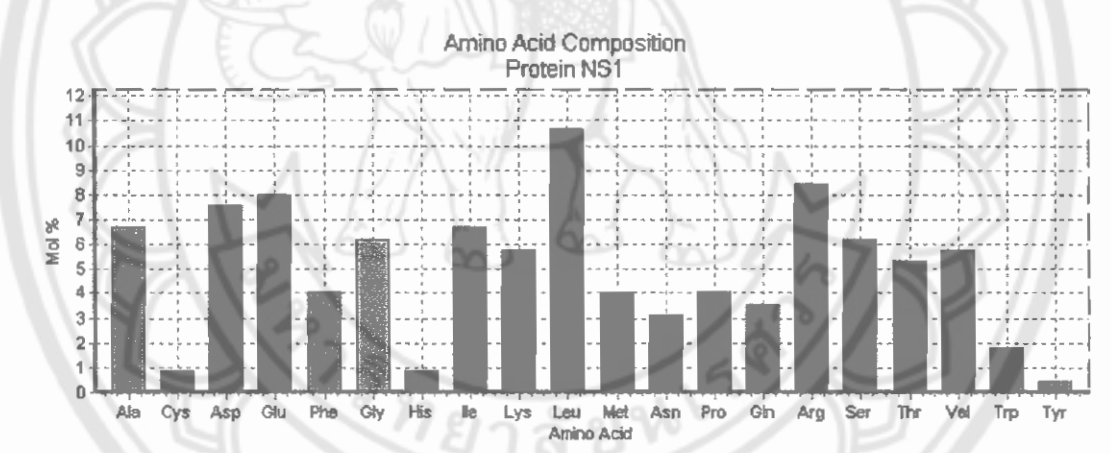


บทที่ 4

ผลการวิจัย

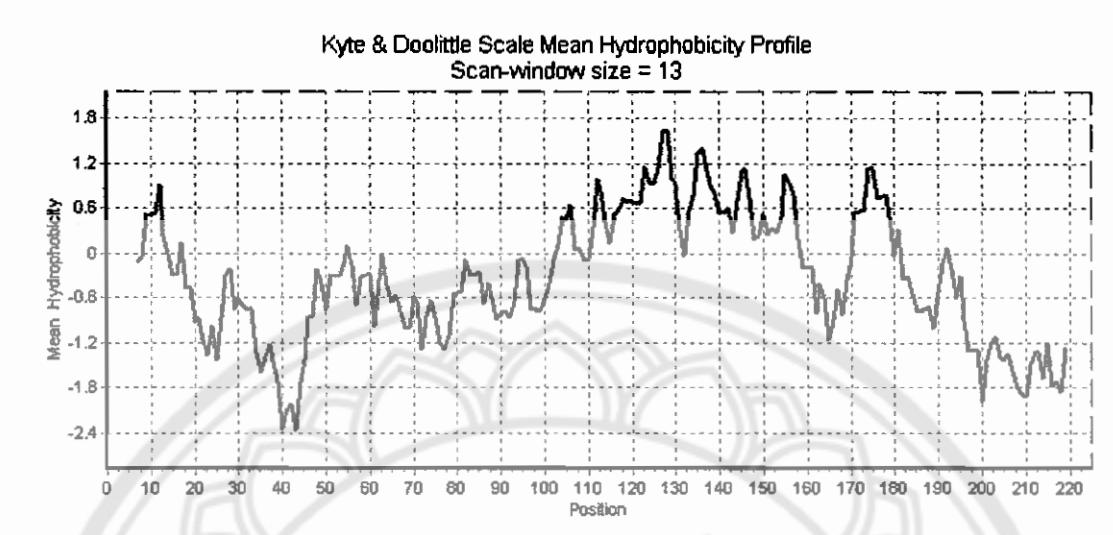
การวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน NS1 ด้วยโปรแกรม BIOEDIT (version 7.0.4.1)

เมื่อนำข้อมูลกรดอะมิโนของโปรตีน NS1 ของตัวอย่าง A/little grebe/Thailand/Phichit-01/2004(H5N1) ที่มีการเผยแพร่ใน GENBANK มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BIOEDIT (version 7.0.4.1) เข้าสู่ Amino Acid Composition พบว่าโปรตีน NS1 มีความยาว 225 มีน้ำหนักโมเลกุล 25521.96 Daltons หรือ 25.52 kDa ซึ่งโปรแกรมนี้ได้กล่าวถึงรายละเอียดของกรดอะมิโนของโปรตีน NS1 พบว่ามีกรดอะมิโน 20 ตัว มีกรดอะมิโน Leucine มากที่สุดร้อยละ 10.67 ของโปรตีนทั้งหมด และมีกรดอะมิโน Tyrosine ร้อยละ 0.44 ของโปรตีนทั้งหมด ดังภาพ 14



ภาพ 14 แสดงกราฟ Amino Acid Composition ของกรดอะมิโนของโปรตีน NS1

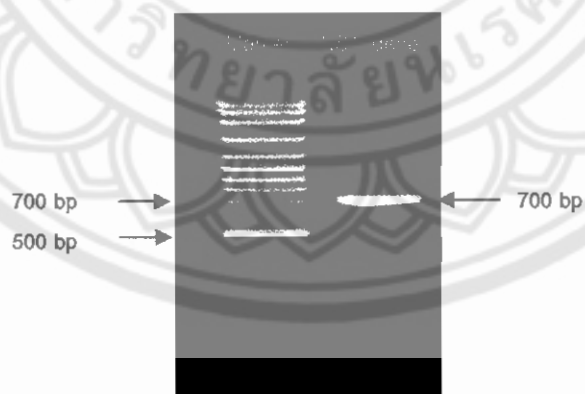
ข้อมูลกรดอะมิโนของโปรตีน NS1 ได้นำมาวิเคราะห์ด้วย BIOEDIT (version 7.0.4.1) ทำให้ได้กราฟ Mean Hydrophobicity ดังภาพ 15 ซึ่งเส้นกราฟส่วนบนคือ 0 ถึง 1.8 เป็นส่วนที่ละลายน้ำ และเส้นกราฟส่วนล่างคือ 0 ถึง -2.4 เป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งจากภาพ 15 ทำให้ทราบว่า โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำส่วนมากอยู่ในส่วน N - terminal และมีบางส่วนที่อยู่ด้าน C - terminal และพบว่ากรดอะมิโนของโปรตีน NS1 ที่ 35 - 38 และ 211 - 216 ทำหน้าที่ nuclear localization signals มีกรดอะมิโนของโปรตีน NS1 ที่ 133 - 142 ทำหน้าที่ nuclear export signals อยู่บริเวณ C - terminal



ภาพ 15 แสดงกราฟ Mean Hydrophobicity ของกรดอะมิโนของโปรตีน NS1

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน NS1 ด้วยเทคนิค PCR

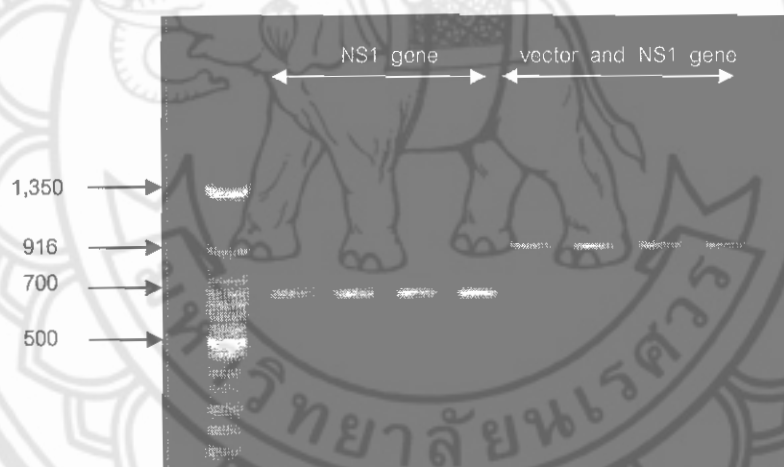
เมื่อนำยีน NS1 ของตัวอย่าง A/little grebe/Thailand/Phichit-01/2004(H5N1) ที่ได้จาก TOPO plasmid vector ผ่านขั้นตอนการสกัดพลาสมิด และขั้นตอนการ PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อเวกเตอร์ pET101/D-TOPO® และยีน NS1 ได้เป็น PCR product ขนาดประมาณ 700 bp ดังภาพ 16



