2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษา genetic determinant ของไวรัสไข้หวัดนกที่ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3. วิธีการทดลอง

3.1. Selection of virus that grow poorly at 40 °C

ได้ทำการเลี้ยงไวรัส H5N1 2 isolates (H5N1 (A/Thailand/5(KK-494)/2004(H5N1) และ H5N1 (A/Thailand/3(SP-83)/2004(H5N1)) ให้เจริญใน MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ณ อุณหภูมิ 33-25 °C หลายๆ passage เพื่อให้ได้ไวรัสที่เมื่อเทียบกับ wild type แล้วเป็นไวรัสที่มีความสามารถในการเจริญใน MDCK ที่ 40 °C ลดลง แต่เจริญได้ที่ 37 °C ไม่แตกต่างจาก wild type โดยลักษณะ phenotype ของไวรัสได้ถูกตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอจนได้ไวรัสที่มีลักษณะตามต้องการ นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบ kinetics growth curve ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C เทียบกับ wild type เพื่อให้แน่ใจว่าได้ไวรัสที่สามารถเจริญเติบโตได้พอๆกับ wild type ที่อุณหภูมิ 37 °C แต่เจริญเติบโตได้น้อยลงที่อุณหภูมิ 40 °C (ซึ่งเป็นลักษณะที่พบใน human influenza virus) ในการทดลองนี้ไวรัสได้ถูกเลี้ยงในห้อง BSL-3 โดยใช้ class II biosafety cabinets และในทุกการทดลองได้ทำการเลี้ยงเชื้อไวรัส wild type ที่อุณหภูมิ 40 °C ควบคู่กันไปทุกครั้งเพื่อเป็น internal control ว่าการลดความสามารถในการเจริญของไวรัสที่ 40 °C มิได้เกิดจากสภาวะหรือเทคนิคที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ แผนผังและรายละเอียดการเลี้ยงไวรัสแสดงไว้ในรูปที่ 1

<u>วิธีการเลี้ยงไวรัส</u>

1. เลี้ยงเซลล์ Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) ปริมาณ $5x10^6$ เซลล์ใน T75 flask ($2x10^6$ ใน T25 flask) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 10% MEM media เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ล้างเซลล์ด้วย 1X Minimum Essential Media (MEM) containing 1 ug/ml L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK) trypsin จำนวน 2 ครั้ง ก่อนทำการ adsorb ไวรัส
3. ทำการ adsorb เชื้อโดยเติม 1X MEM containing 1 ug/ml TPCK trypsin 1ml แล้วเติมเชื้อตาม Muitiplicity Of Infection (MOI) ที่คำนวณไว้ แล้วincubate ที่ 33,30, 27,25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลาเติม media 1X MEM containing 1 ug/ml TPCK trypsin ให้ครบ 15 ml (T75 flask) หรือ 5 ml (T25 flask) จากนั้น incubate ที่ 33, 30,27,25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-96 ชั่วโมง
5. ปั่นน้ำเลี้ยงเชื้อให้ปราศจากการปนเปื้อนเซลล์ที่ 1500 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเก็บใส่ tube ละ 300 ul จากนั้นเก็บเชื้อไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

6. ทำการ passage ไวรัสที่ได้ลงในเซลล์ต่อไปเรื่อยๆ จนได้ไวรัสที่มี phenotype ตามที่ต้องการศึกษา โดยการทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 1

วิธีการทำ Plaque

1. เลี้ยงเซลล์ MDCK ปริมาณ $1x10^6$ เซลล์ใน 6 well plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 2 ml ของ 10% MEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ล้างเซลล์ด้วย 1X MEM 2 ครั้ง ก่อนทำการ adsorb ไวรัส
3. ทำการเจือจางเชื้อที่ต้องการทดสอบเป็น 10 fold dilution ตั้งแต่ -1 จนถึง dilution ที่ต้องการทดสอบ ด้วย 1X MEM
4. ทำการเติมเชื้อแต่ละ dilution จำนวน 100 ul ลงในหลุมเซลล์ที่ล้างเรียบร้อยแล้ว จากนั้นเติม media 1X MEM เพิ่มอีก 100 ul เพื่อป้องกันเซลล์แห้ง เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไป incubate ที่ 37 หรือ 40 องศาเซลเซียส แล้วทำการเขย่า plate ทุกๆ 15 นาที จนครบ 1.5 ชั่วโมง
5. ดูดเชื้อใน plate ทิ้ง แล้วทำการเติม 1X MEM containing 1% agarose 4 ml ลงในแต่ละ well
6. นำ plate ไปตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ plate ไป incubate ที่ 37 หรือ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
7. ทำการแคะวุ้นทิ้งแล้ว fix เซลล์ด้วย 10% formalin เป็นเวลา 1 ชั่วโมงถึงข้ามคืน จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำประปา 1 ครั้ง
8. ย้อมสีเซลล์ใน plate ด้วย 1% crystal violet เป็นเวลา 10-30 นาที , ดูดทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำประปาอีก 2 ครั้งแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

