

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การรวบรวมตัวอย่าง เซอร์โคไวรัสจากฟาร์มและห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและอวัยวะหรือชิ้นเนื้อของสุกรที่สงสัย เช่น ต่อม น้ำเหลือง เป็นต้น จากฟาร์มสุกร ดังในตารางที่ 1 ซึ่งภายหลังจากได้ตัวอย่างเลือด ทำการปั่นแยกเพื่อเก็บตัวอย่าง ซีรัม (serum) และตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บ เช่น ต่อม น้ำเหลือง นำไปบดให้ละเอียดและทำการบีบคั้นเอาน้ำจาก ตัวอย่างชิ้นเนื้อดังกล่าว หลังจากนั้นทำการเก็บรักษาตัวอย่างในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอ การทดสอบการตรวจต่อไป

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปและสถานที่ตั้งของฟาร์มสุกรที่ดำเนินการศึกษา

ฟาร์ม	ประเภทฟาร์ม ¹	ขนาดฟาร์ม ²	จังหวัด	ชนิดของตัวอย่างที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง
1	Integrate	800	ราชบุรี	ตัวอย่างเลือด	10
2	Integrate	1,000	ราชบุรี	ตัวอย่างเลือด	10
3	Integrate	1,000	ราชบุรี	ตัวอย่างเลือด	10
4	Integrate	2,400	ราชบุรี	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10
5	Integrate	3,000	ราชบุรี	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10
6	Integrate	1,600	นครปฐม	ตัวอย่างเลือด	10
7	Integrate	4,000	นครปฐม	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10
8	Integrate	500	สระบุรี	ตัวอย่างเลือด	5
9	Integrate	2,000	สระบุรี	ตัวอย่างเลือด	10
10	Integrate	4,000	นครราชสีมา	ตัวอย่างเลือด	10
11	Integrate	5,000	นครราชสีมา	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10
12	Integrate	2,000	ชลบุรี	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10
13	Integrate	3,000	ชลบุรี	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10
14	Integrate	5,000	นครนายก	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10
15	Integrate	500	สิงห์บุรี	ตัวอย่างเลือด	5
16	Integrate	1,000	สิงห์บุรี	ตัวอย่างเลือด	10
17	Integrate	2,000	สิงห์บุรี	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10
18	Breeder	2,000	ชลบุรี	ตัวอย่างเลือด	10
19	Breeder	2,400	ราชบุรี	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10
20	Fattening	10,000	อยุธยา	ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ	10

หมายเหตุ

¹ Integrate ฟาร์มที่มีการเลี้ยงแบบครบวงจร ตั้งแต่พ่อ-แม่พันธุ์ จนถึงสุกรขุน
Breeder ฟาร์มที่มีการเลี้ยงเฉพาะพ่อ-แม่พันธุ์ แล้วทำการขายลูกสุกรอนุบาล
Fattening ฟาร์มที่มีการเลี้ยงเฉพาะสุกรขุน

² ขนาดฟาร์ม คิดจากจำนวนประชากรของสุกรที่อยู่ในช่วงของการให้ผลผลิต

2. การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ORF2

ผลการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ORF2 จากเชื้อเซอร์โคไวรัส 24 สายพันธุ์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีนดังกล่าว มีตำแหน่งของบริเวณแปรผันในลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับบริเวณ hot spot ทั้งหมด 9 บริเวณอ้างอิงกับสายพันธุ์ P710 ได้แก่ บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 62-110 131-165 193-227 249-263 278-296 301-315 334-353 376-388 และ 510-536 ขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอื่นมีความคล้ายกัน (บริเวณสีแดง) ความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในการเปรียบเทียบภาพรวมเป็นดังภาพที่ 1 และตารางที่ 2

```

1) FJ905468 ---TTAGGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
2) EU450595 ---TTAGGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
3) EF210106 ---TTAAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
4) HM009333 ---TTAAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
5) EF524533 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
6) EF524526 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
7) AY864814 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
8) HQ591380 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
9) GX000841 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
10) GU370063 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
11) EF675236 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
12) AF055392 -----TTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 51
13) AF408635 ---TTAGGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
14) EU057189 ---TTAGGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
15) EF394774 ---TTAGGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
16) FJ948167 ---TTAGGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
17) FJ870968 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
18) EF452353 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
19) EU057188 ---TTAGGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
20) EU057186 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
21) GQ404853 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAAATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
22) GQ359003 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
23) DQ915588 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
24) DQ870484 ---TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 57
25) EU302141 TCACCTTAGGGTGAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 60
26) EU148505 TCACCTTAGGGTGAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAATTCCTGAATTGTACATACATGGT 60

```

* * * * *

```

FJ905468 TACACGGATATTGTATTCTGGTTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EU450595 TACACGGATATTGTATTCTGGTTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EF210106 TACACGGATATTGTATTCTGGTTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCTGAGGCCTAC 117
HM009333 TACACGGATATTGTATTCTGGTTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EF524533 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EF524526 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
AY864814 TACACGGATATTATAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
HQ591380 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
GX000841 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
GU370063 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EF675236 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
AF055392 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 111
AF408635 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EU057189 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EF394774 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EJ948167 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
FJ870968 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EF452353 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATATACTGTTTTCGAAGGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EU057188 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EU057186 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
GQ404853 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
GQ359003 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
DQ915588 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
DQ870484 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATTTACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 117
EU302141 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 120
EU148505 TACACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTAC 120

```

* * * * *

ภาพที่ 1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากต้นเห็ดตัวอย่างในส่วนของยีนORF2 ของเชื้อเซอร์โคไวรัส ลำดับของรายการได้ระบุนหมายเลขจาก 1 ถึง 26 เฉพาะในแถวแรกเท่านั้น

FJ905468 ATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTTGGACTGTGGTTCGCTTGATAGT 537
 EU450595 ATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTTGGACTGTGGTTCGCTTGATAGT 537
 EF210106 ATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTTGGACTGTGGTTCGCTTGATAGT 537
 HM009333 ATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTTGGACTGTGGTTCGCTTGATAGT 537
 EF524533 ATTGAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 EF524526 ATTGAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 AY864814 ATTAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 HQ591380 ATTAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 GX000841 ATTAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 GU370063 ATTAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 EF675236 ATTAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 AF055392 TTTAAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 531
 AF408635 TTTAAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 EU057189 CTTAAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 EF394774 CTTAAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 FJ948167 CTTAAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 FJ870968 ATTAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTCTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 EF452353 ATTAATCTCAGCATGTCTACCGCCAGGAGGGCGTTCTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 EU057188 ATTAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 EU057186 TTTAAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTGCAGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 GQ404853 ATTAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 GQ359003 ATTAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 DQ915588 ATTAATCTCAGCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 DQ870484 ATTAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTGTGACTGTGGTAGCCTTAACAGT 537
 EU302141 ATTAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTCTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 540
 EU148505 ATTAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGTGGTAGACCTGTGAGGCATTAACGGT 540
 ** .***** ***** ***** .***** * :*** * : .** .**

FJ905468 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 EU450595 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 EF210106 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 HM009333 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCATCGGTA 597
 EF524533 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAAATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 EF524526 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGCTGTGAAAATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 AY864814 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGCTGTGAAAATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 HQ591380 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGCTGTGAAAATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 GX000841 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGCTGTGAAAATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 GU370063 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGCTGTGAAAATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 EF675236 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGCTGTGAAAATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 AF055392 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAACGGTA 591
 AF408635 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAACGGTA 597
 EU057189 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAACGGTA 597
 EF394774 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAACGGTA 597
 FJ948167 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCAGTTTTCCTTCTCCAACGGTA 597
 FJ870968 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAACGGTA 597
 EF452353 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAACGGTA 597
 EU057188 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAACGGTA 597
 EU057186 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGCGTTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 GQ404853 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGCGTTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 GQ359003 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGCGTTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 DQ915588 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGCGTTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 DQ870484 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGCGTTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 597
 EU302141 ATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTA 600
 EU148505 ATAAACAAAGGAGCGGGAGAGGCGGGCATTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAACGGTA 600
 : .* .** :***** .***** .** ** * ***** ***** *****

ภาพที่ 1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวแทนตัวอย่างในส่วนของยีนORF2 ของเชื้อเซอร์โคไวรัส ลำดับของรายการได้ระบุหมายเลขจาก 1 ถึง 26 เฉพาะในแถวแรกเท่านั้น (ต่อ)

```

FJ905468      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EU450595      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EF210106      ACGGTGGCGGGGTGGAGGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
HM009333      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EF524533      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATATGGCCAAGATGGCTGCG 657
EF524526      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATATGGCCAAGATGGCTGCG 657
AY864814      ACGGTGGCGGGGTGGAGGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
HQ591380      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATTTGGCCAAGATGGCTGCG 657
GX000841      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATTTGGCCAAGATGGCTGCG 657
GU370063      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATTTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EF675236      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
AF055392      GCGGTGGCGGGGTGGAGGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 651
AF408635      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EU057189      GCGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EF394774      GCGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
FJ948136      GCGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATTTGGCCAAGATGGCTGCG 657
FJ870968      GCGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EF452353      GCGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EU057188      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EU057186      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
GQ404853      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
GQ359003      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
DQ915588      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
DQ870484      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 657
EU302141      ACGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCG 660
EU148505      GCGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGAGGATATGGCCAAGATGGCTGCG 660

