



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาวัคซีนไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยเทคนิค reverse genetics (rg H5N1)

Development of Reverse Genetics Derived Avian Influenza H5N1 (rgH5N1)

นามผู้วิจัย นางสาวจุฑารัตน์ ลิดจันทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิงพรทิพา เล็กเจริญสุข, Ph. D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิงศิริวรรณ พราพงษ์, Ph. D.)

กรรมการ

()

กรรมการ

()

กรรมการ

()

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิงศิริวรรณ พราพงษ์, Ph. D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเชื้อไวรัสวัคซีนไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยเทคนิค reverse genetics (rg H5N1)

Development of Reverse Genetics Derived Avian Influenza H5N1 (rgH5N1) Virus Vaccine

โดย

นางสาวจุฑารัตน์ ลิดจันทร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2551

จุฬารัตน์ ลิดจันทร์ 2551: การพัฒนาเชื้อไวรัสวัคซีนไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยเทคนิค reverse genetics (rg H5N1) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิงพรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D.
77 หน้า

การผลิตวัคซีนป้องกันโรคไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากไวรัสธรรมชาติ ประสบปัญหาเนื่องจากไวรัสทำให้ไข่ไก่ฟักตายก่อน 24 ชั่วโมงทำให้ได้ผลผลิตต่ำ ส่วนวัคซีนที่ผลิตจากไวรัสชนิด H5 แต่เป็นสายพันธุ์อื่น (heterologous) มักจะให้ภูมิคุ้มกันไม่เต็มที่ การศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้เทคนิค reverse genetics ในการสร้าง seed virus vaccine โดยการโคลนยีน HA และ ยีน NA จาก HPAI H5N1 และยีนอีกหกท่อนจาก swine influenza A virus (H1N1) จะถูกใช้เป็นยีนแกนหลัก ทำการดัดแปลงยีน HA โดยทำการกำจัดส่วนของ polybasic amino acids บริเวณ cleavage site เพื่อลดความรุนแรงในการก่อโรค หลังจากนั้นทำการโคลนแต่ละยีนเข้าไปยังพลาสมิดที่แสดงออกได้สองทิศทาง (pDZ) และทำการสร้าง reassortant โดยใช้ พลาสมิด pDZ ที่มียีน HA ที่ผ่านการดัดแปลงแล้วและพลาสมิด pDZ ที่มียีน NA ของ HPAI H5N1 และ ยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ของ SIV H1N1 นำพลาสมิดทั้งสองอันเข้าเซลล์ผสมระหว่างเซลล์ 293T และ Madin-Darby Kidney (MDCK) อนุภาคไวรัส (rg H5N1) ที่เก็บจากสารละลายเหนือเซลล์ (supernatant) สามารถทำให้ไข่ไก่ฟักอายุ 10 วันติดเชื้อ ผลของการเพิ่มปริมาณสายพันธุ์รวมทั้งแปดท่อนด้วย RT-PCR พบว่าไวรัสมียีนครบทั้ง 8 ท่อน และประกอบด้วยยีน HA ที่ผ่านการดัดแปลงแล้วซึ่งไม่มี polybasic amino acid และยีน NA ของ HPAI H5N1 และ ยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ของ swine influenza virus (SIV) H1N1 ตามที่ต้องการ ไวรัสที่ได้จาก allantoic fluid มีไตเตอร์ 2×10^9 TCID₅₀/ml นอกจากนี้ไวรัสที่ได้สามารถทำให้เซลล์ MDCK ติดเชื้อและสามารถยืนยันการติดเชื้อได้ด้วยวิธี immunofluorescent test และการที่ไวรัสสามารถทำให้เกิด plaque ได้นั้นต้องอาศัย trypsin ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถพัฒนา seed virus สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ได้เป็นผลสำเร็จ

Jutarat Lidjun 2008: Development of Reverse Genetics Derived Avian Influenza H5N1 (rgH5N1) Virus Vaccine. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Porn Tippa Lekcharoensuk, Ph.D. 77 pages.