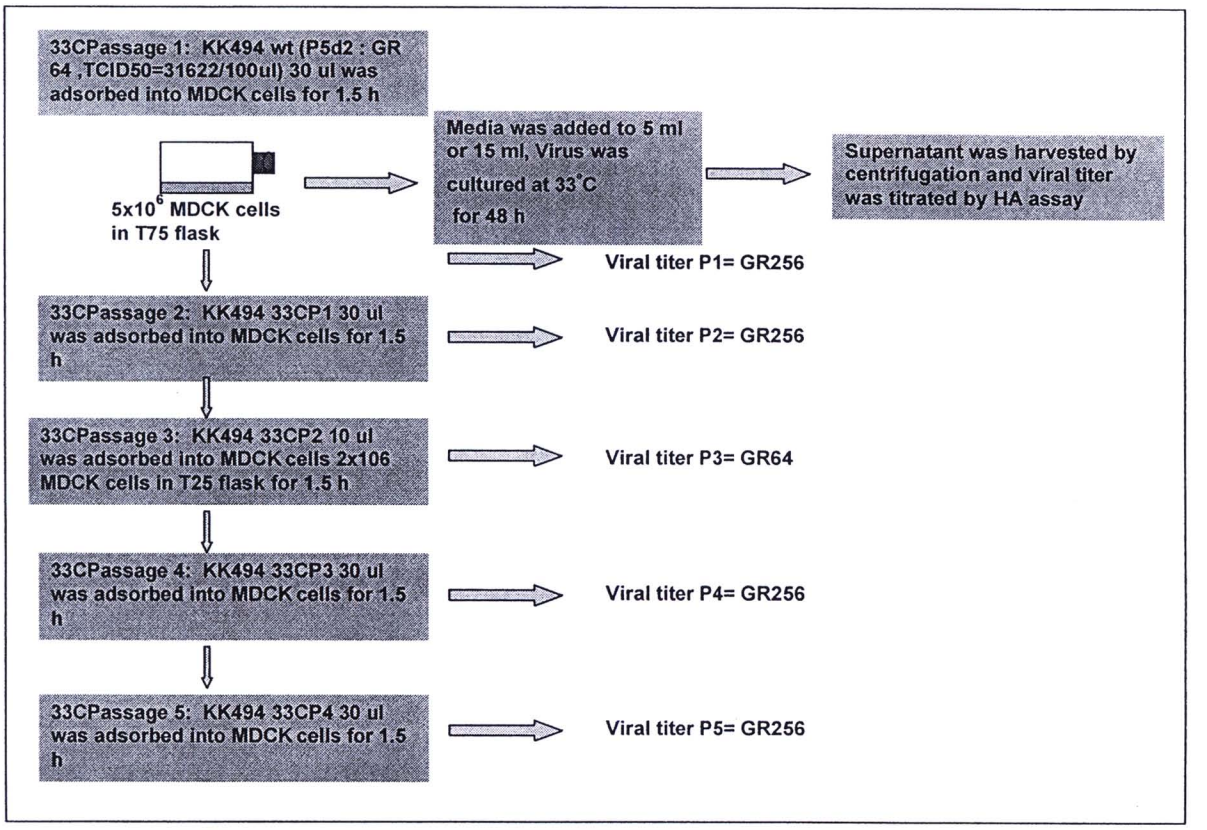
การทดสอบ Kinetic Growth curve

1. เลี้ยงเซลล์ MDCK ปริมาณ $5 x10^5$ เซลล์ใน 6 well plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 10% MEM media เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ล้างเซลล์ด้วย 2 ml ของ 1X MEM containing 1 ug/ml TPCK trypsin 2 ครั้ง ก่อนทำการ adsorb ไวรัส

3. ทำการadsorb เชื้อโดยเติมเชื้อตาม MOI ที่คำนวณไว้ (ในการทดลองนี้ใช้เท่ากับ 0.00016) จากนั้นเติม 1X MEM containing 1 ug/ml TPCK trypsin ให้ครบ 200 ul แล้ว incubate ที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

4. เมื่อครบเวลาเติม media 1X MEM containing 1 ug/ml TPCK trypsin ให้ครบ 2 ml incubate ที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส แล้วตามวัดปริมาณไวรัสด้วย Hemaglutination assay (HA assay) ที่เวลา 6, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนและรายละเอียดการเลี้ยงไวรัส KK494 Ts



รูปที่1 ภาพแสดงขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ KK494 (wt) ให้เป็น temperature sensitive (Ts) phenotype ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