ภาพ 16 แสดงขนาดของยีน NS1 ของ A/little grebe/Thailand/ Phichit-01/2004(H5N1) ด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบทิศทางของยีน NS1 ด้วยวิธี PCR และการศึกษาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ หลังจากทำการโคลนยีน NS1 เข้าสู่ *E.coli* TOP10F'

หลังจากโคลนยีน NS1 เข้าสู่ *E.coli* TOP10F' ได้มีการตรวจสอบด้วยการเพิ่มจำนวน recombinant plasmid NS1 โดยวิธี PCR ซึ่งนำ *E.coli* TOP10F' ที่มี recombinant plasmid NS1 มาจำนวน 4 โคโลนี และได้นำมาตรวจสอบขนาดของนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี gel electrophoresis ดังภาพ 17 พบว่ามี recombinant plasmid NS1 ที่ตำแหน่งประมาณ 700 bp ซึ่งการทำ PCR ได้ใช้ primer ที่เฉพาะกับยีน NS1 และจากการใช้ primer ที่เฉพาะต่อเวกเตอร์ pET101/D-TOPO® พบว่า มีส่วนของเวกเตอร์ และ recombinant plasmid NS1 ที่ประมาณ 900 bp ทำให้ทราบว่า recombinant plasmid NS1 สามารถแทรกอยู่ในเวกเตอร์ได้ ทั้ง 4 โคโลนี ดังภาพ 17 และได้ทำการยืนยัน recombinant plasmid NS1 ที่เข้าสู่เวกเตอร์ pET101/D-TOPO® ด้วยการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพ 17 แสดงขนาดของยีน NS1 และ recombinant plasmid NS1 ของทั้ง 4 โคโลนี หลังจากโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET101/D-TOPO®

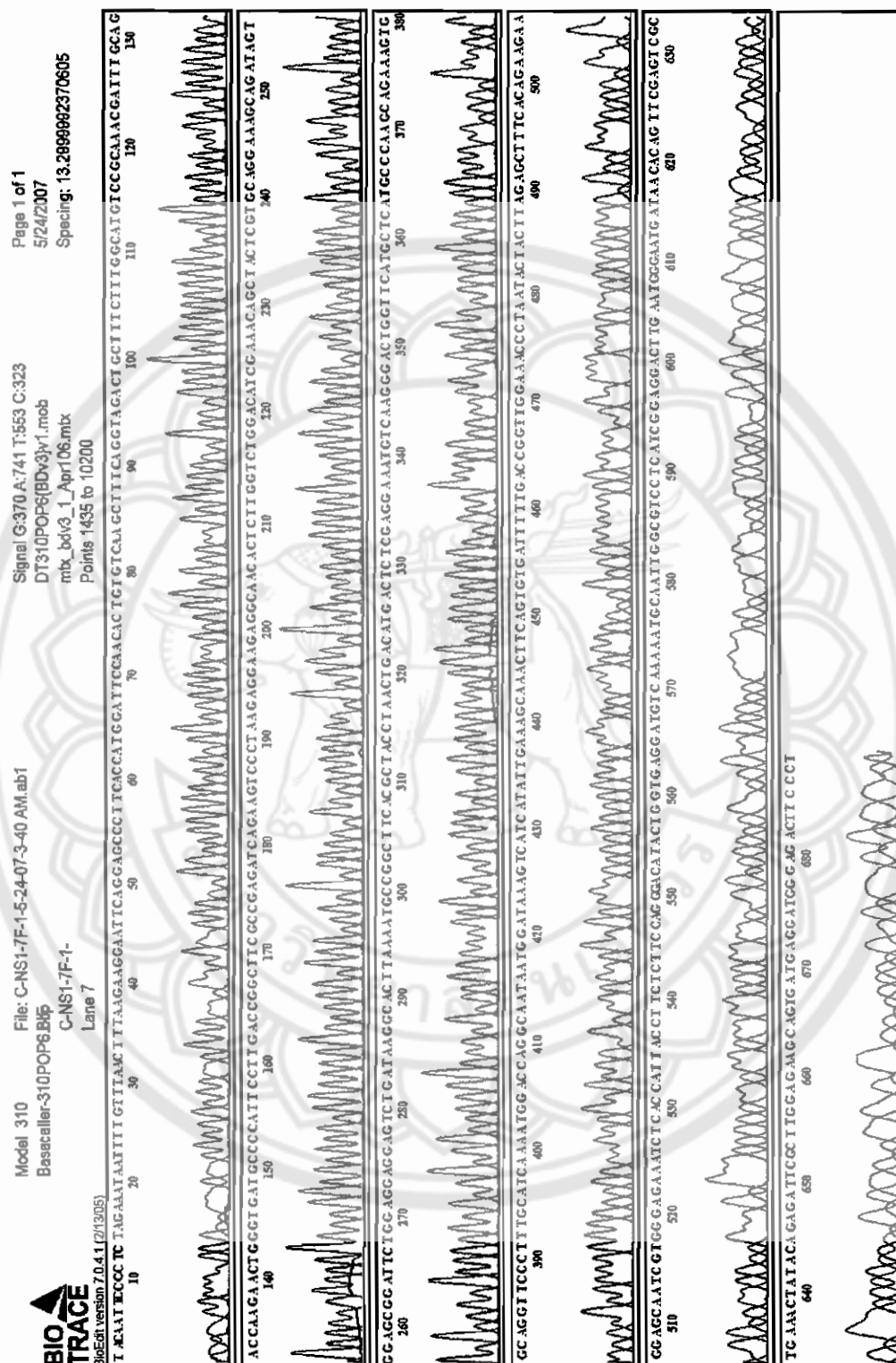
ซึ่งจากการตรวจสอบด้วยการหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน NS1 ดังภาพ 18 โดยพบส่วนของยีน NS1 แทรกอยู่ในส่วนของเวกเตอร์ pET101/D-TOPO® และสามารถดูโครมาโตแกรมได้ในภาพ 19 – 24

จากภาพ 18 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์ที่เป็น *lac* operator ในส่วนที่ 1 – 23 (AATTGTGAGC GGATAACAAT TCC) ถัดมาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 53 – 59 (GAAGGAA) และ 63 – 66 (AGGA) เป็นส่วนของ Ribosome Binding Site (RSB) ต่อมาพบส่วนที่เป็นตัวเชื่อม