```

***** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

FJ905468      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EU450595      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EF210106      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
HM009333      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EF524533      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EF524526      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
AY864814      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
HQ591380      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
GX000841      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
GU370063      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EF675236      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
AF055392      GGGGCGGTGTCTTCTTCTGCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 696
AF408635      GGGGCGGTGTCTTCTTCTGCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EU057189      GGGGCGGTGTCTTCTTCTGCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EF394774      GGGGCGGTCTTCTTCTGCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
FJ948136      GGGGCGGTGTCTTCTTCTGCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
FJ870968      GGGGCGGTGTCTTCTTCTGCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EF452353      GGGGCGGTGTCTTCTTCTGCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EU057188      GGGGCGGTGTCTTCTTCTGCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EU057186      GGGGCGGTGTCTTCTCCTTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
GQ404853      GGGGCGGTGTCTTCTTCTGCGGAAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
GQ359003      GGGGCGGTGTCTTCTGCTCTGCGGAAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
DQ915588      GGGGCGGTGTCTTCTGCTCTGCGGAAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
DQ870484      GGGGCGGTGTCTTCTGCTCTGCGGAAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 702
EU302141      GGGGCGGTGTCTTCTGCTCTGCGGAAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 705
EU148505      GGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT 705

```

***** ** ***** ** ***:***** ***** *****

ภาพที่ 1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวแทนตัวอย่างในส่วนของยีนORF2 ของเชื้อเซอร์โคไวรัส ลำดับของรายการได้ระบุหมายเลขจาก 1 ถึง 26 เฉพาะในแถวแรกเท่านั้น (ต่อ)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ORF2 ของเชื้อเซอร์โคไวรัส ลำดับของรายการและสายพันธุ์ของไวรัส ได้ระบุตามภาพที่ 1

[หมายเลข 1 ถึง 26] โดยเพิ่มรายละเอียด Accession No. ประกอบ และจัดความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% similarity)

Order	Accession No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	FJ905468	100	99.77	99.03	96.26	95.92	95.81	95.69	98.98	96.03	94.11	96.03	96.43	96.32	96.09	96.03	96.15	96.20	96.15	96.37	95.81	95.98	95.69	95.52	95.75	96.94	95.35
2	EU4450592		100	98.81	96.15	96.04	95.98	95.81	98.75	96.15	83.82	96.15	96.54	96.43	96.21	96.15	96.26	96.32	96.26	96.49	95.64	95.99	95.81	95.64	95.87	96.83	95.24
3	EF210106			100	96.38	95.75	95.64	95.64	98.52	95.86	94.00	95.81	96.20	95.86	95.52	95.47	95.69	95.75	95.75	95.92	95.64	95.64	95.52	95.07	95.47	97.45	95.35
4	JN660055				100	94.45	94.34	94.34	95.81	94.79	93.49	94.62	94.96	94.73	94.36	94.56	94.68	94.85	95.01	95.01	94.34	94.62	94.73	93.94	94.39	96.94	94.22
5	EF524533					100	99.26	98.86	95.47	99.26	85.69	98.86	96.77	96.77	96.38	96.43	96.54	96.71	96.66	97.05	96.88	97.22	97.17	95.92	96.94	95.47	93.94
6	EF524526					100	98.81	95.35	99.20	96.43	98.81	96.60	96.60	96.60	96.20	96.26	96.37	96.54	96.49	96.88	96.60	97.05	97.00	95.64	96.66	95.35	93.60
7	HM142900						100	95.47	99.09	85.57	98.75	96.66	96.54	96.54	96.32	96.21	96.26	96.54	96.43	96.83	96.71	97.17	97.11	95.75	96.77	95.35	93.60
8	HQ831540							100	100	95.58	93.77	95.52	95.75	95.64	95.35	95.30	95.35	95.58	95.41	95.69	95.41	95.41	95.24	95.01	95.18	96.43	95.13
9	GU001709								100	86.25	99.43	96.94	96.94	96.94	96.54	96.60	96.77	96.88	96.83	97.22	96.94	97.39	97.34	95.98	97.00	95.81	94.05
10	GU370063									100	99.32	96.89	96.89	96.94	96.21	96.21	96.32	96.54	96.49	96.88	96.60	97.28	97.22	95.87	96.88	95.75	93.94
11	EF675229										100	96.60	96.60	96.60	96.21	96.21	96.32	96.54	96.49	96.88	96.60	97.05	97.00	96.04	96.77	95.81	93.94
12	GU049340											100	96.60	96.60	96.21	96.21	96.32	96.54	96.49	96.88	96.60	97.05	97.00	96.04	96.77	95.81	93.94
13	FJ233908												100	99.43	98.98	98.98	99.20	98.98	99.05	99.03	98.07	97.85	97.56	96.32	97.34	96.15	94.22
14	EU057189													100	99.20	99.20	99.32	99.09	98.98	99.26	98.07	98.07	97.79	96.54	97.56	95.92	94.05
15	EF594774														100	99.20	99.20	98.81	98.81	99.20	97.68	97.51	97.22	95.98	97.00	95.52	93.66
16	FJ218001															100	99.20	98.92	98.92	99.20	97.73	97.68	97.39	96.15	97.17	95.75	93.83
17	FJ870968																100	99.09	99.03	99.03	98.07	98.13	97.79	96.54	97.56	95.92	93.88
18	EF452353																	100	99.03	99.03	97.85	97.85	96.21	97.34	95.98	94.05	
19	EU057188																		100	98.19	98.13	97.85	96.60	97.62	95.81	94.11	
20	EU057186																			100	98.24	97.96	96.94	98.07	95.58	94.00	
21	GQ404853																				100	99.37	98.02	99.15	95.86	93.66	
22	GO359003																					100	97.66	98.98	95.86	93.60	
23	DQ915588																						100	97.96	95.18	92.92	
24	DQ870484																							100	97.96	95.18	92.92
25	EU302141																								100	95.75	93.71
26	EU148505																									100	94.73

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์รวม แม้จะพบความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน ORF2 ของเชื้อไวรัส PCV2 อยู่ในระดับ 85.69-99.20% โดยความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ GX0602 และ XJ0901 มีความต่างกันมากที่สุด และส่วนใหญ่ความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จะอยู่ในช่วงระหว่าง 95.41-96.94% ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ยังรวมถึง สายพันธุ์ไทยที่ห้องปฏิบัติการมีข้อมูลอยู่ก่อนหน้า (ไม่แสดงข้อมูล) ผลการทดลอง (จากภาพที่ 1) ความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในลักษณะดังกล่าวสามารถนำมาใช้อ้างอิง เพื่อใช้ในการพัฒนาให้สามารถตรวจสอบไวรัสชนิดนี้ได้ และหากพิจารณาระยะห่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากนิยาม $Distance = 1 - Similarity$ แล้ว ก็จะพบว่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบ Distance Value ที่พบอยู่ในระหว่าง 3.06-4.59% ซึ่งมีค่ามากพอที่จะนำมาออกแบบวิธีการตรวจสอบ ให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ออกจากกันได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม การศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจเซอร์โคไวรัสในครั้งนี้ มุ่งเน้นการตรวจและรับรองเชื้อไวรัส PCV2 รวม เป็นหลัก ดังนั้นจึงได้สนใจบริเวณ conserve sequence เพื่อใช้อ้างอิงในขณะออกแบบชุดไพรเมอร์ในขั้นต่อไป

3. การคัดเลือกบริเวณจำเพาะและการออกแบบไพรเมอร์

ผลการออกแบบและพัฒนาไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในยีน ORF2 ของเชื้อไวรัส PCV2 ด้วยโปรแกรม Primer explorer V 4 (Fujitsu Co., Japan) ได้ชุดไพรเมอร์ที่ครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์ 6 บริเวณ ไพรเมอร์มีความจำเพาะ ได้แก่ B3 B2 B1 และ F3 F2 F1 ซึ่งแต่ละบริเวณให้คุณสมบัติทาง Thermodynamic สอดคล้องกับเงื่อนไขของปฏิกิริยา LAMP โดยเฉพาะค่า T_m ในช่วง 59.30–60.95 °C ในชุดไพรเมอร์รอบนอกและค่า T_m ที่ 64.49-64.56 °C สำหรับไพรเมอร์รอบใน ตำแหน่งของช่วงไพรเมอร์ภายในยีน Coat Protein (ORF2) อ้างอิงที่ตำแหน่งยีน อยู่ที่ 180-420 นิวคลีโอไทด์หรือ เมื่อเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ P710-1 มีความสัมพันธ์กับตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 293-519 (ภาพที่ 2 และตารางที่ 3)

PCV ORF2 gene (capsid protein)

P710-1 GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGGTCATAGG**TGAG** 297
 K48 GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGGTCATAGGTTAG 297
 ZheJiang2006 GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGGTCATAGGTTAG 297
 Farm GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGGTCATAGGTTAG 297
 GX0602 GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACGTAGGGGTCATAGGTTAG 297
 LN05 GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACGTAGGGGTCATAGGTTAG 297
 JN GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACGTAGGGGTCATAGGTTAG 297
 DE GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACGTAGGGGTCATAGGTTAG 297
 BJ0901a GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACGTAGGGGTCATAGGTTAG 297
 XJ0901 GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACGTAGGGGTCATAGGTTAG 297
 GXGG-2 GGAGAAGGGCTGGGTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACGTAGGGGTCATAGGTTAG 297
 ***** * .*****: * .*****:*

B3 B2

P710-1 **GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGAGGCCACTCCCT** 357