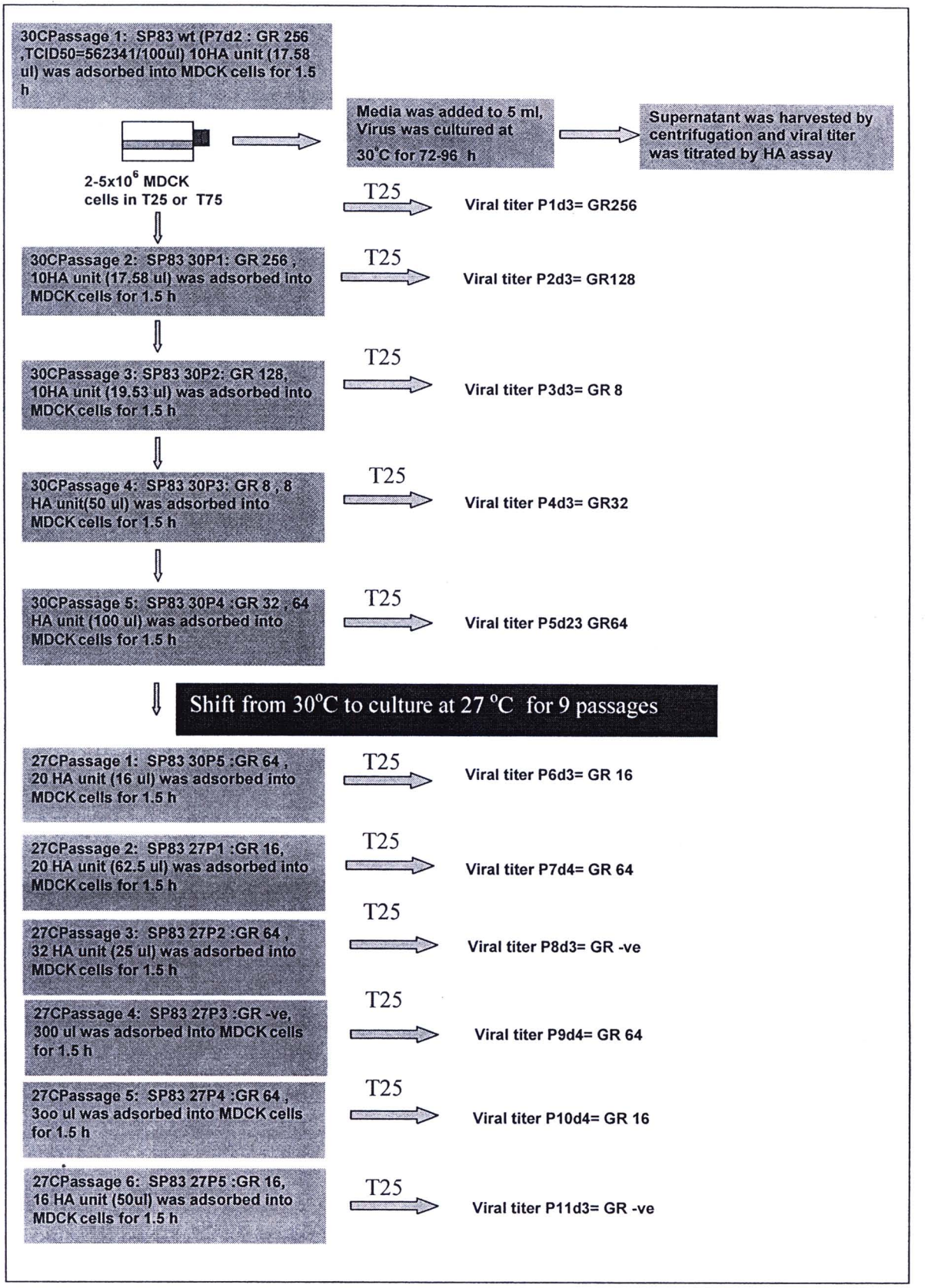
33CP1-P5 : ไวรัสที่ถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส passage ที่ 1 ถึง 5

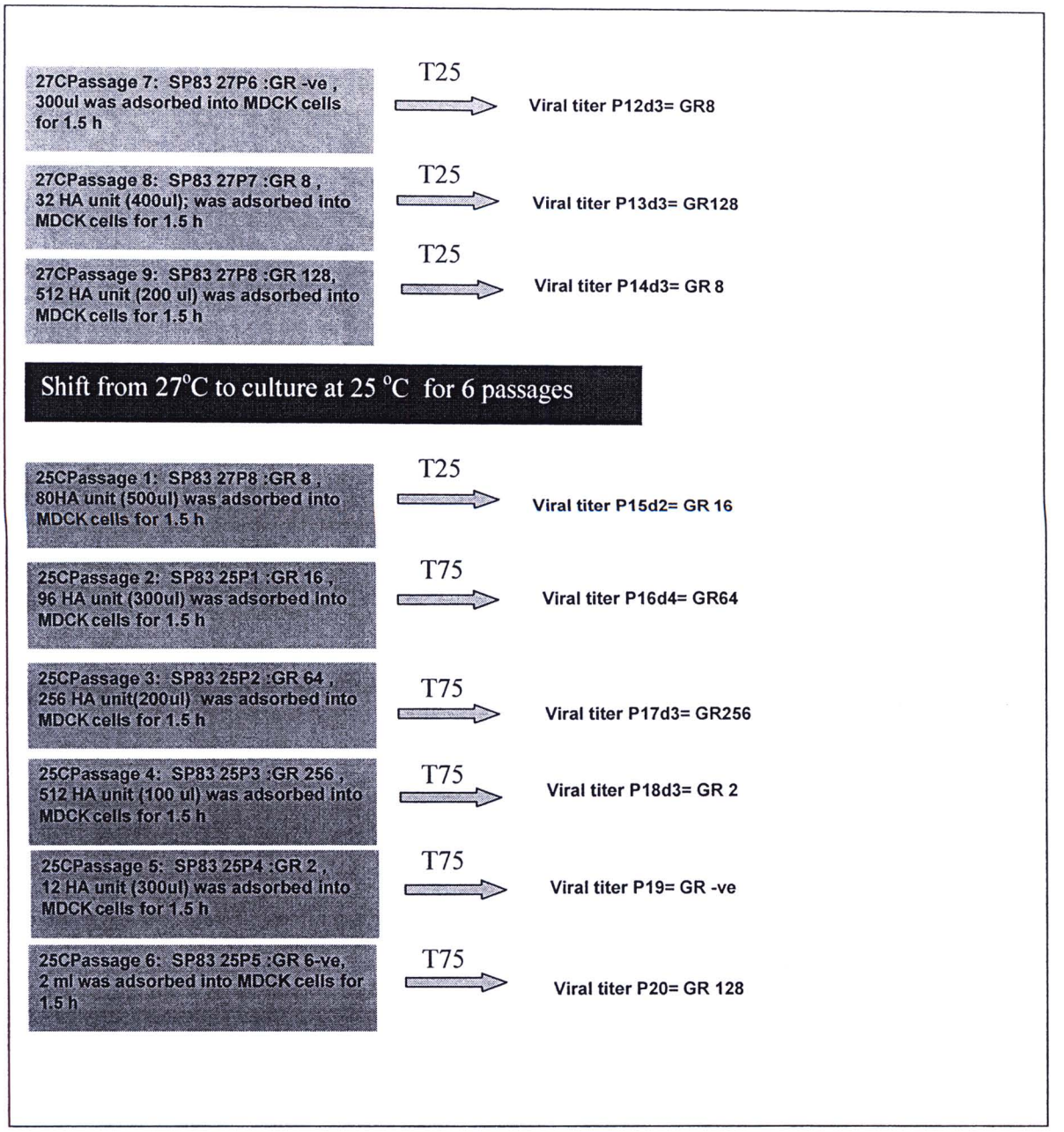
GR : ค่า HA titer ที่ใช้เลือดห่านในการ titrate ไวรัส ด้วย Hemagglutination assay (HA assay)