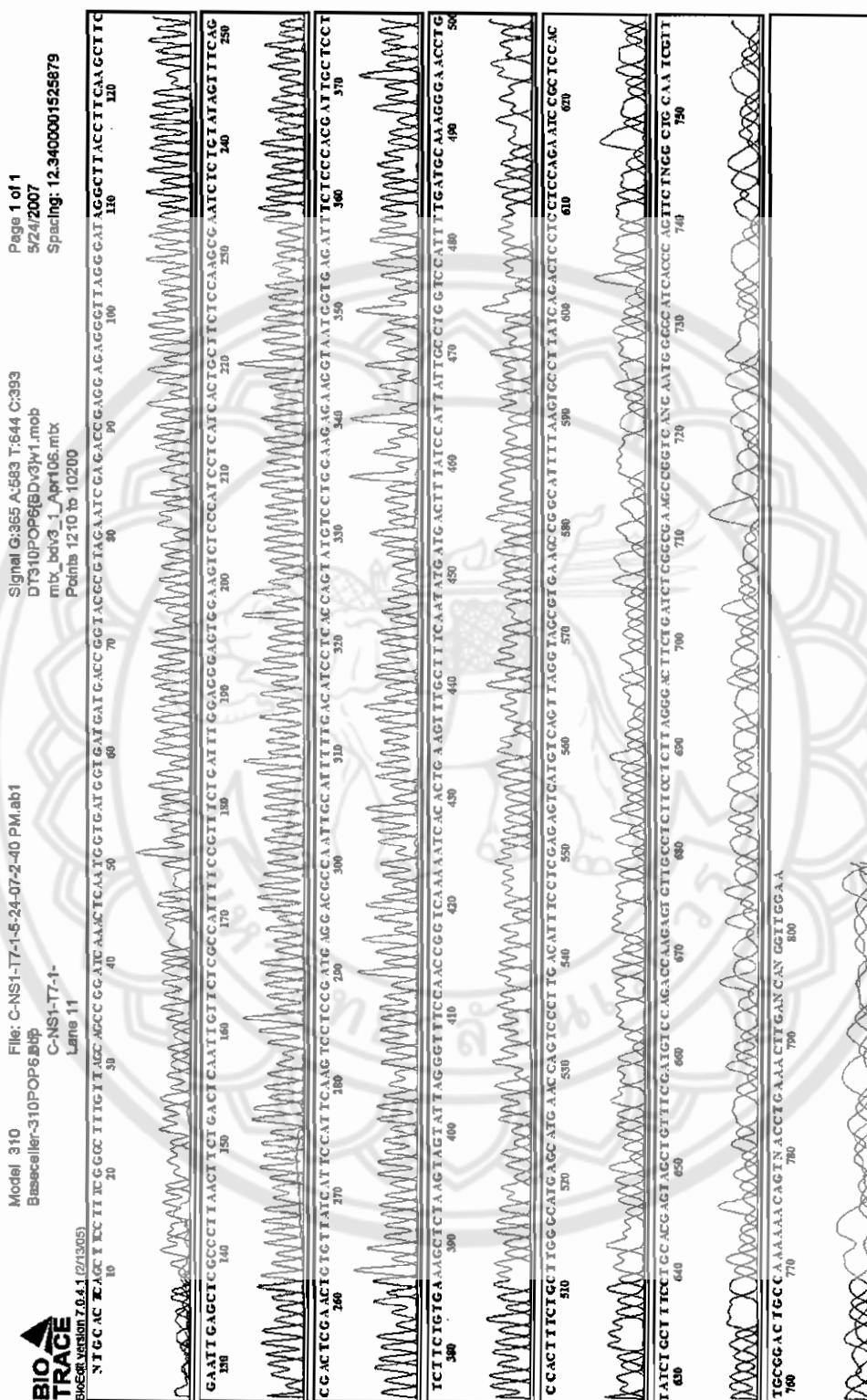
ระหว่างเวกเตอร์กับยีน NS1 ในตำแหน่งที่ 72 – 75 (CACC) และถัดจากนั้นเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 คือ ATG เป็นตำแหน่งที่ 76 – 78 ซึ่งลำดับกรดอะมิโนได้เริ่มจากตำแหน่งนี้ ซึ่งคือ M ให้นับเป็นตำแหน่งที่ 1 ของกรดอะมิโน NS1 ในลำดับกรดอะมิโนที่ 35RLRR38 และ 211PNQKRK216 เป็นกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ nuclear localization signals ส่วนกรดอะมิโนที่ 133FDRLLETILL142 เป็นกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ nuclear export signals และกลุ่มกรดอะมิโนสุดท้ายคือ ที่ 222ESEV225 เป็นกรดอะมิโนที่สามารถจับกับบริเวณ PDZ domains ของเซลล์เจ้าบ้านได้ จากนั้นเริ่มเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์จนถึงตำแหน่ง 905 ซึ่งตำแหน่งที่ 830 – 847 (CATCATCACCATCACCATTGA) เป็นตำแหน่งของ V5 epitope และ Polyhistidine (6xHis) และที่ 847 – 850 TGA เป็นตำแหน่ง stop codon



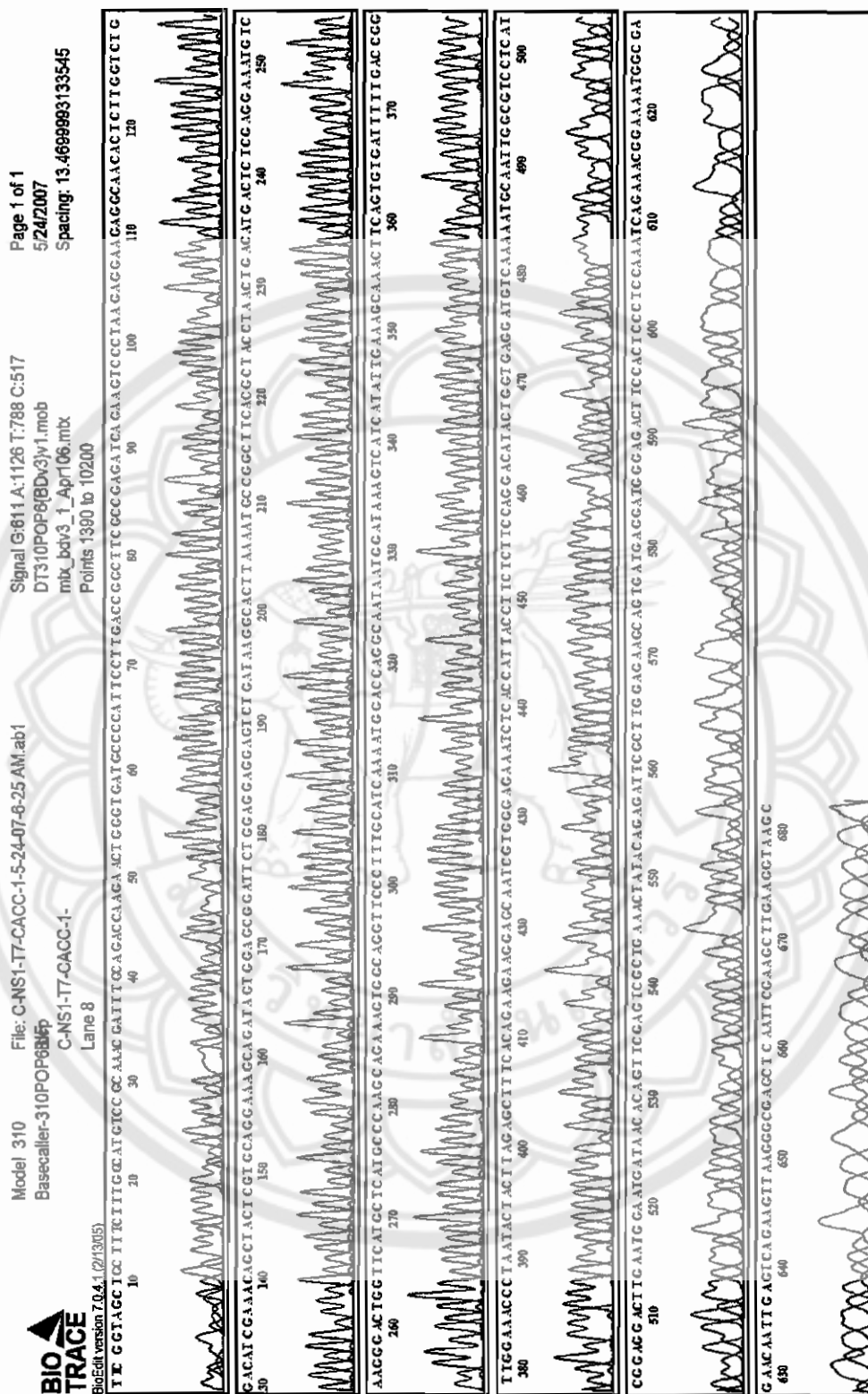
ภาพ 18 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 ที่เข้าสู่เวกเตอร์และลำดับกรดอะมิโนของยีน NS1 โดยเริ่มจากเมไทโอนีน