 K48 GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGAGGCCACTCCCT 357
 ZheJiang2006 GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGAGGCCACTCCCT 357
 Farm GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGAGGCCACTCCCT 357
 GX0602 GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGAGGCCACTCCCT 357
 LN05 GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGATGCAACTCCCT 357
 JN GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGATGCAACTCCCT 357
 DE GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGATGCAACTCCCT 357
 BJ0901a GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGATGCAACTCCCT 357
 XJ0901 GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAGATTAACAGCACAGGATGCAACTCCCT 357
 GXGG-2 GGCTGTGACTTAGTTACAAAGTTATCATCTAAATTAACAGCACAGGATGCAACTCCCT 357
 *****:*. .*****.*** ***** * .*****

B1

P710-1 GTCACCCTGGGTGATCGGGG**AGCCGGGCCAGAATTAACCGGTA**ACCTTCTTATTCTGTA 417
 K48 GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 ZheJiang2006 GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 Farm GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 GX0602 GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 LN05 GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 JN GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 DE GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 BJ0901a GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 XJ0901 GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 GXGG-2 GTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCCGGGCCAGAATTAACCGGTAACCTTCTTATTCTGTA 417
 ***** ***** .*****.*****

F1

P710-1 GTATTCAAAGGGCACAGAGAT**TGGGTTGGAGCCCTTCT**CGGGGAAGAAAGTCATTAAT 477
 K48 GTATTCAAAGGGCACAGAGATGGGTTGGAGCCCTTCTCGGGGAAGAAAGTCATTAAT 477
 ZheJiang2006 GTATTCAAAGGGCACAGAGATGGGTTGGAGCCCTTCTCGGGGAAGAAAGTCATTAAT 477
 Farm GTATTCAAAGGGCACAGAGATGGGTTGGAGCCCTTCTCGGGGAAGAAAGTCATTAAT 477
 GX0602 GTATTCAAAGGGTATAGAGATGGGTTGGTCCCTTCCCGGGGAAGAAAGTCGTCAT 477
 LN05 GTACTCAAAGGGTATAGAGATGGGTTGGTCCCTTCCCGGGGAAGAAAGTCGTCAT 477
 JN GTATTCAAAGGGTATAGAGATGGGTTGGTCCCTTCCCGGGGAAGAAAGTCGTCAT 477
 DE GTATTCAAAGGGTATAGAGATGGGTTGGTCCCTTCCCGGGGAAGAAAGTCGTCAT 477
 BJ0901a GTATTCAAAGGGTATAGAGATGGGTTGGTCCCTTCCCGGGGAAGAAAGTCGTCAT 477
 XJ0901 GTATTCAAAGGGTATAGAGATGGGTTGGTCCCTTCCCGGGGAAGAAAGTCGTCAT 477
 GXGG-2 GTATTCAAAGGGTATAGAGATGGGTTGGTCCCTTCTCGGGGAAGAAAGTCGTCAT 477
 ***** * *****: ***** ***** * ***

F2 F3

P710-1 ATTGAAT**CTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTGTGAC**TGTGGTTCGCTTGATAGT 537
 K48 ATTGAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTGTGACTGTGGTTCGCTTGATAGT 537
 ZheJiang2006 ATTGAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTGTGACTGTGGTTCGCTTGATAGT 537
 Farm ATTGAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTGTGACAGTGGTTCGCTTGATAGT 537
 GX0602 ATTGAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 LN05 ATTGAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 JN ATTAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 DE ATTAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 BJ0901a ATTAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 XJ0901 ATTAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 GXGG-2 ATTAATCTCAGCAGGTCCACGGCCCAAGAGGCCGTTTGTGACTGTGGTAGCCTTGACAGT 537
 .** *****:*****.*****.*****.***

ภาพที่ 2 การคัดลอกบริเวณจำเพาะและการออกแบบไพรเมอร์ของเชื้อไวรัส PCV 2

ตารางที่ 3 ตำแหน่งและความสัมพันธ์ของบริเวณที่เกี่ยวข้องกับไพรเมอร์และ probe สำหรับตรวจเชื้อไวรัส PCV 2

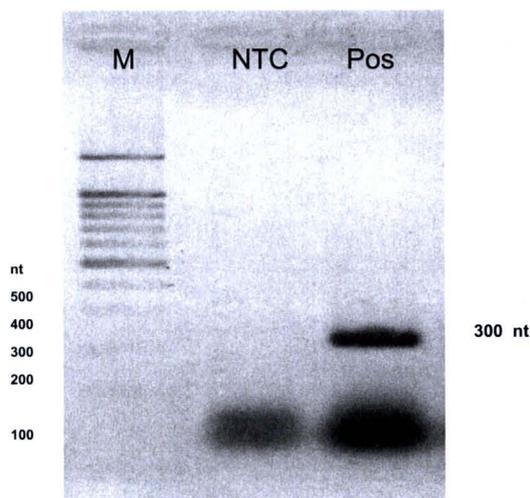
Name	Sequence 5'-3'	Position	Tm °C
B3	GGCTGTTGACTTAG	293-311	60.42
B2	AGATTAACAGCACAGGAGGC	329-348	59.30
B1	AGCCGGGCCAGAATTCAACGGT	479-400	64.56
F3	CAAGAGGCCCGTTGTGAC	502-519	60.95
F2	CTCAGCAGGTCCACGGCC	485-501	59.37
F1	ATTGGGTTGGAGCCCCTTCC	437-456	64.49
Probe	Fam-TCTTATTCTGTA	406-417	-
Quencher	ATAAGA-BHQ 1	406-411	-

ผลการตรวจสอบความจำเพาะของบริเวณที่เกี่ยวข้อง ทั้ง 6 บริเวณต่อความจำเพาะของเชื้อไวรัส PCV2 โดยการทำ Basic Local Alignment ด้วยโปรแกรม Blastn (Altschul et al., 1990) พบว่า ทั้ง 6 บริเวณที่เกี่ยวข้องมีความจำเพาะต่อยีน ORF2 ของเชื้อไวรัส PCV2 ด้วยค่า E-value = 1 Max Identity เป็น 100 % ค่าคะแนนรวมเป็น 36.2 และสอดคล้องกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย (Accession No. GU244506-507) (B3) E-value = 0.066 Max Identity เป็น 100 % ค่าคะแนนรวมเป็น 40.1 และสอดคล้องกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย (Accession No. GU244506-507) (B2) E-value = 0.006 Max Identity เป็น 100 % ค่าคะแนนรวมเป็น 44.1 (B1) E-value = 4.1 Max Identity เป็น 100 % ค่าคะแนนรวมเป็น 34.2 และสอดคล้องกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย (Accession No. GU244506-507) (F3) E-value = 1 Max Identity เป็น 100 % ค่าคะแนนรวมเป็น 36.2 (F2) และ E-value = 0.066 Max Identity เป็น 100 % ค่าคะแนนรวมเป็น 40.1-(F1) (ภาพที่ 3)

ผลการทำ Alignment ทั้ง 2 ส่วน (Basic Local Alignment และ Global Alignment) ยืนยันผลการออกแบบที่มีความจำเพาะ นอกจากนี้การตรวจสอบเบื้องต้นยังพบว่า ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ ไม่มีส่วนสัมพันธ์กับเชื้อเซอร์โคไวรัสสายพันธุ์ 1 (PCV1) (Accession No. JN398656) แต่อย่างไรก็ดี เชื้อเซอร์โคไวรัสในกลุ่มนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ เซอร์โคไวรัสสายพันธุ์ 2 เพียง 75% (Hamel et al., 1998)

4. การโคลนบริเวณของยีน ORF2 เพื่อพัฒนาเป็นดีเอ็นเอควบคุมบวก

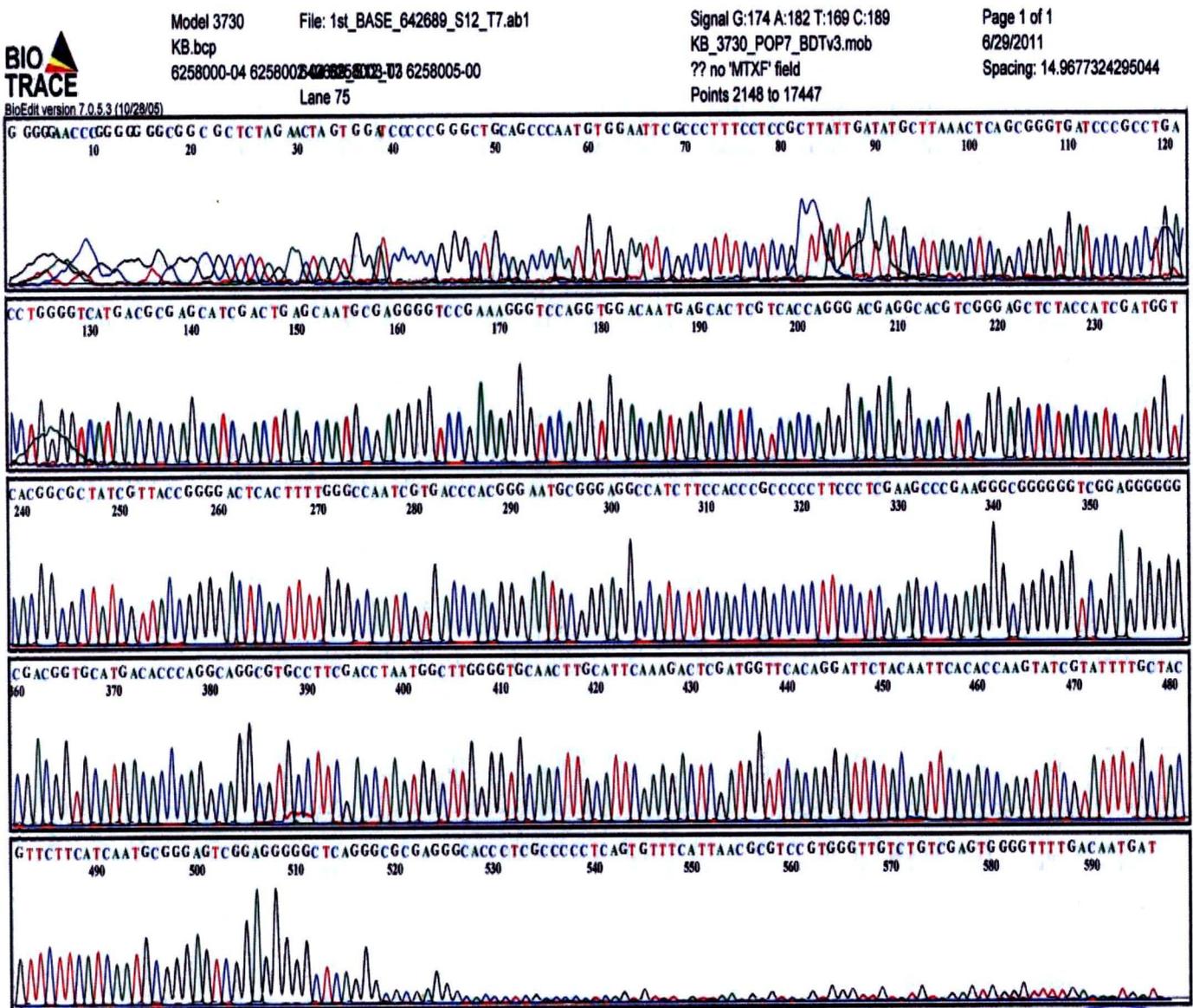
การหาภาวะที่เหมาะสมจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อ โคลนชิ้นส่วนของยีน ORF2 ดำเนินการโดยการนำไพรเมอร์ที่อยู่บริเวณภายนอกมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อเซอร์โคไวรัสอ้างอิง มาเป็นแม่แบบร่วมกับไพรเมอร์คู่นอกสุด (outer primer) พบว่า การบ่มปฏิกิริยาด้วยเงื่อนไข denature ที่ 94°C 40 วินาที annealing ที่ 55°C 40 วินาที และ extension ที่ 72°C 1 นาที ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่สั้นที่สุดที่ขนาด 226 นิวคลีโอไทด์ กล่าวคือ ให้แถบดีเอ็นเอที่คมชัด มีความเข้มซึ่งแสดงถึงระดับปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่มากและไม่มี non specific products (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ชิ้นส่วน clone ของยีนออร์ฟทูเป็นแม่แบบ (M: ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์; NTC: ตัวอย่างควบคุมลบซึ่งเป็นชุดควบคุมน้ำยาโดยไม่เติมดีเอ็นเอ; Pos: ชุดควบคุมบวก)

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอดังกล่าว เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR column แล้วโคลนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pGEM โดยวิธี TA cloning และถ่ายยีนเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ DH5 ด้วยวิธี Heat shock transformation สามารถคัดเลือก โคลนของยีนบนพื้นฐานของความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ผลการดำเนินการสามารถคัดเลือกโคลนได้ 12 โคลน การตรวจสอบยืนยัน

ผลโดยเลือกตัวแทนโคลนของ พลาสมิดมาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Dideoxy Terminator ยืนยันว่า โคลนที่คัดเลือกได้ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับจีนดีเอ็นเอเป้าหมาย และให้ similarity ถึง 100% ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ยังคงมีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ORF2 ที่ได้จากเชื้อเซอร์โคไวรัสสายพันธุ์อื่น (ภาพที่ 5)

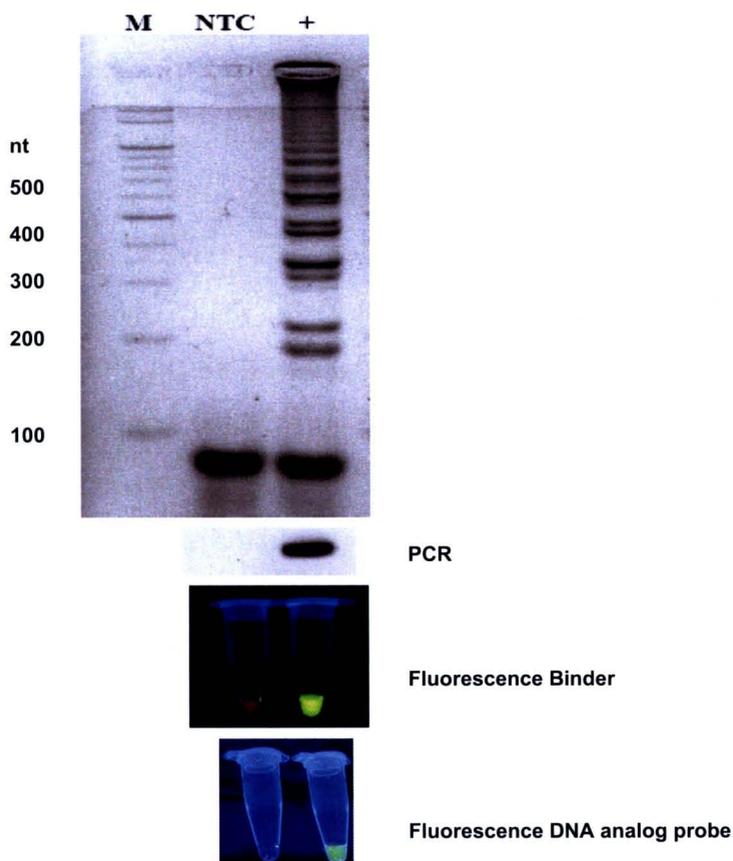


ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ORF2 ที่ได้จากการโคลนยีนเชื้อเซอร์โคไวรัสเป้าหมาย



5. การพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสัญญาณดีเอ็นเอของยีน ORF2
 ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อเซอร์โคไวรัสในขั้นตอนแรกนี้ เน้นการพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสัญญาณดีเอ็นเอของยีน ORF2 การดำเนินการอยู่บนหลักการ Loop Mediated

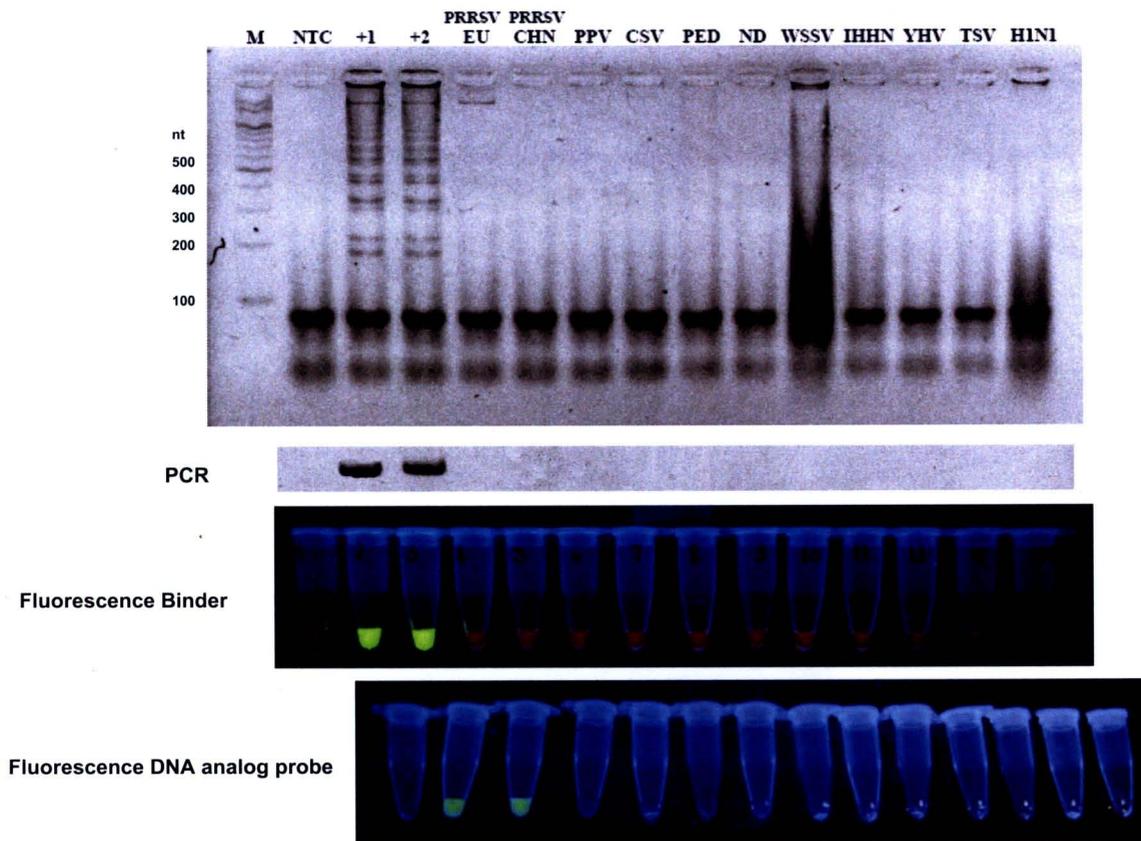
Isothermal DNA Amplification (LAMP) เป็นไปตามที่อธิบายโดย Notomi *et.al.* (2000) และเมื่อนำไพรเมอร์ทั้งคู่มาละลายในน้ำจนได้เป็นความเข้มข้นระหว่าง ไพรเมอร์รอบนอกต่อไพรเมอร์รอบใน ที่เป็นสัดส่วน 1/8 หรือเป็นความเข้มข้นจริง 5 pmol ของไพรเมอร์รอบนอกต่อ 40 pmol ของไพรเมอร์รอบใน มาทำปฏิกิริยาคัดด้วยเงื่อนไขมาตรฐาน ได้แก่ การใช้สารละลายที่ประกอบไปด้วย 40 mM Tris pH 8.8 20 mM KCl 16mM MgSO₄ 20 mM (NH₄)₂SO₄ 0.2% Tween 20 1.6 M Betaine 2.8 mM dNTP และ 8 U. *Bst* DNA polymerase ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส PCV2 โดยวิธี LAMP เมื่อป้อนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 63 °C เป็นเวลา 40 นาที พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับผลคูณของดีเอ็นเอขนาด 180/226 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งขนาดดังกล่าวสอดคล้องกับค่าคาดหวังในทางทฤษฎี (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบในการเพิ่มปริมาณสัญญาณดีเอ็นเอเลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน ntc ตัวอย่างควบคุมลบซึ่งเป็นชุดควบคุมโดยไม่เติมดีเอ็นเอ เลน+ ชุดควบคุมบวก (ภาพบน) การเปรียบเทียบผลการทดสอบเมื่อใช้ไพรเมอร์ของยีนบริเวณ ORF2 ด้วยวิธี PCR (Ouardani *et.al.*, 1999) (ภาพกลาง) ผลการทดสอบการเรืองแสงโดย DNA binder (ภาพล่าง) ผลการทดสอบการเรืองแสงโดย DNA analog probe