P : passage ในการเลี้ยงไวรัสในเซลล์ MDCK

TCID50 : 50% tissue culture infectious dose

ขั้นตอนและรายละเอียดการเลี้ยงไวรัส SP83 ts20





รูปที่ 2 ภาพแสดงขั้นตอนการเลี้ยงไวรัส A/Tailand/SP83/2004(H5N1) ณ อุณหภูมิ 30, 27 และ 25 °C ใน MDCK cell ให้ได้ไวรัส SP83 ts 20 ที่เจริญเติบโตได้ไม่ดี ณ อุณหภูมิ 40 °C

3.2. Identification of genetic determinant of growth at 40 °C of H5N1 (SP83 wt และ SP83 ts20)

เมื่อได้ไวรัสที่มีลักษณะ phenotype ที่ form plaque ขนาดเล็กที่ 40 °C แต่มี plaque ขนาดใกล้เคียงกับ wild type ที่ 37 °C แล้ว ไวรัสดังกล่าวถูกนำมาสกัด RNA เพื่อใช้สร้าง cDNA และนำไป clone expression plasmid ของแต่ละยีน และนำไปถอดรหัสสายพันธุกรรมของทั้งยีโนมเพื่อนำมาเทียบกับรหัสพันธุกรรมของ wild type virus เพื่อหาตำแหน่งของ nucleic acid ในยีนต่าง ๆของไวรัสที่แตกต่างออกไปจากไวรัสที่โตได้ดีที่ 40 °C หรือ ไวรัสที่ให้ plaque ขนาดใหญ่ ในขั้นสุดท้าย mutation ต่าง ๆแต่ละตำแหน่งจากไวรัสตัวใหม่ที่ได้นี้ถูกนำไปทดสอบว่าเป็น genetic determinant ที่ทำให้ไวรัสโตได้ไม่ดีที่ 40 °C จริงหรือไม่ โดยการ mutate plasmid gene ของ wild type ไวรัสให้มี genetic marker เหมือนไวรัสที่มี phenotype ในการเจริญที่ 40 °C ลดลง แล้วนำ plasmid ดังกล่าวไปสร้างไวรัสด้วยเทคนิค reverse genetic โดย reassort H5N1 expression plasmid ร่วมกับ ยีนของไวรัส PR8 เพื่อใช้ในการตรวจสอบ viral phenotype (kinetic growth curve) โดยเทียบการเจริญเติบโตของ reverse genetic virus ที่ได้ กับ wild type PR8 virus ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C ซึ่งการเปรียบเทียบ viral phenotype ของไวรัสทั้ง wild type และ mutant ที่ได้จากวิธี reverse genetic และการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อทั้งสองที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยนั้นจะใช้เป็น internal control ว่า mutation ที่เกิดขึ้นมีผลกระทบอย่างจำเพาะต่อการเจริญของเชื้อไวรัสที่ 40 °C จริง

RNA extraction

Virus culture supernatant จะถูกนำมาสกัด RNA ด้วย High Pure Viral Nucleic acid kit (Roach)

1. นำ viral supernanat 200 µl มาผสมกับ binding buffer supplemented with poly(A) 200 µl และ 50 µl of proteinase K จากนั้นทำการ vortex ทันทีและนำไป incubated ที่ 72 °C นาน 10 นาที.
2. ประกอบ high purefilter tube และ collection tube จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน high purefilter tube และนำไปปั่นที่ 8000g 1 นาที และทิ้งน้ำที่อยู่ใน collection tube และทำการเปลี่ยน collection tube อันใหม่
3. ล้าง high purefilter tube ด้วย inhibitor removal buffer 500 µl และนำไปปั่นที่ 8000 g 1 นาที และทิ้งน้ำที่อยู่ใน collection tube และทำการเปลี่ยน collection tube อันใหม่
4. ล้าง high purefilter tube ด้วย wash buffer 450 µl และนำไปปั่นที่ 8000 g 1 นาที และทิ้งน้ำที่อยู่ใน collection tube และทำการเปลี่ยน collection tube อันใหม่และล้างซ้ำด้วย wash buffer อีก 1 ครั้ง
5. ปั่น high purefilter tube ให้แห้งอีกครั้งที่ 13,000 g 1 นาที และทำการเปลี่ยน collection tube อันใหม่

6. เติม 50 µl elution buffer ลงใน high purefilter tube และ incubate ไว้ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 8000 g 1 นาที และนำไปวัดความเข้มข้น

การสังเคราะห์ cDNA synthesis ด้วยวิธี First Strand cDNA synthesis (Invitrogen)

