

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
สมมุติฐานของการวิจัย.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
Influenza A viruses.....	3
ลักษณะโครงสร้างของ Influenza A viruses.....	3
วงจรชีวิตของ Influenza A viruses.....	8
โปรตีน NS1 หรือ Nonstructural 1 Protein.....	10
การระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....	14
ระยะฟักตัว.....	18
การควบคุมและป้องกันโรค.....	19
วัคซีนสำหรับป้องกันโรคไข้หวัดนก.....	24
การแยกแตกต่างของสัตว์ที่ติดเชื้อจากสัตว์ที่ถูกฉีดวัคซีน (Differentiating Infected from Vaccinated Animals : DIVA).....	26
การตรวจวินิจฉัยโรค.....	27
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	30
ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	30
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	30
วิธีการวิจัย.....	30
การสกัด recombinant plasmid NS1 จาก TOPO plasmid vector (Extraction of recombinant plasmid).....	32

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ NS1 (Polymerase Chain Reaction : PCR).....	32
การตรวจยืนยันขนาดของ PCR Product ด้วยวิธี agarose gel Electrophoresis (Electrophoresis).....	33
การทำให้ PCR Product บริสุทธิ์.....	33
ปฏิกิริยาการวิเคราะห์หาลำดับเบสดีเอ็นเอ (DNA sequencing).....	33
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	35
การโคลนยีน NS1 เข้าสู่เซลล์ <i>E.coli</i> TOP10 F' (Cloning and Transformation in <i>E.coli</i> TOP10 F').....	35
การตรวจสอบ recombinant plasmid NS1.....	36
การโคลน recombinant plasmid NS1 เข้าสู่เซลล์ <i>E.coli</i> BL21 Star™ (DE3).....	36
การแสดงออกของยีน NS1 ใน <i>E.coli</i> BL21 Star™ (DE3).....	37
การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	37
การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์.....	37
การทำ Western Blot.....	38
การวัดปริมาณโปรตีน NS1	38
4 ผลการวิจัย.....	40
การวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน NS1 ด้วยโปรแกรม BIOEDIT (version 7.0.4.1).....	40
การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน NS1 ด้วยเทคนิค PCR.....	41
การตรวจสอบทิศทางของยีน NS1 ด้วยวิธี PCR และการศึกษาลำดับเบส นิวคลีโอไทด์ หลังจากทำการโคลนยีน NS1 เข้าสู่ <i>E.coli</i> TOP10F'.....	42
การศึกษาการแสดงออกของยีน NS1 ใน <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21 Star™(DE3).....	51

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้โปรตีน NS1 บริสุทธิ์และยืนยันโปรตีน NS1 ด้วย วิธี Western Blot.....	52
5 บทสรุป.....	59
สรุปผลการวิจัย.....	59
อภิปรายผล.....	59
ข้อเสนอแนะ.....	66
บรรณานุกรม.....	68
ภาคผนวก.....	75
ประวัติผู้วิจัย.....	85

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงตัวเลขของ genome ของ Influenza A viruses (A/Puerto Rico/8/34).....	5
2 แสดง primer สำหรับเพิ่มปริมาณยีน NS1.....	33
3 แสดง specific primer สำหรับเวคเตอร์ และ recombinant plasmid NS1.....	34
4 แสดงค่าความเข้มข้นของ recombinant protein NS1 ในช่วงต่างๆที่ทำให้ โปรตีนบริสุทธิ์.....	56