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลของการตรวจเชื้อไวรัส PCV2 ด้วยวิธี PCR ที่ใช้เป็นมาตรฐานโดยการตรวจสอบยีน ORF2 เช่นเดียวกัน (Ouardani *et.al.*, 1999) พบว่า ผลการตรวจให้แถบดีเอ็นเอขนาด 493 นิวคลีโอไทด์ คมชัดเพียงแถบเดียว แถบดีเอ็นเอดังกล่าว ใช้อ้างอิงผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส PCV2 ในการทดลองนี้ จากผลการทดลองพบว่า ชุดไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ผลสอดคล้องกันกับการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR ซึ่งแสดงให้เห็นในเบื้องต้นถึงความสามารถของชุดไพรเมอร์ที่ให้ผลตอบสนองต่อเชื้อไวรัส PCV2 ในส่วนของยีน ORF2 ในเบื้องต้น

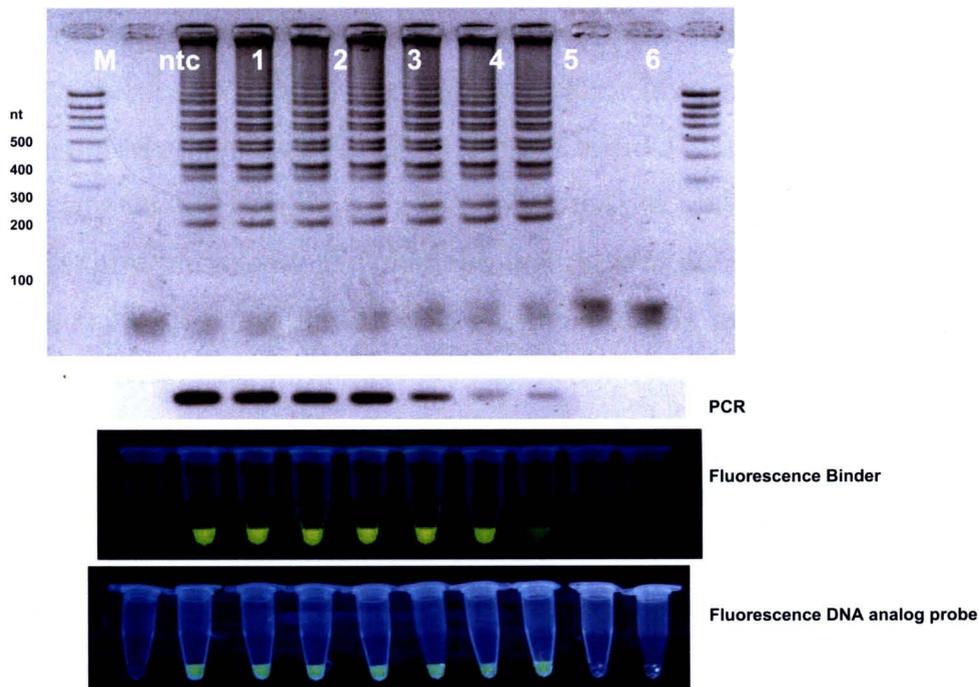
การตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาต่อเชื้อเซอร์โคไวรัสโดยการใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน ORF2 ของเชื้อไวรัส PCV2 เป็นชุดดีเอ็นเอควบคุมบวกที่ 1 เชื้อไวรัส PCV2 ตัวอย่างเป็นตัวควบคุมบวกที่ 2 และใช้ไวรัสและเชื้อต่างชนิดที่มักพบในระบบการผลิตสุกรหรือสัตว์เศรษฐกิจอื่น ได้แก่ เชื้อ PRRSV สายพันธุ์ EU และ สายพันธุ์ CHINA ที่พบระบาดในสุกรในระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 เชื้อ Porcine Parvovirus Infection (PPV) เชื้อ Classical Swine Fever (CSF) เชื้อ Porcine Epidemic Diarrhea (PED) และเชื้อที่อยู่นอกกลุ่มสุกรเพื่อการเปรียบเทียบ ได้แก่ เชื้อ Newcastle Disease (ND) ในไก่ เชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) เชื้อ Infectious Hypodermal and Hematopoietic Virus (IHHNV) เชื้อ Yellow Head Virus (YHV) เชื้อ Taura Syndrome Virus (TSV) ในกุ้ง และเชื้อ Human Influenza Virus (H1N1) เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอในการทดสอบ ผลการทดลองพบว่า ชุดไพรเมอร์ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารพันธุกรรมควบคุมบวก ทั้งในส่วนของพลาสมิดและสารพันธุกรรมของไวรัส แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมของเชื้อชนิดอื่นแต่อย่างใด (ภาพที่ 7) และผลการเพิ่มปริมาณดังกล่าวยังสอดคล้องกับผลการตรวจสอบโดยใช้ยีน ORF2 ที่รายงานโดย Ouardani *et.al.*, (1999)



ภาพที่ 7 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของชุดไพรเมอร์เมื่อใช้ตัวอย่างไวรัสและสารพันธุกรรมควบคุมบวกแบบต่างๆ เลน M ดีเอ็นเอแลคเคอร์มาร์คเกอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน ntc ชุดควบคุมน้ำยาโดยไม่เติมดีเอ็นเอ เลน +1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอควบคุมบวกจากพลาสมิด เลน +2 PCV ดีเอ็นเอ เลน EU สารพันธุกรรมจากเชื้อ PRRSV-EU; เลน CHN เชื้อ PRRSV-CHINA; เลน PPV เชื้อ Porcine Parvo Virus; เลน CSV เชื้อ Classical Swine Fever; เลน PED เชื้อ Porcine Epidemic Diarrhea; เลน ND เชื้อ Newcastle Disease; เลน WSSV เชื้อ White Spot Syndrome Virus; เลน IHNV เชื้อ Infectious Hypodermal and Hematopoietic Virus; เลน YHV เชื้อ Yellow Head Virus; เลน TSV เชื้อ Taura Syndrome Virus; และเลน H1N1 เชื้อ Human Influenza Virus (ภาพบน) ผลการทดสอบเมื่อใช้ไพรเมอร์ของยีนบริเวณ ORF2 ด้วยวิธี PCR (Ouardani *et.al.*, 1999) (รูปกลาง) ผลการทดสอบการเรืองแสงโดย DNA binder (ภาพล่าง) ผลการทดสอบการเรืองแสงโดย DNA analog probe

การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ชิ้นส่วนของยีน ORF2 ที่ทราบจำนวนก๊อปปี้ ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอควบคุมบวก พบว่า ตัววิธีและชุดไพรเมอร์ที่ใช้มีความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ 100 ก๊อปปี้ ของดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา (ภาพที่ 8) ความไวของปฏิกิริยาในระดับดังกล่าว

สอดคล้องกับความไวของปฏิกิริยาที่ดำเนินการด้วยเทคนิค PCR เมื่อใช้คู่ของไพรเมอร์ตามที่ได้ รายงานไว้ (Ouardani *et.al.*, 1999)



ภาพที่ 8 ความไวของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปในรูป limit of detection (LOD) เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบ ปริมาณ (จำนวนชุดของดีเอ็นเอ ORF2) เป็นแม่แบบ (บน) เลน M และผลเปรียบเทียบเมื่อใช้วิธีของ EU เป็นมาตรฐานในการทดสอบ (ล่าง) ดีเอ็นเอแลคเคอรั่มาร์กเกอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน ntc ชุดควบคุมน้ำยาโดยไม่เติมดีเอ็นเอ เลน 1 ชุดควบคุมบวก PCV2 ดีเอ็นเอ เลน 2-9 ดีเอ็นเอแม่แบบ ทราบจำนวนก๊อปปี้ จาก 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10 และ 1 ก๊อปปี้ตามลำดับ เปรียบเทียบกับผลการ ทดสอบเมื่อใช้ไพรเมอร์ของยีนบริเวณ ORF2 ด้วยวิธี PCR (Ouardani *et.al.*, 1999) (รูปกลาง) และผล การทดสอบการเรืองแสงโดย DNA binderและผลการทดสอบการเรืองแสงโดย DNA analog probe (ล่าง)

จากภาพที่ 8 นอกจากชุดไพรเมอร์และวิธีที่ใช้จะช่วยให้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอ แม่ ในตัวอย่างมีดีเอ็นเอของไวรัสอยู่ที่ระดับ 100 ก๊อปปี้ ซึ่งเป็น limit of detection (LOD) แล้ว ที่ระดับ ดังกล่าวยังให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก ซึ่งตรวจสอบได้จากความเข้มของแถบดีเอ็นเอรวม ผลดังกล่าวต่างจากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน ORF2 ด้วยไพรเมอร์ ORF2 PCV2 S4 และ ORF2 PCV2 S4AS ที่ได้รายงานไว้ (Ouardani *et.al.*, 1999) ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่จางลงมาก ความ ต่างกันดังกล่าวช่วยให้ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP มีความเหมาะสมในการ นำไปใช้ร่วมกับระบบเรืองแสง

6. การพัฒนาระบบการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ส่วนสำคัญที่สุดของปฏิกิริยา นอกจากการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว การตรวจสัญญาณดีเอ็นเอเพื่อตัดสินใจสรุปผลสำหรับการวิเคราะห์เป็นสิ่งสำคัญในการตรวจเช่นกัน ปกติการตรวจวินิจฉัยผลการทดสอบที่อยู่บนพื้นฐานของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจสอบได้จากการนำดีเอ็นเอตัวอย่างไปแยกด้วยสนามไฟฟ้า การวินิจฉัยผล จึงขึ้นอยู่กับ การพบหรือไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในขนาดที่คาดหวัง หรือในบางกรณีอาจใช้โพรบดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอมาจับเพื่อยืนยันผล ขั้นตอนการแยกด้วยสนามไฟฟ้านี้เป็นอุปสรรคต่อการวินิจฉัย ทำให้เกิดความยุ่งยากเพิ่มขึ้นหนึ่งขั้นตอน เสียเวลา และกระบวนการมีต้นทุนค่าสารเคมีและเกี่ยวข้องกับสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้ยังทำให้การตรวจวิเคราะห์ต้องพึ่งพาอุปกรณ์เพิ่มมากขึ้น

ด้วยคุณสมบัติของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในระบบ LAMP ที่ต่างไปจาก PCR ทำให้รูปแบบในการวินิจฉัย ผลการตรวจสอบของ LAMP มีทั้งส่วนที่ต่างไปจาก PCR และส่วนที่สามารถนำหลักการเดียวกันมารวมประยุกต์ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี LAMP จึงเต็มไปด้วยประสิทธิภาพ ปฏิกิริยาสังเคราะห์ที่ดำเนินไปทุกวินาทีและในทุกครั้งที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ยาวขึ้นทีละ monomer (เกิด polymerization) substrate dNTP จะถูกใช้งานแล้วเปลี่ยนเป็น PPi ผลดังกล่าวทำให้เกิดการสะสมขบวนการของแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟตในหลอดทดลอง (Mori *et al.*, 2001)

Notomi *et al.* (2000) ได้รายงานการใช้ตะกอนแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต เป็นดัชนีในการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณที่ประสบผลจะช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดความขุ่นและความขุ่นดังกล่าวใช้เป็นหลักในการชี้วัดปฏิกิริยา หลักการดังกล่าวสามารถตรวจสอบโดยเครื่องวัดความขุ่นของตะกอน อย่างไรก็ตามการทดสอบกับปฏิกิริยา PCV ในครั้งนี้พบว่าความขุ่นเป็นตัวแปรที่อาจไม่เห็นเด่นชัด และผลการสังเกตมีความแตกต่างในแต่ละบุคคล การพิจารณาความขุ่นจึงนอกจากมีข้อจำกัดและแตกต่างกันในแต่ละบุคคลแล้ว การวิเคราะห์ความขุ่นยังขึ้นอยู่กับความเข้ม/สว่างของแสงอีกด้วย ทำให้ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้อ้างอิงประกอบการตัดสินใจสรุปผลสำหรับการวิเคราะห์ PCV ในแต่ละครั้ง

การพิจารณาจากการตรวจเอกสารพบว่านอกจากความขุ่นของตะกอนแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟตแล้ว การตรวจวัดดีเอ็นเอโดยตรง จะทำให้มั่นใจว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประสบความสำเร็จอย่างแท้จริง ดังนั้นจึงพบว่า ขั้นตอนการนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยปฏิกิริยา LAMP มาตรวจสอบโดยการแยกด้วยสนามไฟฟ้าเป็นวิธีการที่ตอบวัตถุประสงค์ได้ตรงประเด็น สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน สร้างความเชื่อมั่นในผลการตรวจวิเคราะห์ที่ตรวจสอบได้ด้วยสายตา แต่ด้วยข้อจำกัดจึงมีการพัฒนาทางเลือกอื่นขึ้น

ทางเลือกหนึ่งได้แก่ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการใช้โมเลกุลเรืองแสงในรูป DNA binder สารในกลุ่มนี้สามารถจับตัวกับโครงสร้าง minor groove ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง double helix ใน โมเลกุลของดีเอ็นเอ ดังนั้นหากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP ประสบผลสำเร็จ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมากมาย ซึ่งเมื่อผสมรวมกับ โมเลกุลเรืองแสงที่เป็น minor groove binder จะทำให้เกิดการเรืองแสงที่ตรวจสอบได้ทันทีโดยไม่ต้องพึ่งพาขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า ดังนั้นเพียงนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP มาผสมกับ DNA binder แล้วตรวจวัดผลการเรืองแสงโดยการนำหลอดดีเอ็นเอที่ได้ไปส่องบน UV Transilluminator ก็สามารถตรวจสอบผลได้ ทำให้หลีกเลี่ยงข้อจำกัดต่างๆ การจับตัวของ minor groove binder กับโมเลกุลของดีเอ็นเอจึงเป็นการเปลี่ยนดีเอ็นเอซึ่งเป็น โมเลกุลทางเคมีให้เป็นสัญญาณเรืองแสงซึ่งเป็นสัญญาณทางกายภาพที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า หรือใช้ fluorometer นอกจากการใช้ โมเลกุลเรืองแสงในรูป DNA binder ยังสามารถใช้โมเลกุลเรืองแสงในรูป analog DNA probe (ต่อไปนี้เรียก probe) ที่มีโมเลกุลเรืองแสงที่ใช้ label ที่ปลาย 5' และ 3' เมื่อจับเข้ากับดีเอ็นเอ เป้าหมายก็จะให้สัญญาณดีเอ็นเอโดยตรงเช่นเดียวกัน