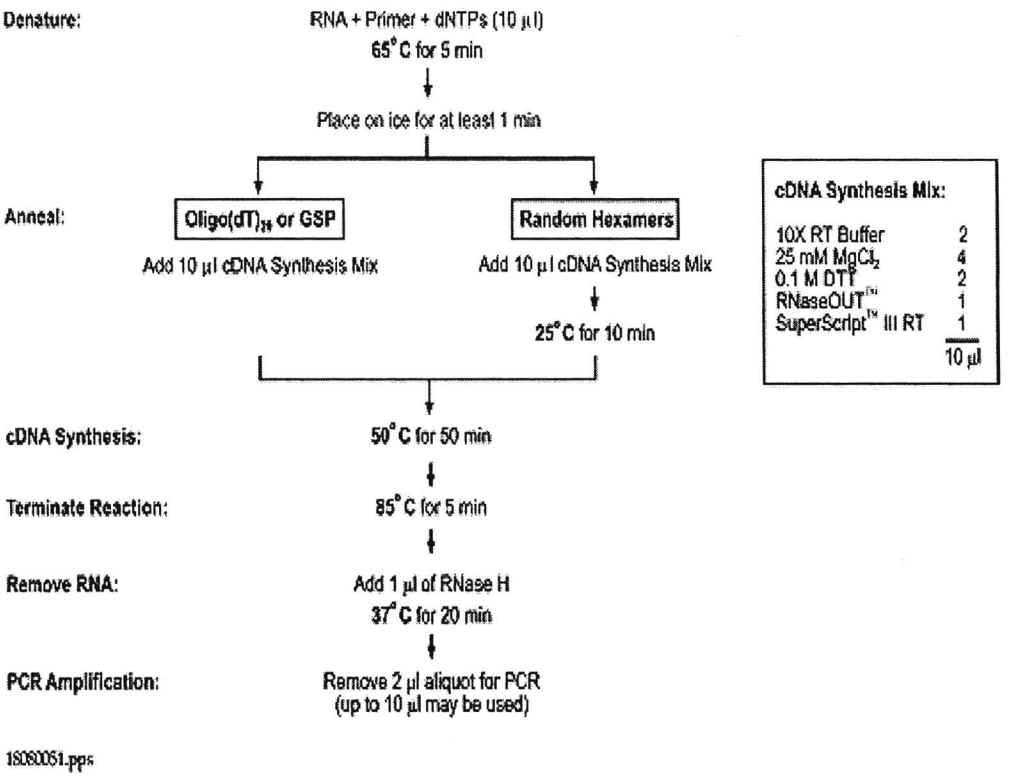
นำ RNA ที่สกัดได้ปริมาณ 1 µg มาสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีที่แสดงใน flow chart (รูปที่ 8) ซึ่ง cDNA ที่สังเคราะห์ได้จะถูกนำมาใช้ amplified influenza gene (PB2,PB1,PA,NP,M,NS) ด้วย Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) สำหรับ HA และ NA gene จะถูกสังเคราะห์ด้วยวิธี One Step RNA PCR kit (AMV) (TAKARA) โดย primer ที่ใช้ในการ amplified gene ทั้ง 8 ท่อนแสดงอยู่ในตารางที่ 1

ส่วนผสมของน้ำยาการสังเคราะห์ cDNA

-RNA	1 µg
-10mMdNTP	1 µl
-Random hexamer	1 µl
-10xRT buffer	2 µl
-25mM MgCl2	4 µl
-0.1 M DTT	2 µl
-RNase OUT™	1 µl
-Superscript™ III RT	1 µl
-Adjust total volume to	20 µl with DEPEC H_2O
-RNaseH	1 µl

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 22 มี.ค. 2555
เลขทะเบียน 246167
เลขเรียกหนังสือ



รูปที่ 3 แผนผังแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA ด้วยน้ำยา SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

<u>การสังเคราะห์ยีน HA และ NA ด้วยวิธี One Step RNA PCR Kit (AMV)</u>

นำ RNA ที่สกัดได้จาก culture supernatant ปริมาณ 1 µg มาผสมกับน้ำยาดังต่อไปนี้

-10X one step RNA PCR buffer	5	µl
-25mM	10	µl
-10mM dNTP	5	µl
-RNase inhibitor (40units/µl)	1	µl
-AMV RT (5 units/µl)	1	µl
-AMV optimized *Taq* (5 units/µl)	1	µl
-specific upstream primer (20 pmol/µl)	2	µl
-specific downstream primer (20 pmol/µl)	2	µl และเติม
-RNase free distilled H_2O จน total volume ครบ	50	µl

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่เครื่อง Thermocycle และตั้งค่า parameter ดังนี้ :

50°C 30 min,	reverse transcription
94 °C 2 min,	inactivation of RTNase
(94 °C 30s, 45 °C 30s, 72 °C 5 min) 3 cycles,	PCR cycle
(94 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 5 min) 32 cycles,	PCR cycle
72 °C 10 min	
hold ที่ 4 °C	

การสังเคราะห์ยีน PB2,PB1,PA,NP,M, และ NS ด้วยวิธี RT-PCR

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มา amplified specific gene โดยการทำ PCR ด้วย enzyme Platinum Taq DNA polymerase High Fedilty และใช้ primer ดังแสดงในตารางที่ 1

ส่วนผสมของน้ำยาที่ใช้

10x high fidelity buffer	5 µl
25mM $MgSO_4$	2 µl
10mM dNTP	5 µl
Specific upstream primer(20pmole)	2 µl
Specific downstream primer(20pmole)	2 µl
cDNA	2 µl
HIFI Taq	0.2 µl
H_2O	31.8 µl
Total volume	50 µl

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่เครื่อง Thermocycle และตั้งค่า parameter ดังนี้ :

94 °C 2 min,	denature
(94 °C 30s, 45 °C 30s, 68 °C 5 min) 3 cycles,	PCR cycle
(94 °C 30s, 55 °C 30s, 68°C 5 min) 32 cycles,	PCR cycle
72 °C 10 min	
hold ที่ 4 °C	

Table 1. Primer set used for RT-PCR amplification of the eight vRNAs of influenza A viruses