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 ส่วนประกอบ ribonucleoproteins core (RNPs).....	4
2 รูปร่างของเชื้อ avian influenza virus	6
3 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....	9
4 การเกิด antigenic shift.....	10
5 ส่วนประกอบต่างๆของโปรตีน NS1	11
6 การแสดงหน้าที่ต่างๆตามส่วนประกอบของโปรตีน NS1.....	12
7 การทำงานในหน้าที่ต่างๆของ NS1 ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ.....	13
8 โครงสร้างของ NS1 1-73.....	14
9 อาการของสัตว์ป่วย.....	18
10 อวัยวะของสัตว์ที่ตาย.....	19
11 ขั้นตอนการวิจัยโดยภาพรวม.....	31
12 ส่วนที่เป็น overhang ด้านปลาย 5' และตำแหน่งที่ Topoisomerase I เกาะกับ เวกเตอร์ pET101/D-TOPO®	36
13 บริเวณต่างๆของเวกเตอร์ pET101/D TOPO®	36
14 กราฟ Amino Acid Composition ของกรดอะมิโนของโปรตีน NS1.....	40
15 กราฟ Mean Hydrophobicity ของกรดอะมิโนของโปรตีน NS1.....	41
16 ขนาดของ ยีน NS1 ของ A/little grebe/Thailand/Phichit-01/2004 (H5N1) ด้วยเทคนิค PCR.....	41
17 ขนาดของยีน NS1 และ recombinant plasmid NS1 ของทั้ง 4 โคโลนี หลังจาก โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET101/D-TOPO®	42
18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 ที่เข้าสู่เวกเตอร์และลำดับกรดอะมิโนของยีน NS1 โดยเริ่มจากเมไทโอนีน.....	44
19 โครมาโดแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อ เวกเตอร์ pET101/D-TOPO® คือ NS1 – T7 – F.....	45
20 โครมาโดแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อ เวกเตอร์ pET101/D-TOPO® คือ NS1 – T7 – R.....	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
21 โครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อ ยีน NS1 คือ NS1 – F – CACC.....	47
22 โครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อ ยีน NS1 คือ NS1 – R – 320.....	48
23 โครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อยีน NS1 คือ NS1 – F – 503.....	49
24 โครมาโตแกรมของ recombinant plasmid NS1 ซึ่งใช้ primer ที่เฉพาะต่อยีน NS1 คือ NS1 –R – 678.....	50
25 การ expression protein NS1 ในแต่ละชั่วโมง.....	51
26 การละลายของ pellet ของ <i>E.coli</i> ที่สามารถละลายเป็น supernatant ได้ ใน beffer B ของ Ni-NTA Spin kit (Qiagen).....	52
27 การพิสูจน์ supernatant ของ <i>E.coli</i> ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce ให้ผลิตโปรตีน NS1 ที่ละลายใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen).....	53
28 การ purification ของ supernatant ของ <i>E.coli</i> ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce ที่ละลายใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen).....	54
29 การ purification ของ supernatant ที่เก็บไว้ 1 วัน ของ <i>E.coli</i> ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce protein NS1 ที่ละลายใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen).....	55
30 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BSA โดยวิธี microplate assay.....	56
31 แสดงการ purification ของ supernatant ที่เก็บไว้ 2 วัน ของ <i>E.coli</i> ที่โคลนยีน NS1 และมีการ induce protein NS1 ที่ละลาย ใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen).....	57
32 แสดงการพิสูจน์ supernatant ในขั้นตอน Wash ของ purification supernatant ของ <i>E.coli</i> ที่ โคลนยีน NS1 และมีการ induce protein NS1 ที่ละลายใน buffer B ด้วย Ni-NTA Spin kit (Qiagen).....	58

อักษรย่อ

HPAI	=	Highly Pathogenic Avian Influenza
LPAI	=	Low Pathogenic Avian Influenza
H or HA	=	Haemagglutinin
N or NA	=	Neuraminidase
PB2	=	Polymerase basic protein 1
PB1	=	Polymerase basic protein 2
PA	=	Polymerase acidic protein
NP	=	Nucleoprotein
M	=	Matrix protein
NS	=	Nonstructural protein
DIVA	=	Differentiation Infected from Vaccinated Animal
DNA	=	กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก หรือ Deoxyribonucleic acid
RNA	=	กรดไรโบนิวคลีอิก หรือ Ribonucleic acid
ul	=	ไมโครลิตร
uM	=	ไมโครโมลาร์
ug/ml	=	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ml	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
mg	=	มิลลิกรัม
g	=	กรัม
M	=	โมลาร์
°C	=	องศาเซลเซียส
bp	=	คู่เบส
kDa	=	kilodalton
IPTG	=	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	=	Polymerase Chain Reaction

อักษรย่อ (ต่อ)

E.coli = *Escherichia coli*

% = เปอร์เซนต์