เนื่องจากปฏิกิริยา LAMP ใช้เวลาทำปฏิกิริยาจนเสร็จสิ้นเพียง 30-60 นาที ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณหากสามารถตรวจวินิจฉัยผลการทดสอบด้วยสายตาได้ก็จะทำให้การตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ และเป็นไปตามหลักการ point of care ได้ การศึกษาในครั้งนี้จึงได้นำหลักการการเรืองแสงอันเกิดจากโมเลกุลเรืองแสง fluorophore ที่อยู่ในรูปแบบของ probe และ quencher ทั้งสองมาใช้ประกอบในปฏิกิริยา เพื่อให้การตรวจสอบปฏิกิริยาเกิดความสะดวก ง่าย ให้ผลการทดสอบชัดเจน โมเลกุลเรืองแสงที่ใช้ในการทดสอบในครั้งนี้จึงแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. โมเลกุลเรืองแสงในรูป minor groove binder
2. โมเลกุลเรืองแสงที่ใช้ label ที่ปลาย 5' และ 3' ของ probe

1. โมเลกุลเรืองแสงในรูป minor groove binder

โมเลกุลเรืองแสงในกลุ่มนี้สามารถจับตัวกับโครงสร้าง minor groove ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง double helix ใน โมเลกุล การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมากมาย ซึ่งเมื่อผสมรวมกับ โมเลกุลเรืองแสงที่เป็น minor groove binder จะทำให้เกิดการเรืองแสงที่ตรวจสอบได้ โมเลกุลเรืองแสงในกลุ่มนี้ได้แก่ แดฟปี (DAPI) เบอร์เรนิล (berenil) คิสต้าไมซิน (distamycin) ไชเบอร์กรีน (SYBR Green) และอีวากรีน (Eva Green)

เนื่องจาก SYBR Green เป็น โมเลกุลเรืองแสงที่นิยมใช้มากที่สุด จึงได้พัฒนาระบบการตรวจโดยใช้โมเลกุลเรืองแสง SYBR Green มาทำปฏิกิริยา ผลการทดสอบพบว่า การใช้ระบบการตรวจสอบสัญญาณในรูปของ DNA binder สำเร็จรูป สามารถแปรผันจนได้ระดับความเข้มข้นที่

เหมาะสม โดยที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวจะให้สัญญาณดีเอ็นเอที่ปราศจาก background และให้ระดับความเข้มแสงที่เกิดจากสัญญาณดีเอ็นเอตรงในรูปแบบการเรืองแสงมากพอ (ภาพที่ 9)



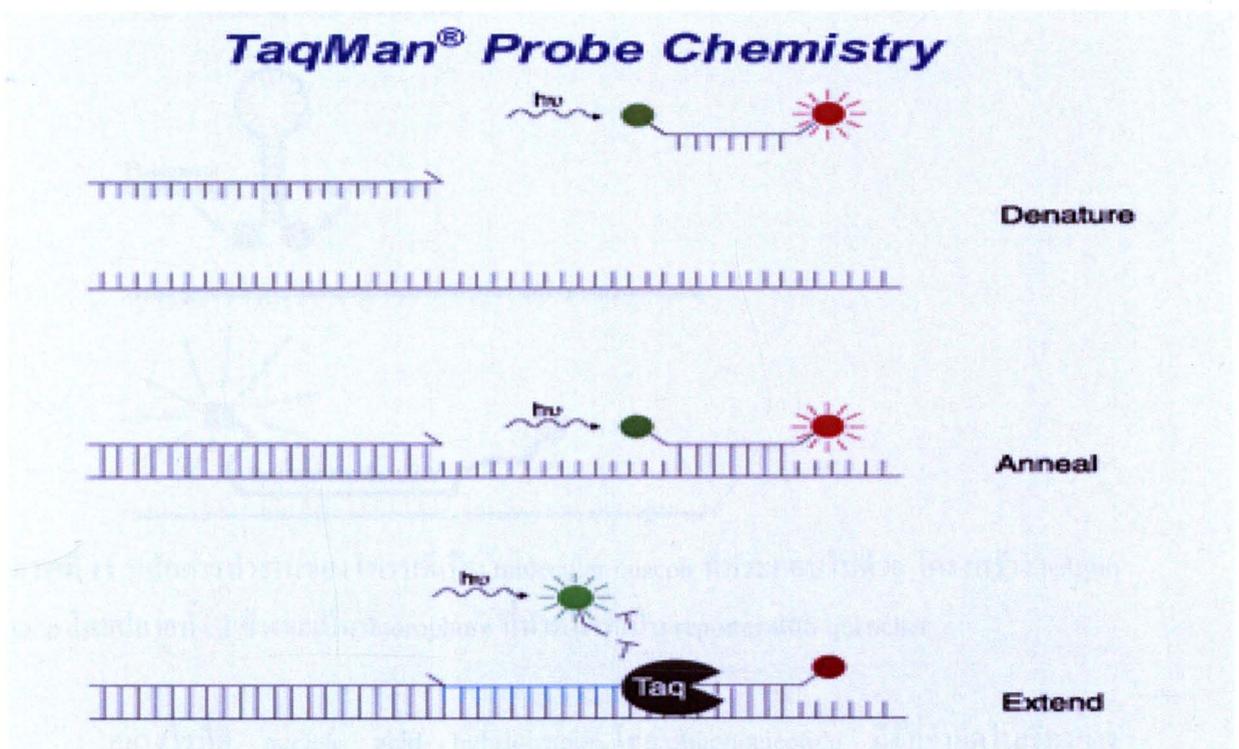
ภาพที่ 9 รูปแบบการเรืองแสงเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างควบคุมลบ (หลอดซ้าย) และตัวอย่างควบคุมบวก (หลอดขวา) เมื่อใช้โมเลกุลเรืองแสง SYBR Green เป็น DNA binder

เมื่อนำเงื่อนไขดังกล่าวไปใช้ในการทดสอบปฏิกิริยารวม ร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาของคู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ทดสอบความจำเพาะ และทดสอบความไวของปฏิกิริยา ดังภาพที่ 6 7 และ 8 โดยเฉพาะปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก พบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่านั้นที่สามารถทำปฏิกิริยาจับตัวกับ DNA binder และให้ผลเรืองแสงชัดเจน ผลการเรืองแสงที่ได้ก็มีความสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR และ ผลของการแยกผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า ที่สำคัญผลการตรวจกับตัวอย่างที่เป็นลบ ให้สัญญาณชัดเจนและไม่พบการเรืองแสงแต่อย่างใด

2. โมเลกุลเรืองแสงที่ใช้ fluorophore ติดฉลากที่ปลาย 5' ของ probe

การตรวจสอบรูปแบบการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอ พบว่าการจับตัวของ probe ที่เรืองแสงได้ด้วยหลักการ nucleic acid hybridization กลายเป็นกลไกสำคัญที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ การตรวจสอบกรดนิวคลีอิก ทั้ง DNA และ RNA ในปัจจุบัน โดยตัวอย่างที่เห็นเด่นชัดที่ผ่านมา ได้แก่ การตรวจสอบกรดนิวคลีอิกในเชิงปริมาณด้วยเทคนิค realtime-PCR โดยหลักการ การเรืองแสงของโมเลกุลที่นำมาใช้ร่วมในการตรวจวัดการเพิ่มระดับปริมาณดีเอ็นเอในเทคนิค realtime-PCR อาศัยมิติการเรือง (excitation and emission of fluorescence) ระหว่าง reporter และ quencher โดยโมเลกุลสีที่เป็น reporter เมื่อได้รับพลังงาน (จากการรับแสง) จะเกิด excitation ของโมเลกุลเปลี่ยนระดับพลังงาน ในธรรมชาติเพื่อให้โมเลกุลมีความเสถียร โมเลกุลจะต้องลดระดับพลังงานลง ในภาวะที่โมเลกุลอยู่เป็นอิสระจากโมเลกุลสีอื่นจะทำโดยการคายพลังงาน (emission) ในรูปของเปล่งคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นเปลี่ยนไป ซึ่งมักตกในช่วงแสง fluorescence เรียกว่าเกิดการเรืองแสง อย่างไรก็ตาม หากโมเลกุลของสีไม่อยู่อย่างอิสระ แต่จะอยู่ใกล้กันกับ โมเลกุลของสีที่อยู่ในกลุ่ม quencher โมเลกุลของ quencher จะรับพลังงานจาก reporter ไว้เอง ดังนั้นแทนที่ reporter จะเรืองแสง reporter จึงไม่เรือง ปรากฏการณ์การถ่ายพลังงานในลักษณะดังกล่าว เรียกว่า FRET หรือ fluorescence resonance energy transfer การอยู่ใกล้กันของ reporter และ quencher ทำให้ reporter ไม่อาจเรืองแสงได้ อย่างไรก็ตามหากมีการเปลี่ยนแปลงประการใดประการหนึ่งที่ทำให้ reporter และ

quencher หลุดออกหรืออยู่ห่างออกจากกัน การเรืองแสงก็จะปรากฏ ตัวอย่างปฏิกิริยาจริงที่ดำเนินการในปฏิกิริยาทางเคมีที่พบในเทคนิค realtime PCR อันหนึ่งได้แก่ *Taqman* probe ซึ่งเป็น probe ที่ออกแบบให้ปลาย 5' เป็น reporter ได้แก่ FAM และปลาย 3' เป็น quencher ได้แก่ TAMRA ในภาวะปกติทั้ง 2 อยู่ใกล้กัน เกิด FRET จึงไม่เรืองแสง และเมื่อปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้น ขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิจนแม่แบบดีเอ็นเอกลายเป็น single strand แล้วลดอุณหภูมิลง ทั้งไพรเมอร์ forward และ reverse และ probe จะจับตัวกับแม่แบบ และเมื่อปฏิกิริยา PCR คืบหน้าทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ระหว่างนั้น exonuclease activity ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะตัดส่วนของ reporter ที่ 5' บน probe ให้หลุดออกโมเลกุล reporter ที่เป็น fluorophore ในรูป FAM จะล่องลอยเป็นอิสระทำให้ปฏิกิริยา FRET ไม่เกิดขึ้น fluorophore หรือ reporter ที่หลุดออกเป็นอิสระนี้จะเริ่มเรืองแสง (ภาพที่ 10)

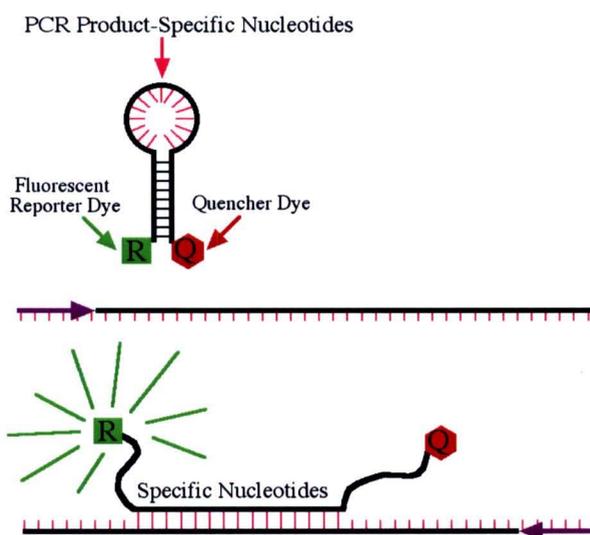


ภาพที่ 10 หลักการทำงาน of *Taqman* chemistry อาศัยการทำหน้าที่ 5' exonuclease ของ subunit เล็กของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำให้ reporter ซึ่งเป็น fluorophore หลุดเป็นอิสระจาก quencher ซึ่งบดบังหรือดึงพลังงานของ reporter ไว้ และเกิดการเรืองแสง

สำหรับโพรบ (probe) ที่ใช้เทคโนโลยี hybridization อื่นที่สำคัญได้แก่ molecular beacon ซึ่งเป็น probe ที่ออกแบบให้มีโครงสร้าง hairpin loop โดยปลายทั้ง 2 ข้างจะเป็น reporter และ quencher (เหมือนกันกับรูปแบบก่อนหน้า) ในภาวะปกติปลายทั้ง 2 จะอยู่ใกล้กัน จึงเกิด FRET สมบูรณ์ โครงสร้าง molecular beacon ยังมี บริเวณ loop เป็นวงกลม การที่โครงสร้าง molecular

beacon มีปลายทั้ง 2 ที่อยู่ใกล้กัน เกิดจากการงอออกแบบให้เกิดโครงสร้าง complementary ที่บริเวณ stem ขณะที่บริเวณที่เป็น loop จะงอออกแบบให้จับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้

การทำงานของ molecular beacon ในยามปกติ โครงสร้าง beacon จับตัวกันเอง reporter และ quencher อยู่ใกล้กัน เกิดการถ่ายพลังงาน หรือ FRET ไปยัง quencher ทำให้ reporter ไม่สามารถเรืองแสงได้ ดังนั้นจึงไม่พบเกิดการเรืองแสงในปฏิกิริยา แต่เมื่อโครงสร้าง beacons จับตัวกันกับดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งเป็นยีนหรือส่วนของยีนเป้าหมายส่วน loop ที่จับกับดีเอ็นเอจะบังคับให้ reporter และ quencher แยกออกจากกัน ปฏิกิริยา FRET จึงสิ้นสุดลง reporter ที่อยู่ห่างจาก quencher ก็จะเรืองแสงทันที (ภาพที่ 11) โดยการเรืองแสงมีระดับที่สอดคล้องกับความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



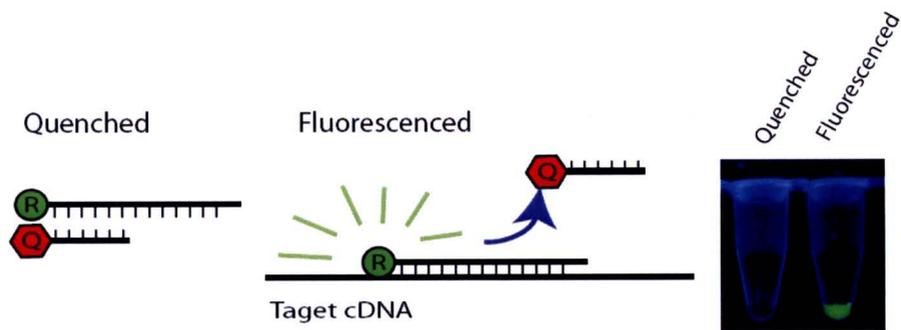
ภาพที่ 11 หลักการทำงานของโพรบที่เป็น molecular beacon ที่ประกอบไปด้วย โครงสร้าง hairpin loop โดยปลายทั้ง 2 ข้างจะเป็น fluorophore ที่ทำหน้าที่เป็น reporter และ quencher

อย่างไรก็ดี nucleic acid hybridization โดย oligonucleotide มีข้อจำกัดในเรื่องการตรวจสอบสัญญาณที่ต้องใช้อุปกรณ์ optic ราคาแพงในการตรวจวัด และส่วนใหญ่มาในรูปแบบเครื่อง real-time-PCR การทำ nucleic acid hybridization ที่อุณหภูมิห้องและตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยไม่ใช้เครื่องมือซับซ้อนจำเป็นต้องใช้ oligonucleotide ที่มีคุณสมบัติพิเศษ

การสำรวจรูปแบบที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทางเทคโนโลยีของโครงการ เริ่มจากการดำเนินการที่สนใจไปที่ analog DNA เนื่องจากโมเลกุล analog DNA นี้จะลดปัญหาการปลั๊กกันระหว่างโมเลกุลอันเนื่องมาจาก electrostatic forces ของสายกระดูกสันหลังของดีเอ็นเอซึ่งได้แก่ ฟอสเฟตและน้ำตาลลดความซับซ้อนของเทอร์โมไดนามิกที่เกี่ยวข้องขณะ hybridization ลงทำให้ตัวปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้แม้ที่อุณหภูมิห้อง

โครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการศึกษาการใช้ DNA analog ในรูปแบบ *N*-(2-aminoethyl) glycine analog nucleic acid โดยได้ออกแบบ probe เพื่อใช้แทน oligo probe ซึ่งในงานวิจัยได้ดำเนินการออกแบบ probe ให้จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ORF2 ขณะเดียวกันได้ออกแบบ quencher เพื่อจับตัวแข่งขันกับ DNA analog probe ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

การทดลองนี้ได้เสนอแนวคิดใหม่ในการดำเนินการ กับ DNA analog สำหรับการตรวจผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา LAMP โดยเฉพาะ โดยในรายละเอียด probe ในทางทฤษฎีได้รับการออกแบบให้จับตัวอยู่กับโมเลกุลของ quencher โดยที่โมเลกุลของ probe จะมีส่วนหนึ่งเป็นโครงสร้างโมเลกุลของ fluorophore reporter ที่จะช่วยให้เกิดการเรืองแสงเมื่อได้รับพลังงาน ได้แก่ FAM การจับตัวของ quencher ซึ่งมีบริเวณปลาย 3' เป็นโมเลกุลคอยรับการถ่ายทอดพลังงาน (โมเลกุล BHQ-1) ทำให้โมเลกุลของ reporter ส่วน FAM และ quencher ส่วน BHQ-1 เข้ามาอยู่ใกล้กัน จึงเกิดปรากฏการณ์การถ่ายเทพลังงานในรูป resonance ทางแสงหรือ FRET ขึ้น ทำให้ไม่เกิดการเรืองแสง แต่ในขณะที่ในระบบมี nucleic acid เป้าหมาย probe จะจับตัวกับดีเอ็นเอ เป้าหมายได้ดีกว่า ทำให้ probe ไปแย่งจับกับ DNA เป้าหมาย โมเลกุล quencher จึงหลุดออก การจับตัวระหว่าง DNA กับ probe นี้ เป็นไปตามคุณสมบัติของ DNA analog ที่จับตัวได้ไว มีความจำเพาะสูง การดำเนินไปของปฏิกิริยา nucleic acid hybridization จึงเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ รูปแบบและการทำงานและการเรืองแสงเมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเป็น oligonucleotide เป็นดังภาพที่ 12