Gene	Forward primer	Reverse primer	Expected size [bp]
PB2	Ba-PB2-1: TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC	Ba-PB2-2341R: ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT	2341 + 29
PB1	Bm-PB1-1: TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA	Bm-PB1-2341R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTT	2341 + 29
PA	Bm-PA-1: TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC	Bm-PA-2233R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTT	2233 + 29
HA	Bm-HA-1: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	Bm-NS-890R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	1778 + 29
NP	Bm-NP-1: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTA	Bm-NP-1565R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT	1565 + 29
NA	Ba-NA-1: TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	Ba-NA-1413R: ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	1413 + 29
M	Bm-M-1: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	Bm-M-1027R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	1027 + 29
NS	Bm-NS-1: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTG	Bm-NS-890R: ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	890 + 29

The sequences complementary to the influenza sequences are shown in bold. The underlined nucleotides at the 3'-end represent the segment specific sequences. The 5'-end has recognition sequences for the restriction endonucleases *Bsm*BI (Bm) or *Bsa*I (Ba). These sequences increase the annealing temperature and allow the cloning of the PCR products into the cloning vector pHW2000. The HA reverse primer is identical to the NS reverse primer. Abbreviations: polymerase genes, PB2, PB1, PA; hemagglutinin gene, HA; nucleoprotein gene, NP; neuraminidase gene, NA; matrix gene, M; nonstructural gene, NS. The expected size of the PCR-products are based on the genome of A/PR/8/34 (H1N1)(+ non influenza sequences) and may vary slightly for other influenza A viruses

ตารางที่ 1 แสดง sequence primer ที่ใช้ในการ amplified influenza A gene ทั้ง 8 ท่อน (Hoffmann, Mahmood et al. 2005)

การสร้าง mutant pladsmid ด้วยวิธี DpnI mutagenesis

1. Denature 5 µg of recombinant plasmid ด้วย 1 M NaOH/ 1mM EDTA 10 µl แล้วนำไป incubated ที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที

2. ทำการตกตะกอน plasmid DNA ด้วยการเติม 3M sodium acetate (pH 4.8) 5 µl , ice-cold absolute ethanol 150 µl ลงใน DNA reaction แล้วนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา10 นาที

3. ปั่นล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol 150 µ1 แล้วนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา2 นาที

4. ละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำกลั่น 20 µ1 เมื่อตะกอน DNA แห้ง

5. นำ 25 ng/µl DNA template ไปทำ PCR ด้วย mutagenesis primer (ตารางที่ 2) ด้วย condition ดังนี้ denature 95°C for 1 นาที, 95°C: 30 วินาที, 40°C: 1 นาที และ 68°C : 10 min เป็นจำนวน 15 cycle และ 94°C:1 นาที, 40°C: 1 นาที, 72°C :10 นาที

6.นำ PCR product ที่ได้มาย่อยด้วย DpnI เพื่อทำลาย plasmid template

7. นำ product ที่ได้ transform เข้า JM109 จากนั้น extract plasmid DNA ที่ได้และนำไป sequence เพื่อยืนยัน mutation ที่ต้องการ

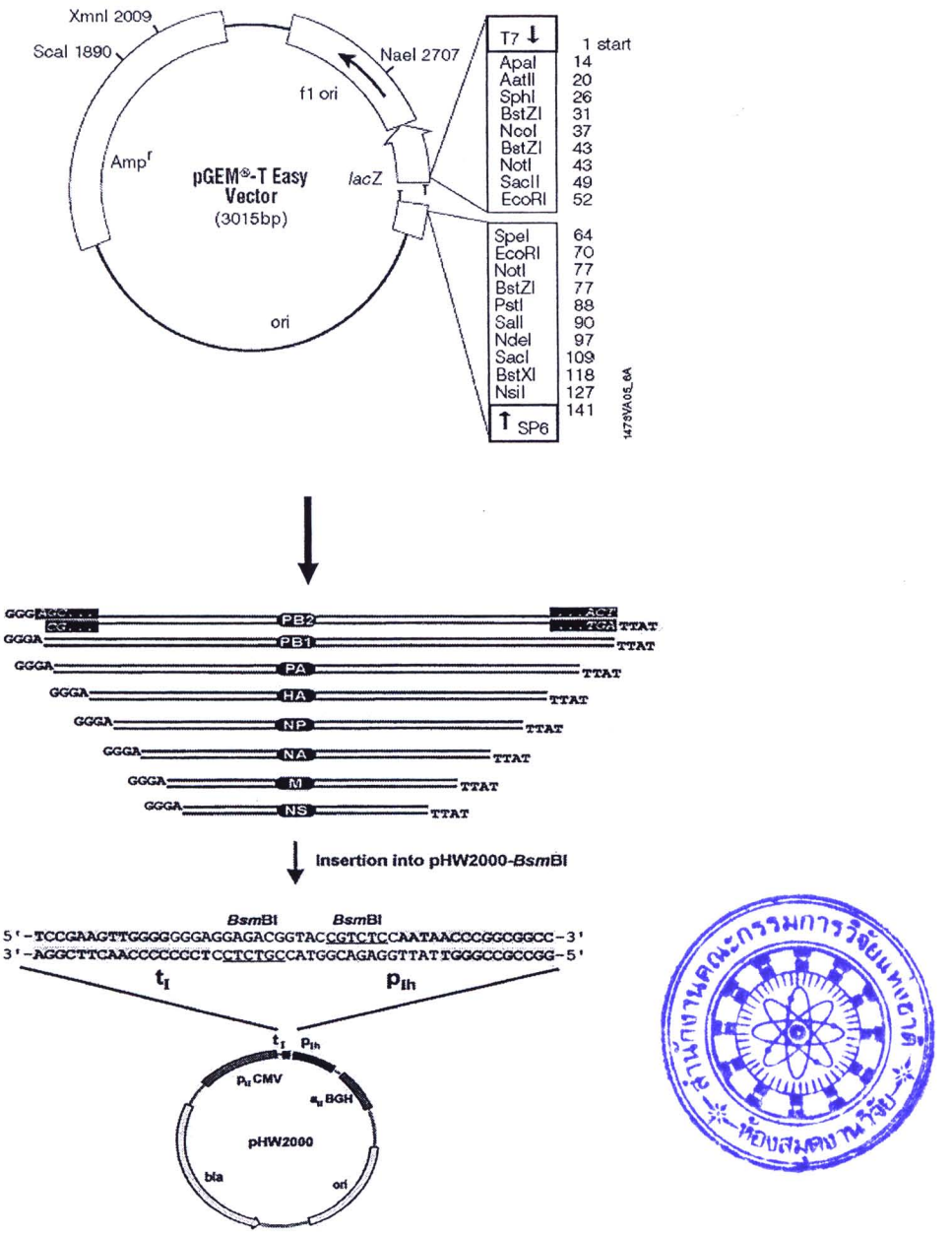
ตารางที่ 2 แสดง nucleotide sequence ของ primer ที่ใช้ในการทำ DpnI mutagenesis