Production of vaccine against highly virulent avian influenza (HPAI) virus (H5N1) using wild type virus grown in embryonated chicken eggs results in low virus yield because the embryo dies before 24 hours. On the other hand, most of heterologous vaccines are not able to induce highly effective immunity. A reverse genetics technique was employed to produce seed HPAI H5N1 vaccine by cloning HA and NA genes derived from the HPAI H5N1 as the remaining six genes of swine influenza A virus (SIV) H1N1. Polybasic amino acids were removed from the cleavage site of HA gene to reduce pathogenicity. Each gene was cloned into bidirectional transcription plasmid (pDZ). The reassortants were created by transfecting modified HA and NA genes, from HPAI (H5N1), as well as PB2, PB1, PA, NP, M and NS genes from SIV (H1N1) into a mixture of 293T and Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. The rescued rgH5N1 in the supernatant over the transfected cells was infectious when inoculated into allantoic cavity of 10-day-old embryonated eggs. The results of RT-PCR using RNA templates isolated from the allantoic fluid demonstrated that the rescued virus contained all 8 gene segments comprising of the modified HA and NA genes derived from HPAI H5N1, and PB2, PB1, PA, NP, M and NS genes of SIV H1N1. The titer of virus in the allantoic fluid was as high as 2×10^9 TCID₅₀/ml. The rescued virus was infectious in MDCK cells as confirmed by immunofluorescent assay. In addition, plaque formation by rgH5N1 was trypsin dependent. These results show that we have successfully produced seed rgH5N1 virus vaccine for the production of HPAI H5N1 vaccine.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณรองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิงพรทิพา เล็กเจริญสุข ประธานกรรมการที่ปรึกษาหลัก ที่นอกจากจะให้โอกาสข้าพเจ้าได้ทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ ยังช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการทำงานวิจัย จนข้าพเจ้าสามารถทำงานวิจัยนี้เสร็จสิ้นในระยะเวลาไม่นาน ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และนอกจากนี้ยังเป็นแบบอย่างในการเป็นครูที่ดีและนักวิจัยที่ดี

และขอขอบคุณคุณวุฒิชัย มานะสเถียรกิจ สำหรับความมีน้ำใจและความเอื้อเฟื้อทางด้านความรู้ทางด้านเทคนิค Molecular genetics บางอย่างที่ข้าพเจ้ามองข้ามไป ขอขอบคุณสำหรับคำแนะนำและการอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยทุกอย่าง นอกจากนี้ที่ขาดไปไม่ได้เลยขอขอบคุณคุณคุณนันทวรรณ เพชรรัตน์ที่ช่วยเหลือข้าพเจ้าในงานด้านการเลี้ยงเซลล์ให้ข้าพเจ้ามีเซลล์ใช้ในงานวิจัย และช่วยในอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์เครื่องใช้ต่างๆ ตลอดจนงานวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกันคณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต ผู้ที่จัดประกายให้ข้าพเจ้าสนใจงานด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล รวมทั้งได้สอนพื้นฐานการทำวิจัยและเทคนิคต่าง ๆ ที่สำคัญให้กับข้าพเจ้า ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อข้าพเจ้าอย่างมากในการทำวิจัยในระดับปริญญาโทรวมถึงระดับปริญญาเอกของข้าพเจ้าในอนาคต

สุดท้ายขอขอบคุณพ่อแม่และแม่ที่สนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆ เรื่อง คอยให้กำลังใจยามเจอปัญหา ขอขอบคุณพี่ชายสำหรับความห่วงใยที่มีให้ และขอขอบคุณ คุณอัญลักษณ์ วชิรไชยการที่ช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จเป็นรูปเล่มได้

ท้ายที่สุดจริงๆ ขอขอบคุณทุกปัญหาทุกอุปสรรคที่สอนให้ข้าพเจ้าเข้าใจชีวิต

จุฑารัตน์ ลิคจันทร์

มิถุนายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	35
อุปกรณ์	35
วิธีการ	36
ผลและวิจารณ์	44
สรุปและข้อเสนอแนะ	52
สรุป	52
ข้อเสนอแนะ	53
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	54
ภาคผนวก	63
ภาคผนวก ก	64
ภาคผนวก ข	74
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรุปค่าใช้จ่ายของภาครัฐในการช่วยเหลือและชดเชยให้กับเกษตรกรจากการระบาดของไข้หวัดนก	5
2	มูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจของผู้ติดเชื้อไข้หวัดนกของประเทศไทย	6
3	ชนิดและโปรตีนของไข้หวัดใหญ่	9
4	ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้โคลนยีนแกนหลัก	40
5	ตำแหน่งของจุดตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใส่เข้าไปในสายพันธุกรรมของ SIV (H1N1) และขนาดของชิ้นยีนแกนหลักหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	42

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 รูปร่างลักษณะของอนุภาคไวรัส influenza A virus	8
2 โครงสร้างของ Hemagglutinin	13
3 โครงสร้างการจัดเรียงตัวของ influenza virus RNPs	16
4 บริเวณการแปลรหัสเป็นโปรตีนของ NS1 และ NS2	19
5 กระบวนการจำลองตัวเองของไวรัส	21
6 กลไกการเชื่อมระหว่างผนังเอนโดโซมและเชื้อหุ้มไวรัส	23
7 แสดงลำดับเบสบริเวณอนุรักษ์ของสายพันธุกรรมไวรัส (vRNA), messengerRNA และสายพันธุกรรมที่ใช้เป็นแม่แบบในการจำลองตัวเอง	23
8 แบบจำลองของโปรโมเตอร์บน RNA ของไวรัส (vRNA)	24
9 ขั้นตอนการสังเคราะห์ messengerRNA ของไวรัส	25
10 การทำให้ RT-PCR โดยไพรเมอร์ Uni12 และการเพิ่มจำนวนยีน influenza A virus โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะ	36
11 ขั้นตอนการโคลนยีน HA ในลักษณะ tri-molecular ligation	39
12 ขั้นตอนการโคลนยีนแกนหลัก (backbone) ของ SIV (H1N1)	41
13 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของยีน HA1, HA2 และ NA	44
14 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคลนของยีน NA ใน pGEM-T	45
15 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคลนของยีน NA ใน พลาสมิด pDZ	45
16 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคลนของยีน HA1	46
17 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคลนของยีน HA2	46
18 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคลนของยีน HA ที่ผ่านการดัดแปลงแล้ว	47
19 Alignment ระหว่างยีน HA ของสายพันธุ์รุนแรง, HA จากไวรัส rg1930 H5N1 และยีน HA ที่อยู่ในพลาสมิด pDZ	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	ภาพ MDCK cells ที่ถูก inoculate ด้วย rg1930 H5N1	48
21	Gel electrophoresis แสดง restriction analysis ของยีนทั้ง 8 ท่อนของ rg1930 H5N1	49
22	ผลการทำIFA	50
23	ผล plaque assay	51

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

IFA	= Immunofluorescent assay
MAb	= Monoclonal antibody
IgG	= Immunoglobulin G
FITC	= Fluorescein isothiocyanate
CPE	= Cytopathic effect
TCID ₅₀	= 50% Tissue culture infective dose
MDCK	= Madin-Darby Canine Kidney cells
EID ₅₀	= 50% Egg infective dose

การพัฒนาเชื้อไวรัสวัคซีนไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยเทคนิค reverse genetics (rg H5N1)

Development of Reverse Genetics Derived Avian Influenza H5N1 (rg H5N1)

Virus Vaccine

คำนำ

นับตั้งแต่เกิดการระบาดของโรคไขหวัดนกจนถึงปัจจุบัน สร้างความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกและการส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกเป็นอย่างมาก ซึ่ง การควบคุมการระบาดของไขหวัดนกคือการทำลายไก่ในพื้นที่ที่ต้องสงสัย เพื่อเป็นการควบคุมการแพร่กระจายของโรค ส่งผลให้เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ในพื้นที่การระบาดสูญเสียรายได้ นอกจากนี้เกษตรกรจะสูญเสียโอกาสที่จะมีรายได้จากการเลี้ยงไก่อีกอย่างน้อยเป็นเวลา 6 เดือน สำนักวิจัยและวางแผน ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) ได้ประเมินไว้ว่าการที่ประเทศไทยไม่สามารถส่งออกไก่อได้ประมาณ 6 เดือน ต้องสูญเสียรายได้จากการส่งออกประมาณ 20,346 ล้านบาท คิดเป็น 0.53 % ของมูลค่าการส่งออกทั้งหมด (มรรคและอ้อมใจ, 2548) ทั้งนี้การระบาดของไขหวัดนกยังส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอื่นๆ อีกด้วย เช่น อุตสาหกรรมการท่องเที่ยวและบริการ เป็นต้น