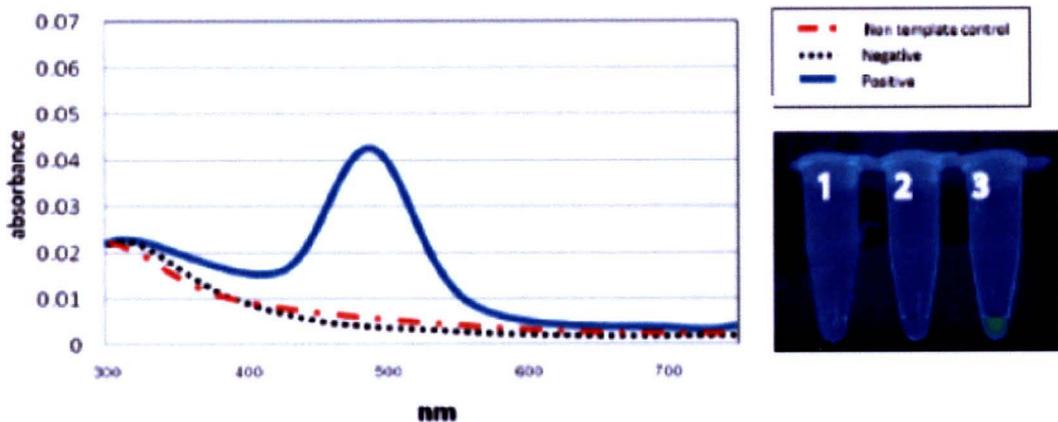
ภาพที่ 12. หลักการทำงานของโพรบที่เป็น analog DNA และรูปแบบการเรืองแสงเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างควบคุมลบ (ซ้าย) และ ตัวอย่างควบคุมบวก(ขวา) โดย R แสดงส่วนของ fluorophore FAM Q แสดงส่วนของ fluorophore BHQ 1 เมื่อไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย probe จะจับตัวกับ quencher ทำให้ไม่เรืองแสง แต่หากมีดีเอ็นเอเป้าหมาย (ในที่นี้ได้แก่ target oligonucleotide) probe จะจับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำให้ fluorophore FAM เป็นอิสระ จึงเกิดการเรืองแสง

หากพิจารณาจากหลักการทั้งหมด จะพบว่าการทำงานของ probe เป็นไปตามกลไกของ nucleic acid hybridization ซึ่งเป็นการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอที่แม่นยำ และเป็นที่ยอมรับมาก

ที่สุดในช่วงที่ผ่านมา การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วย probe ที่ใช้โมเลกุลเรืองแสงที่แสดงผลากที่ปลาย 5' ของ probe ในระหว่างการตรวจยีน ORF2 ของเชื้อไวรัส PCV2 เริ่มจากการคัดเลือกบริเวณที่จะใช้อ้างอิงในการ ออกแบบ probe โดยได้ดำเนินการคัดเลือก บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 406-417 ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ระหว่างบริเวณ F1 และ B1 เพื่อให้ probe ที่ออกแบบได้ สามารถจับตัวกับบริเวณที่เป็น double stand DNA conformation และหลีกเลี่ยง ส่วนที่เป็นโครงสร้าง loop ที่พบในระหว่างที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ เนื่องจากธรรมชาติของปฏิกิริยา จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น cauliflower like structure และโครงสร้าง loop ร่วมอยู่ด้วย (Notomi *et al.*, 2000) probe ที่ออกแบบขึ้นเมื่อตรวจสอบพบว่าไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของไวรัสในกลุ่มสัตว์ ไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โดย probe ที่ออกแบบขึ้นมีรายละเอียดเป็นดังตารางที่ 3

ผลการดำเนินการในการทำปฏิกิริยา hybridization พบว่าจากการทดลองเมื่อผสม analog DNA probe เข้ากับ oligonucleotide ที่ใช้เป็น quencher สัญญาณดีเอ็นเอจะอ่อนลง และเกิดปรากฏการณ์ quenching ที่ชัดเจน และเมื่อเพิ่มดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายจากตัวอย่างเซอร์โคไวรัสที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค LAMP ลงในปฏิกิริยาปรากฏการ hybridization ที่เกิดขึ้นทำให้ quencher และ probe แยกออกจากกัน ตามทฤษฎี

การตรวจสอบการเรืองแสงของปฏิกิริยาในภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) และไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายแต่มีดีเอ็นเออื่นที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา LAMP ด้วยเช่นกัน กับภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative DNA) เป็นดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 การตรวจสอบการเรืองแสงของปฏิกิริยาในภาวะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย และไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

จากภาพจะพบจุดสูงสุดของกราฟที่ได้จากการ excitation ทางแสงเมื่อเกิดการเรืองแสง ภายหลังปฏิกิริยา nucleic acid hybridization กับดีเอ็นเอเป้าหมายประสบความสำเร็จที่ 490 nm ไม่

พบการจับตัวระหว่าง probe กับ target negative DNA (DNA ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP แต่ไม่ใช่ DNA เป้าหมาย, ในที่นี้ ได้แก่ DNA ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP ในระบบการตรวจไวรัส WSSV) จึงทำให้ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของแสงเกิดขึ้น (เส้นกราฟประเล็ก) ทำนองเดียวกันกับตัวอย่างที่ไม่มีดีเอ็นเอ (nontemplate control) (เส้นกราฟประใหญ่) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงกลไกการจับตัวระหว่าง quencher กับ probe ยังคงมีเสถียรภาพทำให้สัญญาณ fluorescence คับลง การเรืองแสงของระบบที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้นี้สามารถมองเห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า และสามารถใช้เป็นดัชนีในการบ่งบอกความสำเร็จในการทำ nucleic acid hybridization ได้เป็นอย่างดี

จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า ระบบการตรวจสัญญาณดีเอ็นเอ โดยใช้ analog DNA เป็น probe ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้นี้ สามารถช่วยตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยความจำเพาะและไม่ทำปฏิกิริยากับ non target nucleic acid แต่อย่างใด การจับตัวระหว่าง probe และ nucleic acid เป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการเรืองแสง ในระดับที่เพียงพอและเห็นได้ชัดเจน ด้วยตาเปล่าภายหลังนำหลอดไปปรับรังสี อัลตราไวโอเล็ต (Ultra violet, UV) ที่คลื่นความถี่ ($\lambda = 312$)

การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยการ hybridization กับ probe ที่มีสารเรืองแสง FAM ที่ปลาย 5' ให้ผลดีกับทั้งตัวอย่างที่เป็นชุดมาตรฐานที่เป็นส่วนควบคุมบวก (ภาพที่ 6) และส่วนที่เป็น การตรวจสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ (ภาพที่ 7) และการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (ภาพที่ 8) การเลือกใช้ DNA analog เป็น probe ในครั้งนี้นี้ อาศัยข้อดีของ analog structure ที่ช่วยให้การจับตัวระหว่าง probe กับ target DNA เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิห้อง จึงทำให้การดำเนินปฏิกิริยา hybridization มีขั้นตอนง่ายขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องควบคุม ปัจจัยเรื่อง อุณหภูมิ ข้อดีดังกล่าวส่งผลถึงความง่ายในการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ

จากผลการทดลองจะพบว่าระบบการตรวจสอบสัญญาณ โดยการใช้ analog DNA probe แม้ดูจากผลการทดลองในเบื้องต้น (ภาพที่ 6-8) จะไม่ต่างจากการใช้ probe ในรูป DNA binder ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยา LAMP เป็นปฏิกิริยาที่ให้ความจำเพาะสูง ซึ่งเป็นผลจากการใช้ไพรเมอร์ 6 บริเวณพร้อมๆ กัน (Notomi *at al.*, 2000) จึงทำให้ผลจากการตรวจด้วย LAMP เพียงลำพัง ไม่ต่างไปจากผลการตรวจ LAMP ร่วมกับ nucleic acid hybridization แต่ในทางทฤษฎี หากตัวอย่างเกิดมี ปัญหา เช่น เกิดการเพิ่มปริมาณแบบ false positive ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของสารเคมีในระหว่างการทดลอง หากการปนเปื้อนนี้ไม่ได้เกิดการเพิ่มปริมาณเฉกเช่นแม่แบบปกติก็จะไม่เกิดการเพิ่มปริมาณ target DNA ซึ่งส่งผลต่อไปต่อปฏิกิริยา nucleic acid hybridization ในท้ายที่สุด (Nielson and Haaima, 1997) ดังนั้นองค์ประกอบ nucleic acid hybridization ด้วย DNA analog จึงทำให้การตรวจ มีประสิทธิภาพและลดโอกาสเกิด false positive ได้

7. การตรวจสอบตัวอย่างจากภาคสนาม

ผลการดำเนินการ เมื่อนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ไปตรวจสอบกับตัวอย่างที่ได้จากภาคสนาม ได้แก่ ตัวอย่างจากฟาร์มและตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการ รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 190 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเสริม 172 ตัวอย่าง ตัวอย่างขึ้นเนื้อเยื่อ 18 ตัวอย่าง พบว่าวิธี PCR ที่ใช้เป็นมาตรฐาน (Ouardani et.al., 1999) ให้ผลการทดสอบที่เป็นบวก 46 ตัวอย่าง ผลการทดสอบเป็นลบ 144 ตัวอย่าง ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการสุ่มตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบทางการผ่าชันสูตรซาก และสามารถนำมาใช้เปรียบเทียบกับวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ ขณะที่ผลการทดสอบการตรวจด้วยเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ให้ผลการทดสอบที่เป็นบวก 46 ตัวอย่าง ผลการทดสอบเป็นลบ 142 ตัวอย่าง และพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกไม่ตรงกับที่ได้จากวิธี PCR 1 ตัวอย่าง ไม่พบผลลบไม่ตรงกับที่ได้จากวิธี PCR

การเปรียบเทียบผล 3 ระดับ ได้แก่ ความไวของปฏิกิริยา (Sensitivity) ของชุดทดสอบ (LAMP gel) ซึ่งคำนวณจาก จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (true positive) หารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (true positive) และตัวอย่างที่ให้ผลลบผิดพลาด (false negative) รวมกัน ทำการตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา (Specificity) ของชุดทดสอบ โดยคำนวณจากตัวอย่างที่ให้ผลลบ (true negative) หารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบ (true negative) และตัวอย่างที่ให้ผลบวกผิดพลาด (false positive) รวมกัน และทำการตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility) จากตัวแทนตัวอย่างเมื่อจำนวนซ้ำเป็น 2 คำนวณจากการเปรียบเทียบผลการทดสอบครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 โดยใช้จำนวนที่ให้ผลบวกทั้ง 2 ครั้ง หารด้วยจำนวนที่ให้ผลบวกทั้งหมดซึ่งรวมถึงจำนวนที่ให้ผลบวกทั้งสองครั้ง จำนวนที่ให้ผลบวกในครั้งที่ 1 แต่ให้ผลลบในครั้งที่ 2 และจำนวนที่ให้ผลลบในครั้งที่ 1 แต่ให้ผลบวกในครั้งที่ 2 ในการเปรียบเทียบผล 3 ระดับ โดยการนำชุดทดสอบไปใช้ทดสอบจริงในภาคสนาม (LAMP binder) และนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากชุดทดสอบมา ทดสอบในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการแยกด้วยสนามไฟฟ้า (LAMP gel) เทียบกับวิธี PCR ของ Ouardani et.al. (1999) ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวก (true positive) และตัวอย่างที่ให้ผลลบ (true negative) นั้น ใช้การยืนยันผลจากการทดสอบด้วยวิธี PCR ของ Ouardani et.al. (1999) เป็นวิธีมาตรฐาน