Primers	Sequences of primer (5' to 3')
SP83-PB2 H194Q F	GAAAGAAGATCTCCAATATTGTAAGATTGCTC
SP83-PB2 H194Q R	GAGCAATCTTACAATATTGGAGATCTTCTTTC
SP83-PB2 Y195D F	GAAAGAAGATCTCCATGATTGTAAGATTGCTC
SP83-PB2 Y195D R	GAGCAATCTTACAATCATGGAGATCTTCTTTC
SP83-PB2 R591Q F	AGGCTGCCAGAGGTCAATACAGTGGATTTGT
SP83-PB2 R591Q R	ACAAATCCACTGTATTGACCTCTGGCAGCCT
SP83-PB2 H194Q, Y195D F	GAAAGAAGATCTCCAAGATTGTAAGATTGCTC
SP83-PB2 H194Q, Y195D R	GAGCAATCTTACAATCTTGGAGATCTTCTTTC
SP83-PB1 V397I F	AATAAGGCCTCTATTAATAGATGGTACAGCCTC
SP83-PB1 V397I R	GAGGCTGTACCATCTATTAATAGAGGCCTTATT
SP83-PB1 N554D F	CAGTTATTCATCAAGGACTACAGATACACAT
SP83-PB1 N554D R	ATGTGTATCTGTAGTCCTTGATGAATAACTG
SP83-PA E448A F	GGAACTATTTTACAGCGGAAGTATCCCATTG
SP83-PA E448A R	CAATGGGATACTTCCGCTGTAAAATAGTTCC
SP83-PA P550L F	TAGGAGACATGCTCCTCCGGACTGCAGTAGG
SP83-PA P550L R	CCTACTGCAGTCCGGAGGAGCATGTCTCCTA
SP83-NP N314S F	CAGCCAGGTCTTTAGTCTCATTAGACCAA
SP83-NP N314S R	TTGGTCTAATGAGACTAAAGACCTGGCTG

The underlined nucleotide represented the position of designed mutation.

วิธีการ cloning

PCR product ของ specific gene แต่ละท่อนจะถูก clone ใส่เข้าใน pGEMT easy vector และทำการคัดเลือก clone ที่ถูกต้องมาเพื่อตัดต่อ gene แต่ละ fragment ด้วย BsmBI หรือ BsaI แล้ว clone เข้าสู่ pHw2000 vector (รูปที่ 4) ซึ่งเป็น vector ที่จะใช้ในการสร้างไวรัสด้วยวิธี reverse genetic



รูปที่ 4 แผนผังแสดงขั้นตอนและ vector ที่ใช้ในการ clone influenza gene เข้าสู่ pGemTeasy vector และ pHw2000 vector

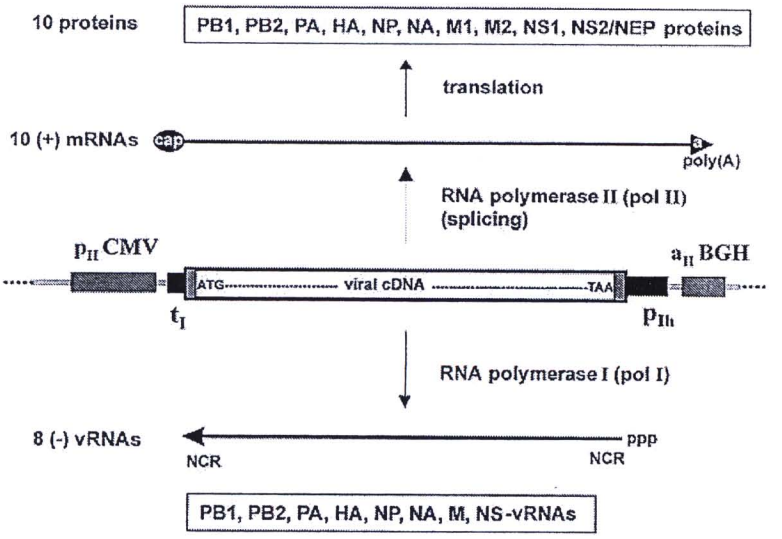
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