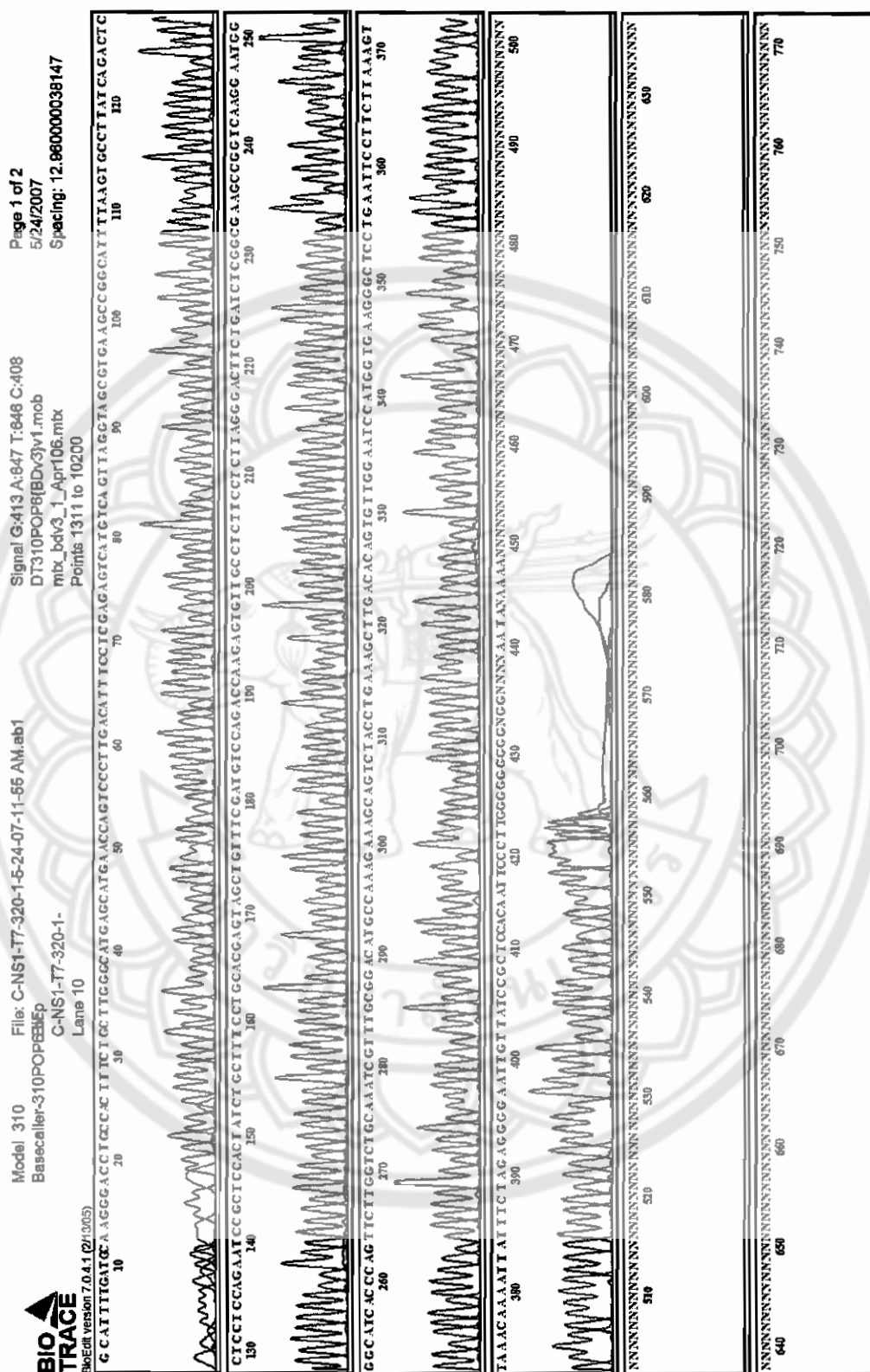
ภาพ 19 แสดงโครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อ
เวกเตอร์ pET101/D-TOPO® คือ NS1 – T7 – F



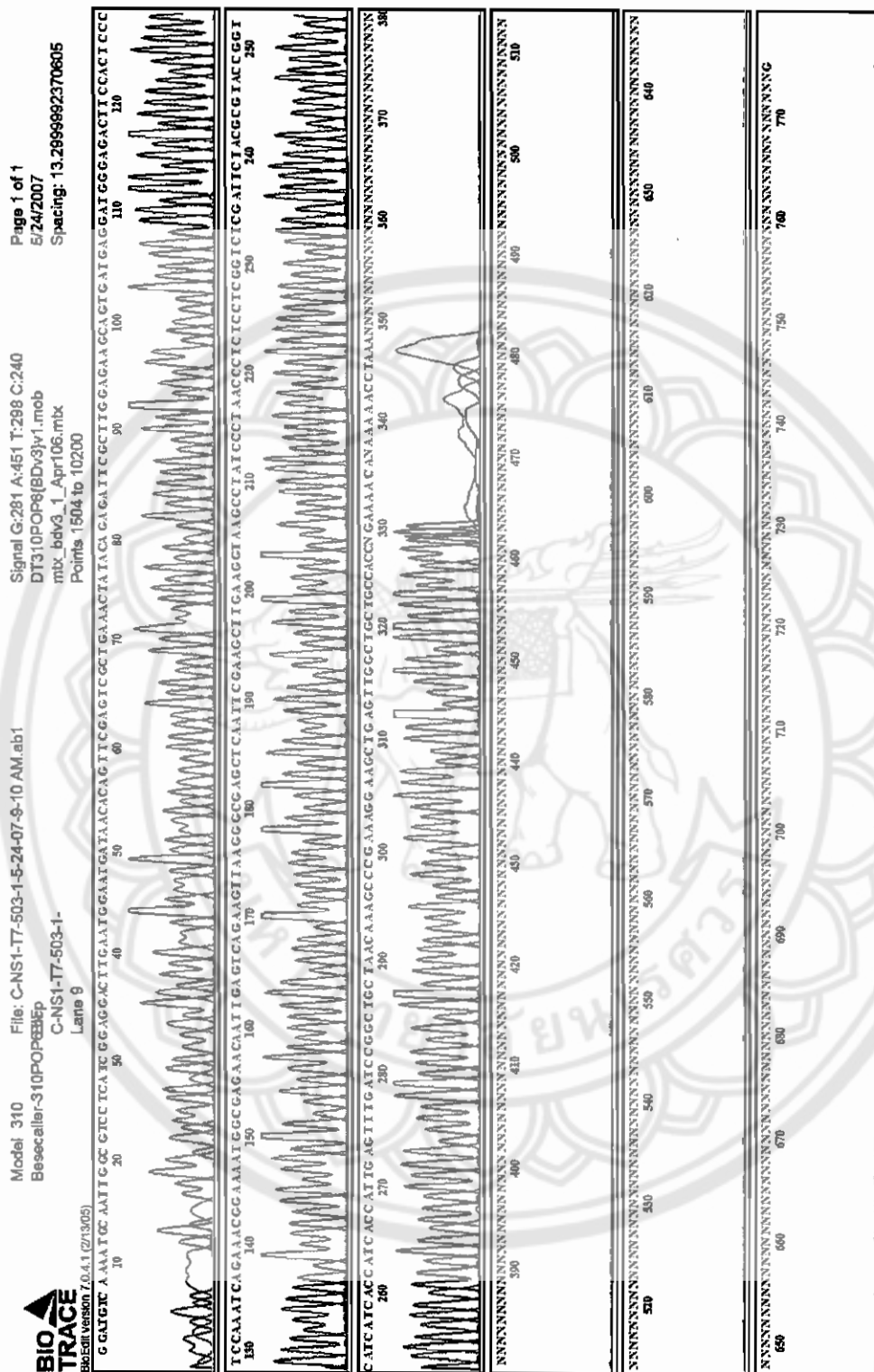
ภาพ 20 แสดงโครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อ
เวกเตอร์ pET101/D-TOPO® คือ NS1 – T7 – R



