

การพัฒนาและทดสอบคุณลักษณะของไวรัสโซมที่เตรียมจากเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิด เอช5 เอ็น1

นาย ฉัตรชัย สารชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์ปีก ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF AVIAN INFLUENZA H5N1 VIROSOME.

Mr. Chatchai Sarachai

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

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

490570

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาและทดสอบคุณลักษณะของไวรัสโชมที่เตรียมจากเชื้อไวรัส
เอเวียนอินฟลูเอนซา ชนิด เอช5เอ็น1

โดย

นายฉัตรชัย สารชัย

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์สัตว์ปีก

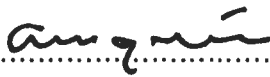
อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย

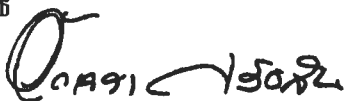
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์

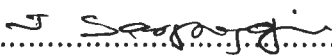
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรถพร คุณาวงษ์กฤต)

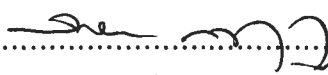
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อังกรร ฐวสิน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์)


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


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สมศักดิ์ รัคคิณโย)

ฉัตรชัย สารชัย : การพัฒนาและทดสอบคุณสมบัติของไวโรโซมที่เตรียมจากเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา ชนิด เอช5เอ็น1 (DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF AVIAN INFLUENZA H5N1 VIROSOME.) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. น.สพ. ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศ. น.สพ. ดร. จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์, 51 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมและการตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคไวโรโซมที่ประกอบขึ้นจากโปรตีนโครงสร้างเปลือกหุ้มของไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซาชนิดเอช5 เอ็น1 โดยการสลายเยื่อหุ้มไขมันของไวรัสด้วยสารละลาย octaethyleneglycol mono (n-dodecyl) ether ($C_{12}E_8$) และตามด้วยการสร้างอนุภาคของไวโรโซม โดยใช้ Bio-Beads SM2 เพื่อคัดจับสารละลายดังกล่าวออกไป การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของอนุภาคไวโรโซม ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western immunoblotting พบว่าไวโรโซมที่เกิดขึ้นมีลักษณะเหมือนกับไวรัสดั้งเดิม ซึ่งประกอบด้วยไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (HA) ขนาดโมเลกุล 60–75 kDa และนิวรามินิเดส (NA) ขนาดโมเลกุล 220 kDa โดยโปรตีนทั้งสองชนิดยังคงมีความสามารถทางด้านชีวภาพ เช่น การจับและตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination activity) ลักษณะของอนุภาคไวโรโซมเมื่อวิเคราะห์ด้วย negative stained transmission electron microscope (TEM) พบว่ามีรูปร่างคล้ายทรงกลม และปรากฏไกลโคโปรตีนโพลีเอินออกมาจากผิวของเปลือกหุ้มไวรัส จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการเตรียมไวโรโซม โดยใช้สาร octaethyleneglycol mono (n-dodecyl) ether เพื่อสลายเยื่อหุ้มไขมันของไวรัส ตามด้วย polymer beads adsorption (Bio-Beads SM2) เพื่อกำจัดสารซักฟอก สามารถเตรียมไวโรโซมที่มีคุณลักษณะเหมือนกับไวรัสดั้งเดิมได้ ซึ่งอาจนำไปใช้ในการพัฒนาและเตรียมวัคซีนสำหรับใช้ในทางสัตวแพทย์ได้ในอนาคตต่อไป

ภาควิชา อายูรศาสตร์
สาขาวิชา อายูรศาสตร์สัตว์ปีก
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

477555131 : MAJOR AVIAN MEDICINE

KEY WORD: VIROSOME / AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1 /
CHARACTERIZATION/PREPARATION

CHATCHAI SARACHAI : DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF AVIAN
INFLUENZA H5N1 VIROSOME. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. NIWAT
CHANSIRIPORNCHAI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : PROF. JIROJ SASIPREEYAJAN,
Ph.D., 51 pp.

The purpose of this study was to prepare and characterize virosome containing envelope proteins of Avian influenza (H5N1) virus. Virosome was prepared by solubilization of virus with octaethyleneglycol mono (n-dodecyl) ether (C₁₂E₈) followed by detergent removal with SM2 Bio-Beads. Biochemical analysis by SDS-PAGE and Western blotting, indicated that avian influenza H5N1 virosome had similar characteristics as the parent virus and contained both the hemagglutinin (HA, 60–75 kDa) and neuraminidase (NA, 220 kDa) protein, with preserved biological activity, such as hemagglutination activity. The virosome structure was analyzed by negative stained transmission electron microscope (TEM), demonstrated spherical shapes of vesicles with surface glycoprotein spikes were harbored. In conclusion, the biophysical properties of virosome were similar to the parent virus, and the use of octaethyleneglycol mono (n-dodecyl) ether to solubilized viral membrane, followed by removal of detergent using polymer beads adsorption (Bio-Beads SM2) is the preferable method for obtaining avian influenza virosome. The outcome of this study may be useful for further development veterinary virus vaccines.

Department Veterinary Medicine
Field of study Avian Medicine
Academic year 2006

Student's signature..... *C. Sarachai*
Advisor's signature..... *N. Chansiripornchai*
Co-advisor's signature..... *J. Sasipreeyajan*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ เรื่อง การพัฒนาและทดสอบคุณสมบัติของไวโรโซมที่เตรียมจากเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ชนิด เอช5เอ็น1 (DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF AVIAN INFLUENZA H5N1 VIROSOME.) โดยมีข้าพเจ้า นายฉัตรชัย สารชัย เป็นผู้จัดทำ ได้ดำเนินการตามเป้าหมายและวัตถุประสงค์เรียบร้อยแล้ว ทั้งนี้ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นิวัตร จันทศิริพรชัยและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางในการดำเนินงานจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนสำหรับดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. คณิศศักดิ์ อรวิระกุล รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ชนาวงศ์นุเวช นายสัตวแพทย์ รชฎ ดันติเลิศเจริญ และ คุณ สุมิตรา วัฒนโคตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ไวรัสและห้องปฏิบัติการสำหรับดำเนินงานเตรียมเชื้อไวรัส รวมทั้งให้คำแนะนำในการดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณบุคลากร หน่วยไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์วิจัยแพทยศาสตรจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์และเอื้อเฟื้อในการใช้สถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ในการเตรียมเชื้อไวรัสและไวโรโซม

ขอขอบพระคุณ สัตวแพทย์หญิง อรุณี ชัยสิงห์ หน่วยไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์แอนติซีรั่มต่อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอ็น1

ขอขอบคุณ สพ.ญ.สุวรรักษ์ วรรณรัตน์ สพ.ญ.กฤดา ชูเกียรติศิริ และ อ.นสพ.ธวัชชัย โพธิ์เสียง ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานด้านต่างๆ ในระหว่างการเรียน

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดเตรียมสารเคมี วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ รวมทั้งการดำเนินงานด้านธุรการ ในระหว่างการเรียนให้ดำเนินไปได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ พี่ชาย พี่สะใภ้ ที่ให้ความรักความปรารถนาดี คอยห่วงใยเป็นกำลังใจ อีกทั้งยังเป็นທີ່ปรึกษาและเป็นแรงผลักดันที่สำคัญให้มีความตั้งใจและความอดทนในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงมาด้วยดี

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย.....	3

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การจำแนกชนิด และลักษณะ โครงสร้างของไวรัส.....	4
2.2 การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัส.....	6
2.3 คุณสมบัติทางกายภาพของไวรัส.....	6
2.4 การติดต่อและแพร่กระจายของไวรัส.....	7
2.5 การก่อโรคของไวรัส.....	8
2.6 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสัตว์ปีกต่อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา.....	10
2.7 วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซาในสัตว์ปีก.....	11
2.8 อินฟลูเอนซาไวรัส.....	12
2.9 ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไวรัส.....	14
2.10 การพัฒนาวัคซีนไวรัสเพื่อป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ปีก.....	15

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การเตรียมไวรัส.....	16
3.2 การลดฤทธิ์ของไวรัส	
3.2.1 การทดสอบความสามารถในการติดเชื้อ.....	16
3.2.1.1 Hemagglutination; HA test.....	17

บทที่	ช หน้า
3.2.1.2 Hemagglutination Inhibition; HI test.....	17
3.3 การเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์	
3.3.1 การเตรียมสารละลายซูโครส.....	18
3.3.2 การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์.....	18
3.4 การเตรียมไวโรโซม.....	18
3.5 การทดสอบคุณลักษณะทางกายภาพของไวโรโซม	
3.5.1 การศึกษารูปร่างของไวโรโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	19
3.5.2 การศึกษาโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	20
- การเตรียม Separation gel (12.0% gel).....	20
- การเตรียม Stacking gel (4% gel).....	20
- การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (sample preparation).....	20
- การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (sample loading and running).....	21
- การย้อมสีโปรตีนในเจล (Coomassie blue staining).....	21
3.5.3 การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Western immunoblotting	
- การถ่ายโอนโปรตีน (transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gel to membrane).....	21
- การขัดขวางการจับกันของโปรตีนที่ไม่มีความจำเพาะ (blocking of nonspecific protein binding site).....	22
- antibody binding.....	22
- การตรวจหาโปรตีน (detection).....	22
3.6 การทดสอบคุณลักษณะทางด้านชีวภาพของไวโรโซม (biological characterization of virosome)	23

บทที่	หน้า
4. ผลการทดลอง	
4.1 การลดฤทธิ์ของไวรัส.....	24
4.1.1 การเปลี่ยนแปลงระดับ hemagglutination titer ของไวรัส เอเวียน อินฟลูเอนซา.....	24
4.1.2 ความสามารถในการติดเชื้อ	24
4.2 การเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์.....	26
4.3 การเตรียมไวโรโซม.....	26
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	31
รายการอ้างอิง.....	36
ภาคผนวก.....	43
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	51

สารบัญตาราง

ญ

หน้า

ตารางที่ 1	แสดงองค์ประกอบและคุณสมบัติของ Influenza A virus genome RNA segments.....5
ตารางที่ 2	แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง และระดับHA titer ของไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา.....24
ตารางที่ 3	แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของระดับ HA titer และ Infectivity test ของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา.....25

รูปที่ 1	รูปภาพแสดงลักษณะโครงสร้างของไวโรโซม.....	13
รูปที่ 2	แผนภาพแสดงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการได้รับไวโรโซม.....	14
รูปที่ 3	แสดงองค์ประกอบโปรตีนของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอ็น1 ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	26
รูปที่ 4	แสดงลักษณะทางกายภาพของสารละลายตัวอย่างก่อน และหลังการทำปฏิกิริยาคัวยสารละลาย $C_{12}E_8$ และดูดซับด้วย BioBead SM2.....	27
รูปที่ 5	แสดงลักษณะแถบของไวโรโซมระหว่างชั้นของน้ำตาลซูโครส.....	27
รูปที่ 6	การวิเคราะห์องค์ประกอบโปรตีนของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอ็น1 และไวโรโซม ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	28
รูปที่ 7	การวิเคราะห์องค์ประกอบโปรตีนของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอ็น1 และไวโรโซม ด้วยวิธี Western blotting.....	28
รูปที่ 8	Negative-staining transmission electron micrograph (TEM) ของไวรัส และไวโรโซมที่เตรียมจากไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอ็น1.....	29
รูปที่ 9	แสดงการวิเคราะห์ hemagglutination activity ของไวโรโซม.....	30