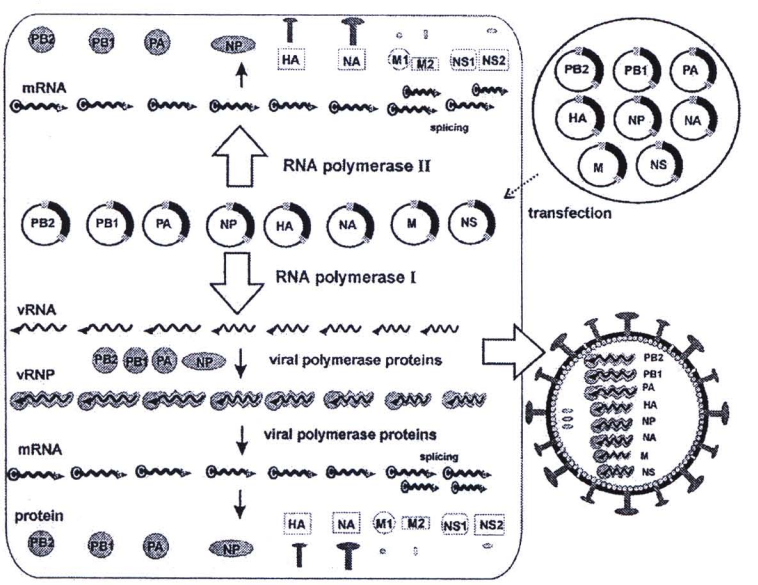
การสร้างไวรัสด้วยวิธี Reverse genetic

Plasmid pHw2000 ที่มีชิ้น genome ของไวรัส influenza จะถูกนำมาใช้สร้างไวรัสด้วยวิธี reverse genetic โดยใน plasmid ดังกล่าวจะมี pol I promoter ใช้สำหรับสร้าง genomic RNA และ pol II promoter ใช้สำหรับสร้าง mRNA เพื่อใช้เป็น template ในการ translate เป็น viral protein ดังแสดงในรูปที่ 5 สำหรับขั้นตอนการสร้างไวรัสมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ทำการผสม 293T กับ MDCK cell จำนวนเซลล์ละ $1.3x10^5$ ใน 2 ml ของ 1X opti-MEM และเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวลงใน 1 หลุมของ 6-well tissue culture plate เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
2. หลอดที่ 1 ทำการเติม DNA expression plasmid ทั้ง 8 plasmid ของเชื้อไวรัสที่ต้องการสร้าง construct ละ 1 μg ลงใน transfection media (500 μl opti-MEM) สำหรับ reassortant ไวรัสนั้นจะทำการผสม DNA expression plasmid ของยีนที่สนใจร่วมกับ DNA expression plasmid ของไวรัส PR8 construct ละ 1 μg

   หลอดที่ 2 ทำการเติม 18 μl ของ TransLT ลงใน 500 μl opti-MEM ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เมื่อครบเวลา นำส่วนผสมทั้งสองหลอดผสมเข้าด้วยกันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. ทำการล้างเซลล์ที่เลี้ยงไว้แล้ว 16-18 ชั่วโมงมาล้าง 2 ครั้งด้วย opti-MEM ครั้งละ 2 ml
4. นำส่วนผสมที่ได้จากข้อ2 มาเติมลงในเซลล์ แล้วนำไปอบที่ 37 °C เป็นเวลา 7 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลา นำplate มาดูด transfection reaction ออก จากนั้นเติม fresh opti-MEM อีก 1 ml แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาเติม opti-MEM ที่มี TPCK trypsin (2 μg/ml) อีก 1 ml เพื่อให้มีการ infection ของเชื้อ แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง
7. นำเซลล์ติดเชื่อมาส่องกล้องดู cytopathic effect (CPE) ที่เกิดขึ้น
8. นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการ transfection ปริมาณ 100-200 μl ไปฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 9 วันที่ allantoic sac แล้วนำไข่ไก่ฟักไปเลี้ยงไว้ที่ 33 °C เป็นเวลา 2-3 วัน และนอกจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้ออีกส่วน ปริมาณ 500 μl ไป infect MDCK ที่เลี้ยงไว้ใน 6 well plate โดย adsorb เชื้อไว้กับเซลล์ 90 นาที จากนั้นจึงเติม MEM ที่มี TPCK trypsin (1 μg/ml) ลงไปให้ครบ 2 ml แล้วนำไปเลี้ยงไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง
9. เมื่อครบเวลา 48-72 ชั่วโมง น้ำเลี้ยงเชื้อจากเซลล์จะถูกนำมาทดสอบหาไตเตอร์ของ HA ด้วยวิธี Hemagglutination โดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งทำเป็น two fold serial dilution แต่ละ dilution ปริมาณ 50 μl ผสมกับ 50 μl ของ 0.5 % เม็ดเลือดแดงห่าน แล้วนำไปวางไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 30-60 นาที จึงทำการอ่านไตเตอร์ของการเกิด hemagglutination ของน้ำเลี้ยงเชื้อ
10. สำหรับไข่ไก่ฟักที่เลี้ยงเชื้อไว้ครบ 48-72 ชั่วโมงแล้ว ให้นำไปแช่ที่ 4 °C ข้ามคืน จากนั้นทำการ harvest น้ำจากไข่ไก่ฟักและทำการทดสอบหาปริมาณไวรัส (HA titer) ใน allantoic fluid ด้วยวิธี Hemagglutination assay เช่นเดียวกับน้ำเลี้ยงเซลล์





รูปที่ 5 ภาพแสดงรายละเอียดของ pol I promoter และ pol II promter ใน pHw2000 plasmid ที่ใช้ในการสร้างไวรัสด้วยวิธี reverse genetic

ตารางที่ 3 ตารางแสดง reassortant ไวรัสที่สร้างด้วยวิธี reverse genetic ที่ใช้ในการศึกษา

Gene substitution	Reassortant PR8 virus with	
	SP83 wt	SP83 ts20
PB1	rPB1wt-PR8	rPB1ts-PR8
PB2	rPB2wt-PR8	rPB2ts-PR8
		rPB2ts-194-PR8
		rPB2 ts-195-PR8
		rPB2 ts-591-PR8
PA	rPAwt-PR8	rPA ts-PR8
NP	rNPwt-PR8	rNP ts-PR8

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย