บน RNA genome ที่มีลักษณะเป็น negative-strand RNA ส่วน primer TH2 complementary กับปลาย 3' ของ N gene บน positive-strand RNA และ N-mRNA cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นนี้ใช้เป็นแม่พิมพ์หรือ template สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR

Nested PCR หรือ double PCR เป็นการเพิ่มจำนวนของผลิตภัณฑ์ (product) ที่ได้จาก PCR ครั้งแรก โดยเพิ่มเฉพาะส่วนอันของจีน gene ซึ่งนอกจากจะเพิ่มความไวแล้วยังเป็นการยืนยันความจำเพาะและความถูกต้องอีกด้วย (รูปที่ 3)

องค์ประกอบที่สำคัญ ที่มีผลต่อความจำเพาะ และความถูกต้องของเทคนิค nested PCR ได้แก่ specific primers, PCR buffers,





รูปที่ 3 แสดงการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี Nested PCR target sequence คือ product ที่ได้จาก first step amplification



Taq DNA polymerase และ dNTP ดังจะกล่าวต่อไป

### Primers

Primers คือ DNA สายสั้น ๆ ขนาด 15-30 nucleotides (100) มีบทบาทสำคัญในการกำหนดความสำเร็จของการเพิ่มจำนวน DNA กล่าวคือ ต้อง complementary กับ gene เป้าหมาย คุณสมบัติของ primers โดยทั่วไปแล้วมีความเข้มข้น 0.1-1.0 uM, GC content ประมาณร้อยละ 50-60, ไม่ form ตัวเป็น primer dimer หรือ secondary structure เช่น hair pin เป็นต้น (101)

Primer sequence ที่ใช้สำหรับการวิจัยเฝ้าพิจารณาจาก N gene ของไวรัสสายพันธุ์ Pasteur หรือ PV strain (รูปที่ 4) โดยที่ primer คู่แรกนั้น ได้แก่ TH1 มี GC content ร้อยละ 53 ประกอบด้วย 17 nucleotides ดังนี้ 5'-CTACAATGGATGCCGAC-3' (66-82) และ TH2 มี GC content ร้อยละ 44 ประกอบด้วย 18 nucleotides คือ 5'-GAGTCACTCGAATATGTC-3' (1402-1419) สำหรับ primer คู่ในนั้น ได้แก่ TT3 มี GC content ร้อยละ 58 ประกอบด้วย 19 nucleotides คือ 5'-GACATGTCCGGAAGACTGG-3' (319-337) และ TT4 ซึ่งมี GC content ร้อยละ 55 ประกอบด้วย 20 nucleotides คือ 5'-GTATTGCCTCTCTAGGGTG-3' (823-842) ตามลำดับ

```

      A A C G G A T A C C
      | | | | | | | | | |
ACGCTTAAACAACCCAGATCAAGGAAAAAACAGACAGCGTCAATGGCAGAGCAAAAATGT AACACCTCTACA ATG AT GCC GAC AAG ATT GTA TTC AAA GTC 100
Leader RNA                               N m R N A
AAT AAT CAG GTG GTC TCT TIG AAG CCT GAG ATT ATC GTG GAT CAA TAT GAG TAC AAG TAC CCT GCC ATC AAA GAT TTG AAA AAG 125
Aan Aan Gln Val Val Ser Leu Lys Pro Glu Ile Ile Val Aap Gln Tyr Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Ile Lys Aap Leu Lys Lys
      200      225      250
CCC TGT ATA ACT CTA GGA AAG GCT CCC GAT TTA AAT AAA GCA TAC AAG TCA GTT TTA TCA TGC ATG AGC GCC GCC AAA CTT GAT 175
Pro Cys Ile Thr Leu Gly Lys Ala Pro Aap Leu Aen Lys Ala Tyr Lys Ser Val Leu Ser Cys Met Ser Ala Ala Lys Leu Aap
      275      300      325      350
CCT GAC GAT GTA TGT TCC TAT TTG GCG GCG GCA ATG CAG TTT TTT GAG GGG ACA TGT CCG GAA GAC TGG ACC AGC TAT GGA ATC 225
Pro Aap Aap Val Cys Ser Tyr Leu Ala Ala Ala Met Gln Phe Phe Glu Gly Thr Cys Pro Glu Aap Trp Thr Ser Tyr Gly Ile
      375      400      425
GTG ATT GCA CGA AAA GGA GAT AAG ATC ACC CCA GGT TCT CTG GTG GAG ATA AAA CGT ACT GAT GTA GAA GGG AAT TGG GCT CTG 275
Val Ile Ala Arg Lys Gly Aap Lys Ile Thr Pro Gly Ser Leu Val Glu Ile Lys Arg Thr Aap Val Glu Gly Thr Ala Leu
      450      475      500      525
ACA GGA GGC ATG GAA CTG ACA AGA GAC CCC ACT GTC CCT GAG CAT GCG TCC TTA GTC GGT CTT CTC TTG AGT CTG TAT AGG TTG 325
Thr Gly Gly Met Glu Leu Thr Arg Aap Pro Thr Val Pro Glu His Ala Ser Leu Val Gly Leu Leu Leu Ser Leu Tyr Arg Leu
      550      575      600
AGC AAA ATA TCC GGG CAA AGC ACT GGT AAC TAT AAG ACA AAC ATT GCA GAC AGG ATA GAG CAG ATT TTT GAG ACA GCC CCT TTT 375
Ser Lys Ile Ser Gly Gln Ser Thr Gly Aen Tyr Lys Thr Aen Ile Ala Aap Arg Ile Glu Gln Ile Phe Gly Thr Ala Pro Phe
      625      650      675
GTT AAA ATC GTG GAA CAC CAT ACT CTA ATG ACA ACT CAC AAA ATG TGT GCT AAT TGG AGT ACT ATA CCA AAC TTC AGA TTT TTG 425
Val Lys Ile Val Glu His His Thr Leu Met Thr Thr His Lys His Met Cys Ala Aen Trp Ser Thr Ile Pro Aen Phe Arg Phe Leu
      700      725      750      775
GCC GGA ACC TAT GAC ATG TTT TTC TCC CGG ATT GAG CAT CTA TAT TCA GCA ATC AGA GTG GGC ACA GTT GTC ACT GCT TAT GAA 475
Ala Gly Thr Tyr Aap Met Phe Phe Ser Arg Ile Glu His Leu Tyr Ser Ala Ile Arg Val Gly Thr Val Val Thr Ala Tyr Glu
      800      825      850      875
GAC TGT TCA GGA CTG GTG TCA TTT ACT GGG TTC ATA AAA CAA ATC AAT CTC ACC GCT AGA GAG GCA ATA CTA TAT TTC TTC CAC 525
Aap Cys Ser Gly Leu Val Ser Phe Thr Gly Phe Ile Lys Leu Ile Aen Leu Thr Ala Arg Glu Ala Ile Leu Tyr Phe Phe His
      900      925      950      975
AAG AAC TTT GAG GAA GAG ATA AGA AGA ATG TTT GAG CCA GGG CAG GAG ACA GCT GTT CCT CAC TCT TAT TTC ATC CAC TTC CGT 575
Lys Aen Phe Glu Glu Glu Ile Arg Arg Met Phe Glu Pro Gly Gln Glu Thr Ala Val Pro His Ser Tyr Phe Ile His Phe Arg
      1000      1025      1050      1075
TCA CTA GGC TTG AGT GGG AAA TCT CCT TAT TCA TCA AAT GCT GTT GGT CAC GTG TTC AAT CTC ATT CAC TTT GTA GGA TGC TAT 625
Ser Leu Gly Leu Ser Gly Lys Ser Pro Tyr Ser Ser Aen Ala Val Gly His Val Phe Aen Leu Ile His Phe Val Gly Cys Tyr
      1100      1125      1150      1175
ATG GGT CAA GTC AGA TCC CTA AAT GCA ACG GTT ATT GCT GCA TGT GCT CCT CAT GAA ATG TCT GTT CTA GGG GGC TAT CTG GGA 675
Met Gly Gln Val Arg Ser Leu Aen Ala Thr Val Ile Ala Ala Cys Ala Pro His Glu Met Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Gly
      1200      1225      1250      1275
GAG GAA TTC TTC GGG AAA GGG ACA TTT GAA AGA AGA TTC TTC AGA GAT GAG AAA GAA CTT CAA GAA TAC GAG GCG GCT GAA CTG 725
Glu Glu Phe Phe Gly Lys Gly Thr Phe Glu Arg Arg Phe Phe Arg Aap Glu Lys Glu Leu Gln Glu Tyr Glu Ala Ala Glu Leu
      1300      1325      1350      1375
ACA AAG ACT GAC GTA GCA CTG GCA GAT GAT GGA ACT GTC AAC TCT GAC GAC GAG GAC TAC TTC TCA GGT GAA ACC AGA AGT CCG 775
Thr Lys Thr Aap Val Ala Leu Ala Aap Aap Gly Thr Val Aen Ser Aap Aap Glu Aap Tyr Phe Ser Gly Glu Thr Arg Ser Pro
      1400      1425      1450      1475
GAA GCT GTT TAT ACT CGA ATC ATA ATG AAT GGA GGT CGA CTG AAG AGA TCG CAC ATA CGG AGA TAT GTC TCA GTC AGT TCC AAT 825
Glu Ala Val Tyr Thr Arg Ile Ile Met Aen Gly Gly Arg Leu Lys Arg Ser His Ile Arg Arg Tyr Val Ser Val Ser Ser Aen
      1500      1525      1550      1575
CAT CAA GCT CGT CCA AAC TCA TTC GCC GAG TTT CTA AAC AAG ACA TAT TCG AGT GAC TCA TAA GAAGTTGAATAACAAAATGCCGGAAT 875
His Glu Ala Arg Pro Aen Ser Phe Ala Glu Phe Leu Aen Lys Thr Tyr Ser Ser Aap Ser ...
      1600      1625      1650      1675
CTACGGATTGTGATATCATCATGAAAAAACT AACACCCCTCTCTTTCG... 925
N m R N A M I R N A

```

รูปที่ 4 แสดง nucleotide sequence ของ positive stranded DNA ของ rabies virus สายพันธุ์ Pasteur

### PCR buffer

โดยทั่วไป PCR buffer ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ดังนี้ 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3 ที่ 20°C Inis (102) พบว่า หากความเข้มข้นของ KCl เกิน 50 mM แล้ว จะยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ Taq DNA polymerase ได้

เนื่องจากเอนไซม์ Taq DNA polymerase นี้เป็น magnesium dependent enzyme กล่าวคือ เอนไซม์จะทำงานได้ต่อเมื่อมี magnesium ion ( $Mg^{2+}$ ) (100) ในปริมาณที่เหมาะสม ระหว่าง 0.5-2.5 mM หากใช้ divalent ion อื่น เช่น manganese ion หรือ calcium ion แทน magnesium ion พบว่า การเพิ่มจำนวน DNA จะลดลง หรือไม่มีการเพิ่มของ DNA ตามลำดับ (103)

นอกจากนี้สารต่าง ๆ ในกลุ่ม chelating agent เช่น EDTA ใน DNA sample หรือสารที่มีประจุลบ เช่น ฟอสเฟต จาก dNTP ล้วนมีผลต่อ free magnesium ion ทั้งสิ้น

### Taq DNA polymerase

ในระยะแรกของการพัฒนาเทคนิค PCR นั้น เกิดปัญหาสำคัญประการหนึ่ง คือการใช้ความร้อนสูงเพื่อทำให้ DNA แยกออกเป็น 2 สาย ในสถานะที่ใช้ความร้อนสูงดังกล่าวส่งผลให้เอนไซม์ DNA polymerase ทั่วไปไม่สามารถคงสภาพและทำงานได้ จนกระทั่งพบเอนไซม์ DNA polymerase ที่สกัดได้จากแบคทีเรียชนิดหนึ่งชื่อ Thermus aquaticus strain YT<sub>1</sub> (103, 104) ซึ่งอาศัยอยู่ตามบริเวณบ่อน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิสูงถึง 70-80 °C เอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดนี้จึงสามารถทำหน้าที่ในสถานะที่มีอุณหภูมิสูงได้

จากการทดลองพบว่า เอนไซม์นี้สามารถอยู่ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 40 นาที โดยที่ activity ของเอนไซม์ยังเหลืออยู่ร้อยละ 50 (105)

เอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมี 2 แบบ โดยที่แบบแรกสกัดจากแบคทีเรีย Thermus aquaticus strain YT<sub>1</sub> สำหรับแบบที่ 2 นั้นอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมให้ E. coli สังเคราะห์ เช่น AmpliTaq™ เอนไซม์ Taq DNA polymerase ทั้ง 2 แบบ เป็นโปรตีนที่มีขนาด 94 kd มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ สร้าง DNA สายใหม่ในทิศทางเดียวเท่านั้น เอนไซม์จะทำงานโดยจับปลาย 3'OH ของ primer และสร้างสาย DNA แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์นี้ไม่มีคุณสมบัติตรวจความผิดพลาดของ DNA ที่สร้างขึ้นใหม่ หรือ proof reading (106) ถึงแม้การทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase จะมีความจำเพาะสูง แต่ความผิดพลาดก็อาจเกิดขึ้นได้ จากการศึกษาของ Saiki (106) พบว่าอัตราความผิดพลาดของเอนไซม์ในการสร้าง DNA สายใหม่ประมาณ  $2 \times 10^{-4}$  nucleotide ต่อ cycle ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ประมาณ 1-2.5 unit

#### Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

Deoxynucleotide triphosphates ได้แก่ deoxyadenosine 5'-triphosphate (dATP), deoxycytosine 5'-triphosphate (dCTP), deoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP) และ deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ DNA โดยทั่วไปความเข้มข้นของ dNTPs ทั้ง 4 จะใช้เท่ากัน คือประมาณอย่างละ 20-200  $\mu$ M นอกจากนี้ Inis ยังพบว่า dNTPs ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสามารถลด non-specific amplification ได้