เอนไซม์นิวรามินิเดส (neuraminidase, NA) เป็น glycoprotein ที่ผิวของอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยทำหน้าที่ตัดพันธะ α (2,3) หรือ α (2,6) glycosidic ที่เชื่อมระหว่างบริเวณปลาย sialic acid ของ host cell receptor ที่จับกับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin, HA) ของไวรัส ทำให้ไวรัสที่สร้างขึ้นใหม่ถูกปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบระดับทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดสหรือ NA activity ของไวรัส A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) และไวรัส A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ประกอบด้วย NA subtype ชนิดเดียวกัน และเพื่อเป็นการลดปัจจัยที่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีน NA อันเนื่องมาจากชิ้นส่วนที่มียีนอีก 7 เส้นของไวรัสเอง จึงได้ทำการสร้างไวรัสลูกผสม H1N1-NA-H5N1 ให้มียีน NA มาจากไวรัส H5N1 และอีก 7 ชิ้นส่วนที่มียีนที่เหลือทั้งหมดมาจาก A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) โดยวิธี reverse genetics และไวรัสลูกผสมที่ได้นั้นจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับไวรัสสายพันธุ์ปกติ ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสที่ 1 unit NA activity ด้วยวิธี plaque assay พบว่าไวรัส H5N1 มี NA activity น้อยที่สุด คือมีปริมาณไวรัสเท่ากับ 2.13×10^7 PFU/ml ซึ่งมากกว่าไวรัส H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 ที่มีปริมาณไวรัสเท่ากับ 1.15×10^6 PFU/ml และ 1.68×10^6 PFU/ml ตามลำดับ และจากการตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี real-time RT-PCR พบว่าไวรัสสายพันธุ์ H1N1-NA-H5N1 มี NA activity น้อยกว่าไวรัสสายพันธุ์ H1N1 คือมีค่า Ct เป็น 13.54 และ 16.00 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาลักษณะทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์พบว่าไวรัสทั้งสามสายพันธุ์มีค่า *Vmax* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่า *Km* นั้นพบว่าไวรัส H1N1-NA-H5N1 มีค่าสูงกว่าไวรัสสายพันธุ์ปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเร็วสูงสุดของการเกิดปฏิกิริยานั้นไม่ขึ้นต่อโครงสร้างที่แตกต่างกันระหว่างไวรัสทั้งสายพันธุ์ H1N1 และ H5N1 ในขณะที่คุณสมบัติในการรวมตัวของเอนไซม์กับสารตั้งต้นนั้นน่าจะมียีนอื่นๆ ของไวรัสเกี่ยวข้องด้วย จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายีน NA ของไวรัส H5N1 สายพันธุ์ A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) มี NA activity ต่ำกว่าของไวรัสสายพันธุ์ A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การศึกษานี้จัดว่าเป็นการรายงานครั้งแรกที่เปรียบเทียบ NA activity ของไวรัส H1N1 และ H5N1 โดยวิธี reverse genetics ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่ายีน NA มีการแสดงออกในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส H1N1 มากกว่าในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส H5N1

Neuraminidase (NA) is an envelope surface glycoprotein of influenza A viruses. It cleaves α-(2,3) or α-(2,6) glycosidic linkage between a terminal sialic acid residue of the host cell receptor and hemagglutinin of the viral envelope, thus releasing viral progeny from the infected cell. In this study, a reassortant virus (H1N1-NA-H5N1) containing the NA gene from A/duck/Phitsanulok/ NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) virus and seven remaining genetic segments from A/ Puerto Rico/8/1934 (H1N1) was constructed using reverse genetic technique. The NA activity of the reverse genetic virus was compared with the wild type. The result of plaque assay which quantitative measurement of 1 unit NA activity showed that the H5N1 virus was $2.13x10^7$ PFU/ml which was the lowest NA activity among them, and the H1N1 and H1N1-NA-H5N1 were $1.15x10^6$ PFU/ml and $1.68x10^6$ PFU/ml, respectively. The Real-Time RT-PCR showed that the NA activity of H1N1-NA-H5N1 was lower than that H1N1. The Ct values of H1N1-NA-H5N1 and H1N1 were 13.54 and 16.00, respectively. The kinetic properties of NA showed that *Vmax* values of H1N1, H5N1 and H1N1-NA-H5N1 were not significantly different. *Km* value was higher for H1N1-NA-H5N1 relative to those value of wild type. It could suggested that the maximum velocity of the enzyme activity does not depend on the viral structure which is different between the H1N1 and H5N1 virus, whereas the binding property of the enzyme may be affected by other viral genetic factors. This study indicated that NA activity of H1N1-NA-H5N1 virus was lower than that of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), and NA activity of A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) was the lowest among them ($p<0.05$). To our knowledge, this is the first comparative study of NA activity of H1N1 and H5N1 virus using reverse genetic technique. It also indicates that the NA gene may be expressed at a higher level in the H1N1 infected cell than the H5N1 infected cell.