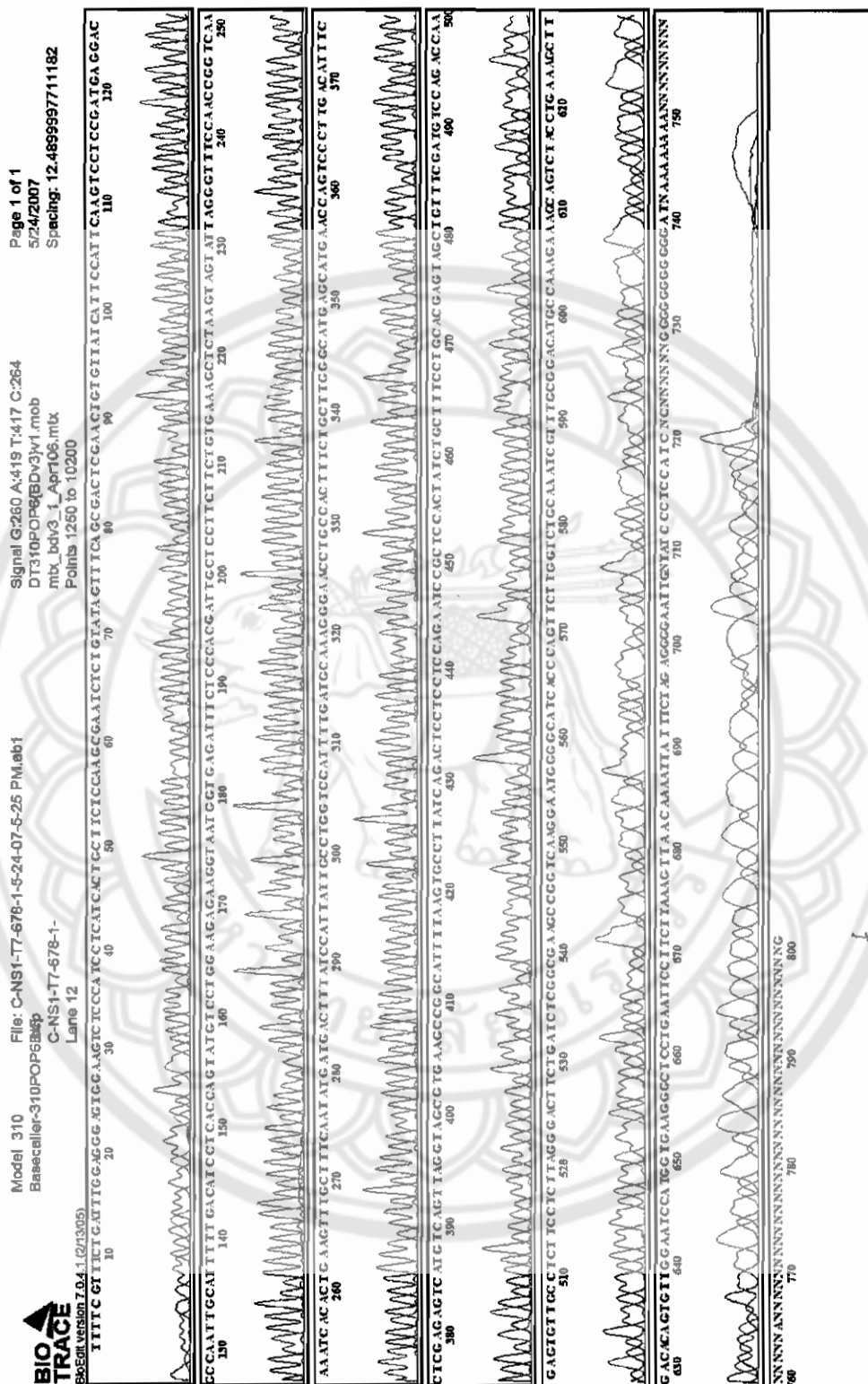
ภาพ 21 แสดงโครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อยีน NS1 คือ NS1 - F - CACC



ภาพ 22 แสดงโครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อยีน NS1 คือ NS1 – R - 320



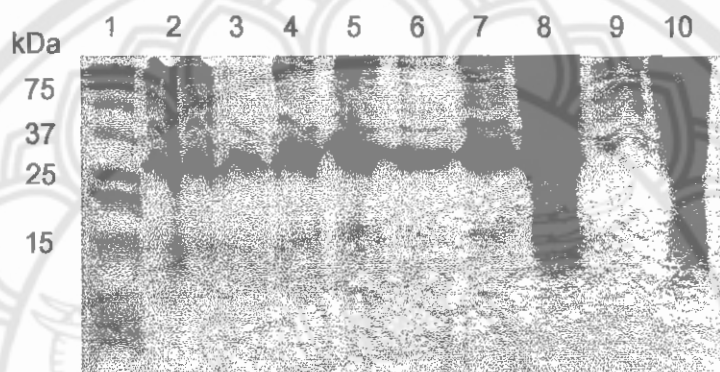
ภาพ 23 แสดงโครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อยีน NS1 คือ NS1 – F - 503



ภาพ 24 แสดงโครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อยีน NS1 คือ NS1 – R - 678

การศึกษาการแสดงออกของยีน NS1 ใน *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3)

เมื่อโคลน recombinant plasmid NS1 เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) และชักนำให้ผลิตโปรตีนด้วย IPTG ที่มีความเข้มข้น 0.5 mM ได้มีการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่มีการผลิตโปรตีน NS1 ออกมาและนำ pellet ที่ได้ในแต่ละชั่วโมงมาตรวจสอบขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE โดยเปรียบเทียบกับ pellet ของ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) ที่ไม่มีการชักนำให้ผลิตโปรตีน พบว่า มีโปรตีนขนาดประมาณ 30 kDa และจากภาพ 25 พบว่า มีขนาดของโปรตีน

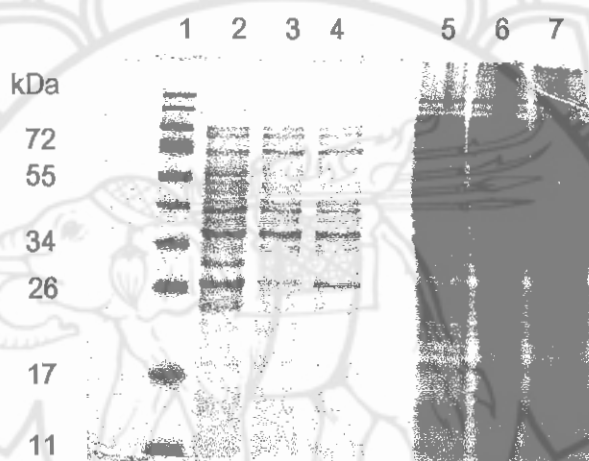


ภาพ 25 แสดงการ expression protein NS1 ในแต่ละชั่วโมง โดย lane 1 Protein marker, lane 2 supernatant ของ *E.coli* ที่ไม่ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ด้วย 0.5 mM IPTG, lane 3 supernatant ของ *E.coli* ที่ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ด้วย 0.5 mM IPTG ในชั่วโมงที่ 1, lane 4 supernatant ของ *E.coli* ที่ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ด้วย 0.5 mM IPTG ชั่วโมงที่ 2, lane 5 supernatant ของ *E.coli* ที่ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ด้วย 0.5 mM IPTG ชั่วโมงที่ 3, lane 6 supernatant ของ *E.coli* ที่ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ด้วย 0.5 mM IPTG ชั่วโมงที่ 4, lane 7 supernatant ของ *E.coli* ที่ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ด้วย 0.5 mM IPTG ชั่วโมงที่ 5, lane 8 supernatant ของ *E.coli* ที่ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ด้วย 0.5 mM IPTG ชั่วโมงที่ 6, lane 9 supernatant ของ *E.coli* BL21 Star™ (DE3) ชั่วโมงที่ 6, lane 10 ของ Pellet *E.coli* BL21 Star™ (DE3) ชั่วโมงที่ 6

ที่หนาและมีขนาดที่ใกล้เคียงกับโปรตีน NS1 ประมาณ 26.8 kDa ส่วน tag มีน้ำหนัก 5 kDa เมื่อรวมกันทำให้มีน้ำหนักประมาณ 29.8 ถึง 31.8 kDa และพบว่าช่วงเวลาในชั่วโมงที่ 5 เป็นเวลาที่มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 เหมาะที่สุด และเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเก็บเซลล์เพื่อนำเซลล์ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้โปรตีน NS1 บริสุทธิ์และยืนยันโปรตีน NS1 ด้วย วิธี Western Blot

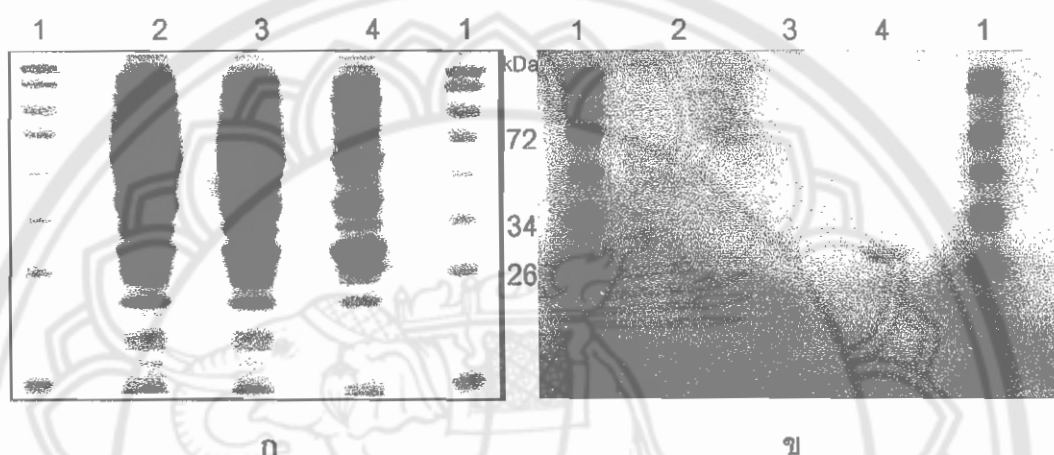
เมื่อทราบว่า recombinant protein NS1 อยู่ในส่วนที่เป็น pellet ของ *E.coli* จึงได้นำ pellet มาละลายด้วย Buffer B ที่มีส่วนผสมของ 8M Urea ทำการปั่นแยกได้เป็น 2 ส่วน คือ pellet และ supernatant จากนั้นจึงได้นำทั้งสองส่วนมาดูขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ดังภาพ 26 ใน lane 1,2 และ 3 ซึ่ง lane 1 เป็นโปรตีนของ supernatant ของ *E.coli* BL21 Star™ (DE3) ที่ไม่มีการโคลนยีน NS1, Lane 2 เป็นโปรตีนของ supernatant ของ *E.coli* BL21 Star™ (DE3) ที่มีการ



ภาพ 26 แสดงการละลายของ pellet ของ *E.coli* ที่สามารถละลายเป็น supernatant ได้ใน beffer B ของ Ni-NTA Spin kit (Qiagen) โดย lane 1 Protein marker, lane 2 supernatant ของ BL21 Star™ (DE3), lane 3 supernatant ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 แต่ไม่ induce ที่ละลายใน buffer B, lane 4 supernatant ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce ที่ละลายใน buffer B ,lane 5 pellet ของ BL21 Star™ (DE3), lane 6 Pellet ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 แต่ไม่ induce ที่ละลายใน buffer B, lane 7 คือ pellet ของ *E.col* ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce ที่ละลายใน buffer B

โคลนยีน NS1 แต่ไม่มีการ induce, lane 3 เป็นโปรตีนของ supernatant ของ *E.coli* BL21 Star™ (DE3) ที่มีการโคลนยีน NS1 มีการ induce ให้ผลิต recombinant protein NS1 ทั้ง 3 lane มีโปรตีนขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 26 kDa ใน lane 4,5,และ 6 ที่เป็น pellet ไม่พบโปรตีนขนาด 26 kDa ดังภาพ 26 ฉะนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ recombinant protein NS1 ใน lane 3 จึงนำเอา supernatant ของทั้ง 3 lane มาดูขนาดโปรตีนอีกครั้งด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งได้ผลดังภาพ 27 ก

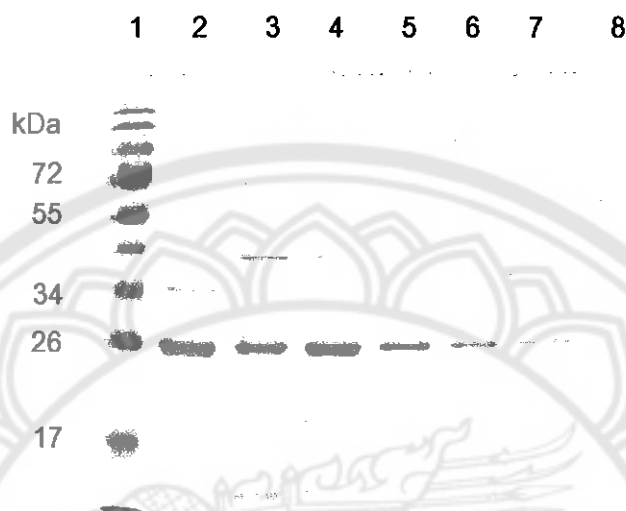
เป็นภาพของ supernatant ของ *E.coli* ทั้ง 3 ที่มีขนาดโปรตีนใกล้เคียงกันและมีขนาดประมาณ 26 kDa จากนั้นนำ gel นี้ทำ Western Blot ดังภาพ 27 ข ซึ่งพบ band ขนาดประมาณ 26 kDa ใน lane 3 แสดงว่า *E.coli* BL21 Star™ (DE3) ที่มีการโคลนยีน NS1 มีการ induce ให้ผลิต recombinant protein NS1 สามารถผลิต recombinant protein NS1 ได้ ส่วนอีก 2 lane น่าจะเป็นโปรตีนของ *E.coli* BL21 Star™ (DE3) และ recombinant protein NS1 นี้มีส่วนของ



ภาพ 27 แสดงการพิสูจน์ supernatant ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ที่ละลายใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen) lane 1 Protein Marker lane 2 supernatant ของ BL21 Star™ (DE3), lane 3 supernatant ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 แต่ไม่ induce ที่ละลายใน buffer B, lane 4 supernatant ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce ที่ละลายใน buffer B ซึ่งภาพ ก เป็นภาพก่อนยืนยันโปรตีน NS1 ด้วยวิธี Western Blot ภาพ ข เป็นภาพยืนยันโปรตีน NS1 ด้วยวิธี Western Blot

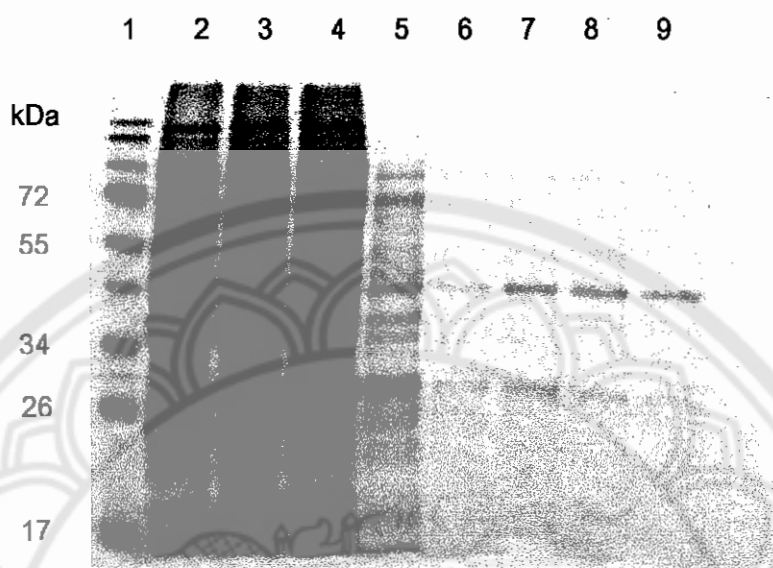
polyhistidine tag อยู่ที่ C-terminal ซึ่งได้ใช้ส่วนนี้ในการตรวจโปรตีนที่สงสัยด้วย Western Blot โดยใช้ Anti-His(C-term) Antibody ที่เป็น mouse monoclonal IgG antibody ซึ่งเป็น 1° Antibody จับกับ polyhistidine tag จากนั้นจะมี 2° Antibody คือ AntiHis(C-term)-HRP Antibody จับ 1° Antibody ต่อแล้วใช้ TMB ที่เป็น substrate ย่อย HRP ทำให้เกิดเป็นสีเขียวที่ recombinant protein NS1 ใน lane 3 ฉะนั้น supernatant ของ *E.coli* BL21 Star™ (DE3) ที่มีการโคลนยีน NS1 มีการ induce ให้ผลิต recombinant protein NS1 นี้สามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อได้โดยอาศัย polyhistidine tag อยู่ที่ C-terminal จับกับ Ni-NTA resin ของ Ni-NTA Spin kit ดังภาพ 28 มีโปรตีนขนาดประมาณ 26 kDa ทุก lane โดย lane 1 – 3 เป็น supernatant ของ

E.coli BL21 Star™ (DE3) ที่มีการโคลนยีน NS1 และ induce ให้ผลิต recombinant protein NS1 ที่มีการพิสูจน์ว่าเป็น recombinant protein NS1 จริง, lane 4 เป็น supernatant ของ



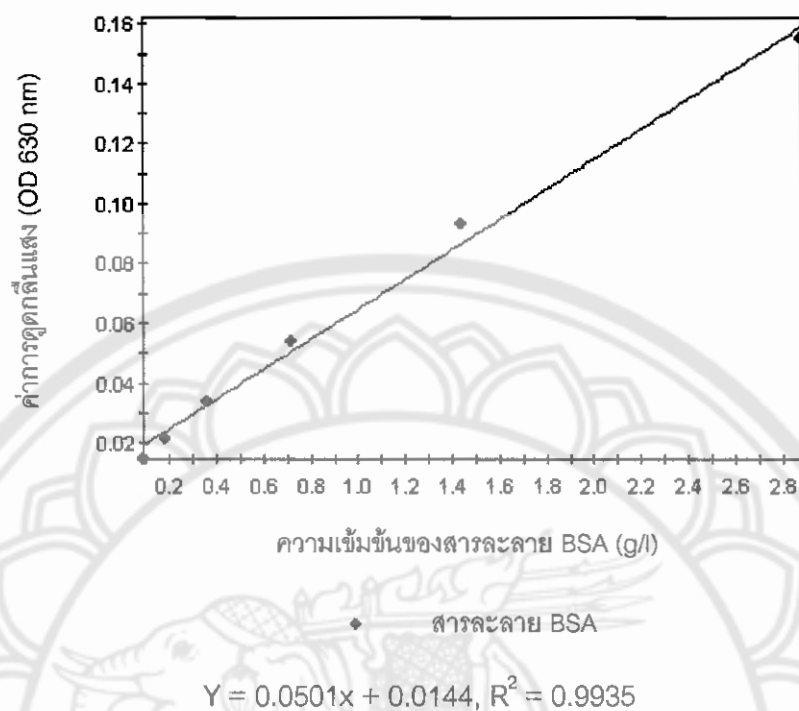
ภาพ 28 แสดงการ purification ของ supernatant ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce ที่ละลายใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen) ซึ่ง lane 1 คือ Protein marker, lane 1-3 supernatant *E.coli* ที่โคลน ยีน NS1 และมีการ induce ที่ละลาย ใน buffer B, lane 4 flow-through, lane 5 wash, lane 6 – 7 fusion protein หรือ recombinant protein NS1

flow-through, lane 5 เป็นการ wash เมื่อ polyhistidine tag จับกับ resin แล้วจะมีการชะเอาสิ่งต่างๆ ออกจาก column ซึ่งถือว่าการ wash และจากภาพพบโปรตีนของ supernatant นี้ ออกมาเป็นโปรตีนขนาดเดียวที่ไม่มี nonspecific ซึ่งโปรตีนนี้อาจเป็น recombinant protein NS1 หรือโปรตีนของ *E.coli* BL21 Star™ (DE3) จึงได้ทำการพิสูจน์โดยใช้วิธี Western Blot ซึ่งถ้าโปรตีนนี้เป็น recombinant protein NS1 ส่วน polyhistidine tag ที่อยู่ด้าน C-terminal จะสามารถจับกับ 1° Antibody และ 2° Antibody และ HRP จะถูกย่อยด้วย TMB ทำให้เกิดสีเขียวที่โปรตีนและเมื่อทำการพิสูจน์พบว่า โปรตีนของ supernatant ของการ wash ไม่มีการเกิดสีดังภาพ 32 ฉะนั้น lane 5 ของภาพ 28 จึงไม่ใช่ recombinant protein NS1 แต่อาจเป็นโปรตีนของ *E.coli* BL21 Star™ (DE3) สำหรับ lane 6,7 เป็น lane ที่มีการ Elute โดยใช้ Buffer E pH 4.5 เอา recombinant protein NS1 ออกจาก resin ที่อยู่ใน column ซึ่งโปรตีนที่ได้นี้นำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry assay ซึ่งใช้ DC Protein Assay (BioRad) โดยใช้ BSA เป็นสารละลาย



ภาพ 29 แสดงการ purification ของ supernatant ที่เก็บไว้ 1 วัน ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce protein NS1 ที่ละลายใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen) ซึ่ง lane 1 Protein marker, lane 2 supernatant *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 และไม่มีการ induce ที่ละลายใน buffer B, lane 3 supernatant *E.coli* โคลน ยีน NS1 และมีการ induce ที่ละลายใน buffer B, lane 4 flow-through, lane 5 - 6 wash, lane 7 – 9 fusion protein หรือ recombinant protein NS1

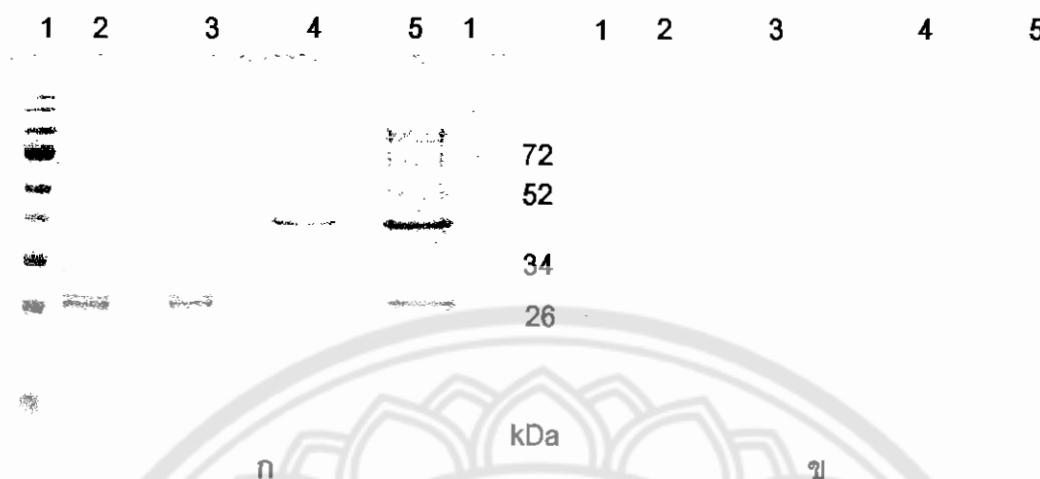
โปรตีนมาตรฐาน ตามภาพ 30 และปริมาณสารละลาย recombinant protein NS1 ในส่วน Elute มีความเข้มข้นประมาณ 0.15 mg/ml ดังแสดงในตาราง 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าใน pellet ของ *E.coli* ที่มีการโคลนยีน NS1 และ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ปริมาตร 10 ml และนำมาที่ละลายใน buffer B ปริมาณ 1 ml มีความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน NS1 0.15 mg



ภาพ 30 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BSA โดยวิธี microplate assay

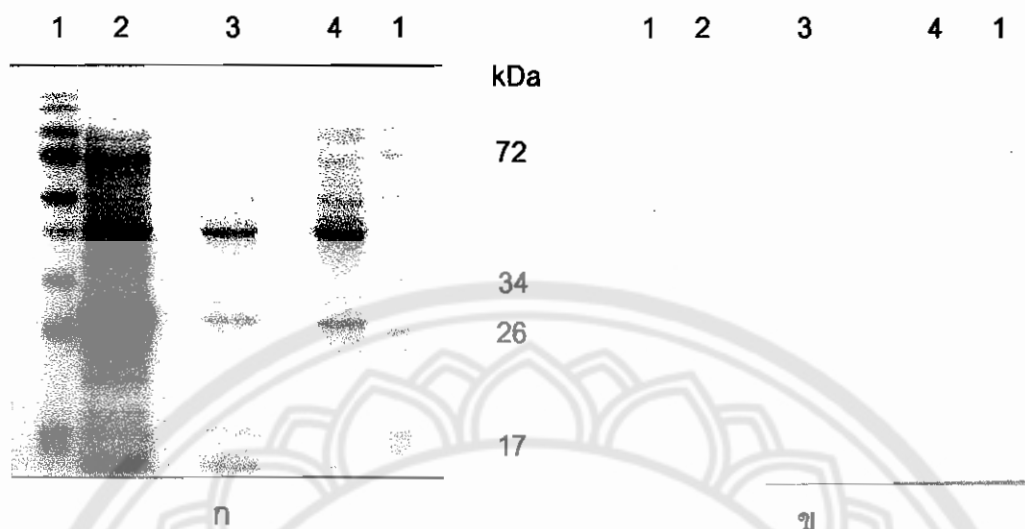
ตาราง 4 แสดงค่าความเข้มข้นของ recombinant protein NS1 ในช่วงต่างๆที่ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

โปรตีนในช่วงต่างๆ	ความเข้มข้น (mg/ml)
Lysis	2.15
Flow-through	0.58
Wash	0.29
Elute 1	0.15
Elute 2	0.14



ภาพ 31 แสดงการ purification ของ supernatant ที่เก็บไว้ 2 วัน ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce protein NS1 ที่ละลายใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen) ซึ่ง lane 1 Protein marker, lane 2 supernatant *E.coli* ที่โคลน ยีน NS1 และมีการ induce ที่ละลายใน buffer B, lane 3 flow-through, lane 4 wash, lane 5 fusion protein หรือ recombinant protein NS1,
 ภาพ ก เป็นภาพก่อนยีนย่นโปรตีน NS1 ด้วยวิธี Western Blot
 ภาพ ข เป็นภาพยีนย่นโปรตีน NS1 ด้วยวิธี Western Blot

จากนั้นได้ทดลองนำเอา supernatant ที่เก็บ -80°C เป็นเวลา 1 ค่ำ มาทำให้บริสุทธิ์ เพื่อทดสอบสภาพของโปรตีนจะสามารถเก็บไว้ได้นานเพียงใด จากภาพ 29 พบโปรตีนขนาดประมาณ 26 kDa ใน supernatant ที่ผ่านการ elute จึงทำการพิสูจน์โดย western blot เพื่อดูว่า โปรตีนที่พบขนาดประมาณ 26 kDa เป็นโปรตีน NS1 จริง ผลที่ทำการพิสูจน์ดังภาพ 31 ซึ่งแสดงว่า โปรตีนที่พบขนาดประมาณ 26 kDa ใน supernatant ที่ผ่านการ elute เป็นโปรตีน NS1 จริง



ภาพ 32 แสดงการพิสูจน์ supernatant ในขั้นตอน Wash ของ purification supernatant ของ *E.coli* ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce protein NS1 ที่ละลายใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen) โดย lane 1 Protein marker, lane 2 supernatant *E.coli* ที่โคลน ยีน NS1 และมีการ induce ที่ละลายใน buffer B, ช่อง 3 wash, ช่อง 4 fusion protein หรือ recombinant protein NS1

ภาพ ก เป็นภาพก่อนยืนยันโปรตีน NS1 ด้วยวิธี Western Blot

ภาพ ข เป็นภาพยืนยันโปรตีน NS1 ด้วยวิธี Western Blot

จากนั้นทดลองได้นำ supernatant ที่เก็บ -80°C เป็นเวลา 2 คืน มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีโปรตีน NS1 ขนาด 26 kDa และโปรตีนของ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) ที่ขนาดต่างๆ ดังภาพ 32 และเมื่อนำมาพิสูจน์ด้วย Western Blot พบว่า โปรตีนขนาด 26 kDa เป็นโปรตีน NS1 จริง