ตารางที่ 4 การทดสอบความน่าเชื่อถือของการประเมินตัวอย่างจากฟาร์ม

ตัวอย่าง	PCR	LAMP gel	LAMP binder
True positive	46	46	48
True Negative	144	142	140
False positive	0	2	2
False negative	0	0	0

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา = 190 ตัวอย่าง

$$\text{Specificity} = (142/142+2) \times 100 = 98.6\%$$

$$\text{Sensitivity} = (46/46+0) \times 100 = 100\%$$

$$\text{Reproducibility} = (46/48) \times 100 = 95.8\%$$

ผลการทดสอบพบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวิเคราะห์การปนของเชื้อเซอร์โคไวรัส ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยความไวของปฏิกิริยา 100% ความจำเพาะสูงถึง 98.6% และให้ความสามารถในการทำซ้ำที่ 95.8% (ตารางที่ 4) ผลการประเมินวิธีที่พัฒนาขึ้นดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าตัววิธีมีความน่าเชื่อถือ ให้ความแม่นยำและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองได้ตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

ตารางที่ 5 ผลการตรวจตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการ	ผลการตรวจ		
	ตัวอย่างบวก	ตัวอย่างลบ	หมายเหตุ
หน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2	8	- จำนวนตัวอย่างบวก ให้ผลตรง 1 ตัวอย่าง ไม่ตรงตำแหน่ง 1 ตัวอย่าง
ห้องปฏิบัติการทาง วิทยาศาสตร์ บริษัทเบทาโกร	1	9	- จำนวนตัวอย่างบวก ให้ผลตรง 1 ตัวอย่าง และทำการตรวจซ้ำอีกครั้ง ไม่พบว่ามี ตัวอย่างบวก
ห้องปฏิบัติการชั้นสูตรหน่วย โรคสุกร ภาควิชาอายุรศาสตร์ ครั้งที่ 1	1	9	- จำนวนตัวอย่างบวก ให้ผลตรง 1 ตัวอย่าง
	3	7	- ให้ผลตรงทุกตำแหน่งของตัวอย่างที่ส่ง ตรวจ (ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจซ้ำ เป็น ตัวอย่าง DNA ที่ได้สกัดมาแล้ว และใช้ primers ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในการศึกษาครั้งนี้)

จากการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการส่งตัวอย่างซีรัมที่ทราบผล จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ให้ผลลบ (negative) จำนวน 7 ตัวอย่าง และให้ผลบวก (positive) จำนวน 3 ตัวอย่าง [ตัวอย่างที่ทราบผล นำมาจากตัวอย่างที่ได้ทราบผลการตรวจด้วย วิธี PCR ของ Ouardani *et.al.* (1999)] เข้าไปทำการทดสอบผลการตรวจของการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 3 แห่ง ได้แก่ ห้องปฏิบัติการชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ บริษัทเบทา

โกร และห้องปฏิบัติการชั้นสูงตรหน่วยโรคสุกร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลการศึกษาพบว่าห้องปฏิบัติการทั้ง 3 แห่ง ให้ผลการตรวจที่แตกต่างไปจากตัวอย่างที่ส่งไปทำการทดสอบ ยกเว้นผลการตรวจครั้งที่ 2 ของห้องปฏิบัติการชั้นสูงตรหน่วยโรคสุกร ภาควิชาอายุรศาสตร์ ที่ให้ผลตรงกัน (ตารางที่ 5)

ผลการศึกษา พบว่าการตรวจ PCV2 ด้วยยีน ORF2 ใช้เวลาดำเนินการทั้งหมดไม่เกิน 40 นาที (นับระยะเวลาตั้งแต่การทำปฏิกิริยาในการตรวจสอบการติดเชื้อเซอร์โคไวรัสด้วยยีน ORF2 ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น แต่ไม่นับรวมระยะเวลาถึงการสกัดดีเอ็นเอ) ที่สำคัญไม่จำเป็นต้องพึ่งพาอุปกรณ์ในการควบคุมอุณหภูมิขณะเพิ่มปริมาณที่เรียกว่า thermocycler ไม่จำเป็นต้องดำเนินการแยกสารพันธุกรรม ในสนามไฟฟ้าหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และหากเปรียบเทียบกับวิธี PCR จะพบว่า วิธีที่พิจารณาขึ้นในครั้งนี้มีข้อดีเหนือกว่า PCR ในแง่ ศักยภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมากพอแม้ในระดับใกล้ ระดับ limit of detection ให้ความจำเพาะสูง อันเนื่องมาจากมีบริเวณไพรเมอร์เกี่ยวข้องมากกว่า และมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจนอกสถานที่ เช่นการตรวจติดตาม (on site monitoring) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบข้อดีของเทคนิคการตรวจที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคเดิมที่นิยมใช้

รายละเอียด	เทคนิค PCR	เทคนิคที่พัฒนาขึ้น
การสกัดดีเอ็นเอ	20-30 นาที	20-30 นาที*
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	2-3 ชั่วโมง	30 นาที
ความจำเพาะของปฏิกิริยา	สูง 1 คู่ไพรเมอร์ 2 บริเวณ	สูงมาก 2 คู่ไพรเมอร์ 6 บริเวณ
ความไวของปฏิกิริยา	ไม่ต่างกัน	ไม่ต่างกัน
ปริมาณผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ	มาก	มากกว่า PCR เกินกว่า 10 เท่า
การแยกด้วยสนามไฟฟ้า	จำเป็น**	ไม่จำเป็น
ต้นทุน	~ 200 บาท/ตัวอย่าง	~ 250 บาท/ ตัวอย่าง

* ไม่ได้ดำเนินการพัฒนาเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอ

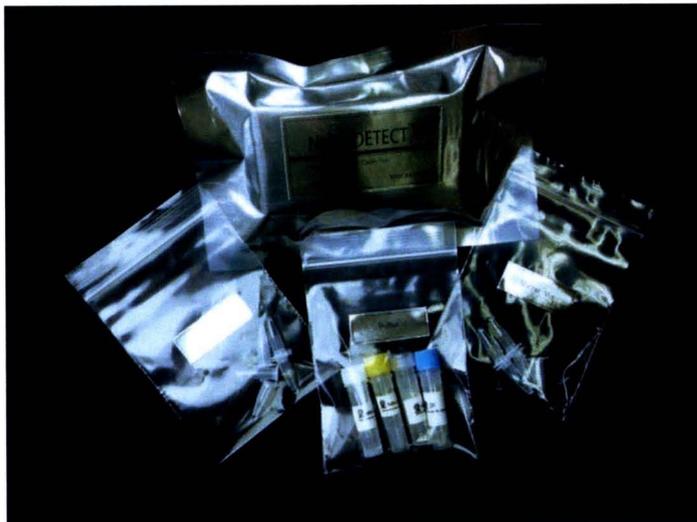
** เนื่องจากหากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมีน้อยเช่นเมื่อตัวอย่างมีปริมาณเชื้อในระดับต่ำมากจนใกล้ LOD จะไม่สามารถตรวจสอบด้วย DNA binder หรือ probe ได้

และเพื่อให้เกิดความสะดวกในการทำงาน จึงได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาปรับประยุกต์ให้อยู่ในรูปของชุดตรวจสำเร็จรูป โดยปรับสารเคมีต่างๆ และขั้นตอนให้อยู่ในรูปที่งานได้ง่าย ซึ่งจะทำให้ไม่จำเป็นต้องพึ่งพาบุคลากรเฉพาะทาง และช่วยให้การตรวจสามารถลดการพึ่งพาหาอุปกรณ์ที่มีราคาแพง ซึ่งส่งผลกระทบต่อการใช้งานใ้นอกสถานที่ได้มากกว่า เทคนิคการตรวจเดิมที่อยู่บนพื้นฐานของวิธี PCR (ภาพที่ 14 และ 15)



ภาพที่ 14 ชุดตรวจดีเอ็นเอเซ็นเซอร์สำเร็จรูปสำหรับการตรวจ PCV-2

องค์ประกอบในชุดตรวจสำเร็จรูป ประกอบไปด้วย reaction mix ชุดควบคุมบวก น้ำกลั่น สำหรับปฏิกิริยา เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase และชุดตรวจสัญญาณเรืองแสงในรูป fluorescence initiator สามารถเก็บชุดน้ำยาที่อุณหภูมิ -20°C หรือตู้แช่ไอศกรีม และใช้อุปกรณ์ไปเปิดขนาด 20 ไมโครลิตร เทอร์โมมิเตอร์และกล่องโฟมสำหรับการบ่มที่อุณหภูมิ 63°C และแหล่งกำเนิดแสง UV ขนาดเล็กเท่านั้น



ภาพที่ 15 องค์ประกอบในชุดตรวจดีเอ็นเอเซ็นเซอร์สำเร็จรูป

การใช้งานชุดน้ำยาดังกล่าว เริ่มจากการใส่ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างลงในหลอด premix ที่เตรียมขึ้น ซึ่งปกติจะแนะนำให้ใส่ดีเอ็นเอเพียง 1-2 μl จากนั้นผสมด้วยเอนไซม์ *Bst* DNA

polymerase 1 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปฏิกิริยาไปบ่มที่ 63°C นาน 30 นาที ขั้นตอนดังกล่าวใช้เวลาปฏิบัติงานไม่เกิน 1-2 นาที/ตัวอย่าง

การบ่มปฏิกิริยาอาศัยเพียง water bath ขนาดเล็ก หรือกล่องโฟมที่ใส่น้ำร้อนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ 63°C ได้เท่านั้น ภายหลังจากบ่มปฏิกิริยาจะดึงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเพียง 1 μ l ไปผสมกับ fluorescence initiator หากผลการทดลองเป็นบวก พบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน ORF2 จะสามารถสังเกตการณ์เรืองแสง fluorescence ได้ทันที ด้วยตาเปล่า กระบวนการดังกล่าวเวลาประมาณ 30 วินาที ชุบน้ำยานี้มีต้นทุนทางเคมีอยู่ที่ประมาณ 250 บาทต่อตัวอย่าง ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้ PCR ในการตรวจมากนัก

ดังนั้นหากพิจารณาในภาพรวมทั้งกระบวนการเริ่มตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอ จะพบว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นจะทำให้การตรวจสามารถดำเนินการได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการซึ่งไม่เคยทำได้ด้วยวิธีที่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนี้การตรวจสอบสัญญาณยังเป็นการยืนยันการตรวจสอบในรูปแบบ nucleic acid hybridization ซึ่งเทียบเท่ากับการดำเนินการด้วยเทคนิค Southern analysis ซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูงสุด



อภิปราย/วิจารณ์

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในการเลี้ยงสุกรของประเทศไทย ยังมีการติดโรคของ เซอร์โคไวรัสที่อยู่ในฟาร์ม ประมาณ 20% ของกลุ่มตัวอย่างจากแม่สุกร และลูกสุกรอนุบาลที่มี สภาพป่วย เป็นหลัก มีการเกิดโรคเซอร์โคไวรัสขึ้น ผลการตรวจจากการผ่าซาก ลักษณะรอยโรคที่ พบโดยส่วนมาก ไม่ได้แสดงมีลักษณะการบ่งชี้ จากการติดเชื้อเซอร์โคไวรัสอย่างชัดเจน ภาพรอย โรคที่พบส่วนมาก คือ มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย เช่น เชื้อมัย โคลพลาสมา เชื้อฮีโมฟิลัส เป็นต้น และในบางกรณีอาจพบว่าปอดมีการอักเสบและบวมน้ำร่วมด้วย เหตุผลหนึ่งที่น่าจะอธิบายถึงผลการตรวจพบไวรัสในซี่รุ่มหรือตัวอย่างชิ้นเนื้อในปริมาณต่ำ อาจ เนื่องมาจากการทำวัคซีนเซอร์โคไวรัสในแม่สุกรอุ้มท้องและมีการถ่ายทอดระดับภูมิคุ้มกันไปยังลูก สุกรคุดนม หรือการได้รับวัคซีนเซอร์โคไวรัสในลูกสุกรอนุบาลโดยตรงในช่วงอายุประมาณ 3 อาทิตย์ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อเซอร์โคไวรัสได้ เนื่องด้วยมีระดับภูมิคุ้มกัน อยู่ในกระแสเลือดคอยป้องกันและทำลายการติดเชื้ออยู่ ทำให้ถูกตรวจพบได้ยาก

การตรวจสอบการติดเชื้อของเซอร์โคไวรัส PCV-2 บนพื้นฐานของเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ ในครั้งนี้ อาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันระหว่างเซอร์โคไวรัส PCV1 และ เซอร์โคไวรัส PCV2 โดยเฉพาะในยีน ORF2 ขณะเดียวกันก็อาศัยความคล้ายกันและอนุรักษ์ของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน ORF2 ระหว่างสายพันธุ์ของไวรัส (Hamel et al., 1998) ดังนั้นจึงได้ พัฒนาวิธีการตรวจที่นำหลักการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP มาใช้ ร่วมกับระบบการ ตรวจสัญญาณดีเอ็นเอ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้นำเสนอทั้งการใช้ DNA binder และ การใช้ DNA analog probe ที่ติดฉลากเรืองแสง fluorophore ที่ปลาย 5' ของโมเลกุล โดยอาศัยความโดดเด่นของ เทคนิค LAMP (Notomi et al., 2000) ที่ช่วยให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะสูงมากและให้ ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในปริมาณที่สูงกว่าที่ได้จากเทคนิค PCR มาต่อยอดร่วมกับเทคนิค nucleic acid hybridization ด้วย analog DNA probe ที่จับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างแม่นยำ (Nielson, and Haaima, 1997) การดำเนินการดังกล่าวกับการตรวจการติดเชื้อของ เซอร์โคไวรัส PCV-2 ดังกล่าว เป็นของใหม่และไม่เคยดำเนินการมาก่อน

เทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่ได้รับการพัฒนาขึ้นในปี 2000 (Notomi et al., 2000) โดยอาศัย เทคนิคช่วยให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายใดๆ เกิดขึ้นที่อุณหภูมิคงที่ ทำให้ลดการ พังพาหรือการใช้งานของเครื่องบ่มอุณหภูมิที่ทำงานเป็นรอบ (thermo cycler) ที่เป็นอุปกรณ์ที่ จำเป็นในการเพิ่มปริมาณ DNA เมื่อต้องใช้เทคนิค PCR นอกจากนี้เทคนิค LAMP ยังช่วยให้การ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำได้ในเวลาอันสั้นน้อยกว่า 40 นาที และที่ผ่านมามีเทคนิค LAMP ได้นำไป

ประยุกต์ใช้ในการตรวจไวรัสในสัตว์หลายชนิด (Duke *et al.*, 2006, Enomoto *et al.*, 2005, Parida *et al.*, 2004)

การพัฒนาเทคนิคในครั้งนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อ 6 บริเวณของยีน ORF2 ของ เซอร์โคไวรัส PCV-2 ไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ เซอร์โคไวรัส PCV-2 ในทุกรายละเอียดของไพรเมอร์ และเมื่อนำไพรเมอร์ทั้งหมดมาใช้ในปฏิกิริยา พบว่าหากเงื่อนไขในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเกี่ยวข้องกับการจับตัวของไพรเมอร์ทั้ง 6 บริเวณสอดคล้องและต่อเนื่องกัน จะทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยความจำเพาะอย่างสูง ซึ่งผลจากการทดสอบยืนยันความสามารถของปฏิกิริยาว่าเป็นไปตามที่คาดไว้ การทดสอบชุดไพรเมอร์ทั้งในแง่ความจำเพาะของปฏิกิริยา ความไวของปฏิกิริยาให้ผลสนับสนุนประสิทธิภาพของวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดไพรเมอร์ดังกล่าวเทียบเท่าในระดับเดียวกันกับการตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค PCR (Ouardani *et al.*, 1999) ทำให้พบว่าชุดของไพรเมอร์ไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสชนิดอื่นๆในระบบการผลิตสุกร

ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของการศึกษาในครั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แม้ในตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้น จะมีสารพันธุกรรมของไวรัสดังกล่าว ในขอบเขตที่ใกล้เคียงกับ limit of detection คือ ที่ปริมาณ 100 โมเลกุลของดีเอ็นเอของยีน ORF2 ทำให้การตรวจสามารถดำเนินการได้อย่างถูกต้อง วิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้น ทำให้สามารถนำมาใช้กับตัวอย่างไวรัสที่อยู่ในรูปปะปนมากับซีรัม (serum) หรือตัวอย่างไวรัสที่พบในชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งทำให้การตรวจสามารถครอบคลุมชนิดของตัวอย่างในฟาร์มที่มักนิยมใช้เป็นตัวอย่างในการส่งตรวจได้เป็นอย่างดี

ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดเท่ากับผลคูณของช่วงความยาวของไพรเมอร์คู่นอก สอดคล้องกับรูปแบบของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเออุดมคติที่เป็นลักษณะเฉพาะที่ได้จากเทคนิค LAMP ซึ่งดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบได้ 3 รูปแบบได้แก่ การนำมาแยกในสนามไฟฟ้า การทำปฏิกิริยาร่วมกับ DNA binder และการตรวจสอบโดยเทคนิค nucleic acid hybridization ด้วย DNA analog probe ซึ่งเทคนิคหลังนี้ได้พัฒนาขึ้นภายใต้โครงการวิจัยในครั้งนี้ โดยอาศัยประสบการณ์ของผู้วิจัยที่ดำเนินการกับการตรวจไวรัสบางชนิด แม้ว่าในอดีต มีรายงานการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้หลังปฏิกิริยา LAMP จากการตรวจสอบตะกอนขุ่นอันเนื่องมาจาก by products ของปฏิกิริยาในรูปตะกอน magnesium pyrophosphate (Mori *et al.*, 2001) แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้นำรูปแบบดังกล่าวมาใช้งาน เนื่องจากการสังเกตตะกอนจะมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคลทำให้ส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของผลทดสอบได้ การทดลองจึงมุ่งเน้นการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วย DNA binder ซึ่งได้เลือกใช้ SYBR Green I ด้วยเหตุผล 3 ประการ ได้แก่ ประสิทธิภาพทางการส่งสัญญาณดีเอ็นเอที่สูงกว่าโมเลกุลอื่นในกลุ่มเดียวกัน ความง่ายในการเข้าถึงสารเคมีดังกล่าว และต้นทุนต่อหน่วยสำหรับการตรวจ

การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอจากการทดลอง ให้ผลสอดคล้องไปกับผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอโดยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า ผลการทดลองดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึง

ความสามารถในการปรับประยุกต์ ที่ช่วยให้ลดขั้นตอนการตรวจหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลงได้ ซึ่งการลดขั้นตอนดังกล่าว ช่วยให้ประหยัดเวลาลงไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง ช่วยลดปริมาณสารเคมีและค่าใช้จ่ายลง และช่วยลดโอกาสในการปนเปื้อนด้วยสารก่อมะเร็งที่มักนิยมใช้ในขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าลงได้

ส่วนเทคนิคการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา nucleic acid hybridization ด้วย DNA analog probe ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจยีน ORF2 ของเชื้อไวรัส PCV 2 ซึ่งดำเนินการในครั้งนี้เป็นนวัตกรรมที่อาศัยการจับตัวของ analog probe ที่มีคุณสมบัติแตกต่างไปจาก DNA probe ทั่วไป เนื่องจากแกนกลางของโมเลกุลอยู่ในรูป *N*-(2-aminoethyl) glycine ทำให้โครงสร้างของ analog nucleic acid ที่ใช้เป็น probe นี้ไม่มีประจุ ขณะที่ยังคงมีการจับตัวของโครงสร้างเบส A C G T กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นคู่สมได้ตามปกติ ซึ่งส่งผลในภาพรวมให้การจับตัวของ analog nucleic acid probe นี้จับตัวได้แน่นและเสถียรกว่าดีเอ็นเอด้วยกัน (Nielson and Haaima, 1997) ที่สำคัญโครงสร้างแกนกลางของโมเลกุลดังกล่าวมีสมบัติต่างไปจากดีเอ็นเอ จึงไม่ส่งผลกระทบต่อ การจับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายแม้อุณหภูมิของปฏิกิริยาจะต่ำกว่าค่า T_m ของดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลดังกล่าวทำให้ปฏิกิริยา nucleic acid hybridization เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิห้อง

การเลือกใช้ fluorophore ซึ่งได้แก่ FAM เข้าไปติดฉลากที่ตำแหน่งปลาย 5' ร่วมกับการเลือก fluorophore ที่เหมาะสมโดยการใช้ BHQ-1 ติดฉลากที่ปลายของโมเลกุล quencher ทำให้ทั้งสองโมเลกุลเมื่อจับกันมีการถ่ายทอดพลังงานกันอย่างเหมาะสม (Johansson *et al.*, 2002) ทำให้ไม่เกิดการเรืองแสง รูปแบบการใช้งานดังกล่าวไม่ต่างไปจากการนำความรู้เดียวกันมาใช้ในเทคนิค realtime-PCR แต่การใช้งานในครั้งนี้ได้ใช้รูปแบบการจับตัวแบบแข่งขันของโมเลกุลสายสั้นแทนผลการตรวจสอบทำให้เห็นการเรืองแสงขณะทำปฏิกิริยา hybridization กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่ให้ผลบวก โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นทันทีและสัญญาณการเรืองแสงดังกล่าวสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ภายหลังการตรวจสอบภายใต้เครื่องส่องเจดด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต การตรวจดังกล่าวเป็นไปตามหลักการ nucleic acid hybridization ซึ่งถือว่ามีความแม่นยำสูงสุดในวิธีการตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอณูชีววิทยาด้วยกัน (Anderson, 1999)

ผลการตรวจ PCR จากห้องปฏิบัติการอื่น พบว่าผลการตรวจที่ได้นั้นมีแตกต่างกันนั้นในแต่ละห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้อาจสืบเนื่องมาจากความแตกต่างของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจที่แตกต่างกัน (ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ คูในภาคผนวก) และอาจเกิดจากสภาวะแวดล้อม (amplification condition) ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ขนาดลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ก็มีความแตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ คือ มีขนาดลำดับเบส ประมาณ 700 และ 1,200 เบส ในขณะที่ ขนาดลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ อยู่ที่ประมาณ 400 เบส และจากการนำตัวอย่าง DNA ที่ได้ทำการสกัดแล้ว พร้อมทั้งชนิดของไพรเมอร์และสภาวะแวดล้อมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ไปให้ห้องปฏิบัติการชันสูตรหน่วยโรคสุกร ภาควิชาอายุรศาสตร์ ทำ

การทดสอบในครั้งที่ 2 และให้ผลการตรวจตัวอย่างที่ตรงกัน สามารถบอกได้ว่าไพโรเมอร์และสถานะแวดล้อมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษานี้ ทำได้จริงนอกเหนือจากคณะผู้วิจัย

ปัญหาและอุปสรรค

ในระหว่างการดำเนินงาน ทางคณะผู้วิจัยได้พบกับอุปสรรคในเรื่องการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างและการดำเนินการวิเคราะห์ โดยเฉพาะในช่วงที่เกิดอุทกภัยครั้งใหญ่ ทำให้ไม่สามารถลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างซ้ำได้ และในช่วงดังกล่าว สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทำงาน ซึ่งจำเป็นที่จะต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิประมาณ -20°C จำเป็นต้องเคลื่อนย้ายไปเก็บในสถานที่อื่น เพื่อป้องกันปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นได้ในช่วงเวลาดังกล่าว ทำให้ทางคณะผู้วิจัยต้องเคลื่อนย้ายอุปกรณ์และสารเคมีไปเก็บรักษาที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีระบบสำรองไฟฟ้าตลอด 24 ชั่วโมง และเป็นพื้นที่ที่อยู่บนภูเขาสูง และคาดว่าจะไม่มีปัญหาเรื่องน้ำท่วม ส่งผลให้การดำเนินงานในช่วงเวลาดังกล่าว จำเป็นต้องหยุดกิจกรรมต่างๆลงชั่วคราว ทำให้การดำเนินงานล่าช้าไปจากแผนการเดิมประมาณ 2 เดือน

อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ ยังสามารถบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ได้เสนอมาดังแต่ต้น คือสามารถพัฒนาชุดตรวจดีเอ็นเอเซ็นเซอร์อย่างรวดเร็วสำหรับการตรวจเชื้อเซอร์โคไวรัสในสุกรได้