ดังนั้นจึงควรที่จะมีมาตรการอื่นในการควบคุมโรคไขหวัดนกควบคู่ไปกับการเฝ้าระวังโรค และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคมากยิ่งขึ้น มาตรการหนึ่งที่น่าสนใจคือ การใช้วัคซีน ซึ่งมีข้อดีคือทำให้มีสัตว์ป่วยหรือตายลดลง ช่วยลดความสูญเสียของเกษตรกร อีกทั้งยังช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อสู่สิ่งแวดล้อม การผลิตวัคซีนโดยเทคนิค reverse genetics จะมีการดัดแปลงยีนของไวรัสให้มีความรุนแรงลดลง แต่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันเทียบเท่ากับสายพันธุ์ธรรมชาติเพราะมีความเหมือนกับสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทย

เมื่อมีการระบาดของไขหวัดนกเกิดขึ้น มาตรการที่ใช้ในการควบคุมโรค คือ การทำลายสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในการควบคุม HPAI แต่จะต้องกระทำอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงเมื่อตรวจพบว่าการติดเชื้อ หากทำลายช้าเกินไปจะทำให้ไวรัสมีโอกาสเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้ (พรทิพภาและคณะ, 2549) เชื้อไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ยังมีการระบาดในประเทศในแถบเอเชียหลายประเทศและมีการระบาดเป็นระลอก โดยมีเป็ดหรือสัตว์ปีกอื่นๆ เป็นพาหะ จึงเป็นการยากที่จะหยุดการระบาดของโรค (พรทิพภาและคณะ, 2549)

ซึ่งการใช้วัคซีนมีข้อดีคือจะช่วยลดปริมาณไวรัสในสิ่งแวดล้อมเมื่อมีการระบาดเพราะสัตว์ที่ได้รับวัคซีนจะขับเชื้อออกน้อยลง ทั้งนี้การใช้วัคซีนให้ได้ผลขึ้นอยู่กับหลายๆปัจจัย เช่น มีการกำหนดระยะเวลาในการใช้วัคซีนอย่างชัดเจนและควรทำร่วมกับมาตรการป้องกันและเฝ้าระวังโรคอย่างเคร่งครัด

กระบวนการการผลิตวัคซีนในปัจจุบันเป็นระบบไข่ไก่ฟัก (Egg-derived vaccine) แต่ไม่สามารถใช้ไวรัสสายพันธุ์รุนแรงมาผลิตวัคซีนโดยวิธีนี้ได้ เนื่องจากไวรัสจะทำให้ตัวอ่อนของไก่ตายในเวลารวดเร็วและเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน (Webby *et al.*, 2004; Horimoto *et al.*, 2006) หรือหากใช้ไวรัสสายพันธุ์รุนแรงดัดมาผลิตวัคซีนก็จะได้ผลผลิตต่ำ จึงมีการนำเอาเทคโนโลยีการสร้างไวรัสลูกผสมโดยเทคนิค reverse genetics ซึ่งเป็นเทคนิคที่สร้างไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อได้จากการโคลน complementary DNA (cDNA) และถูกนำมาใช้ในการสร้างไวรัสเพื่อผลิตเป็นวัคซีน ซึ่งสามารถสร้างไวรัสที่มีลักษณะโครงสร้างโปรตีนที่ผิวอนุภาคไวรัสเหมือนกับสายพันธุ์ที่ระบาดได้ โดยมีผลกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไวรัสได้ผลผลิตสูงซึ่งช่วยย่นระยะเวลาในการผลิตทำให้การพัฒนาวัคซีนซึ่งสามารถทำได้ในระยะเวลาอันสั้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์

สร้างไวรัสต้นแบบสำหรับการผลิตวัคซีนไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่มีความจำเพาะกับ
สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค reverse genetics

การตรวจเอกสาร

การระบาดและผลกระทบทางเศรษฐกิจ

มีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีกครั้งแรก เมื่อเดือนมกราคม 2547 ที่อำเภอบางปลาม้า จังหวัดสุพรรณบุรี เป็นเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์รุนแรง (Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI, virus) ชนิด H5N1 (เชิดชัยและคณะ, 2549) และระบาดเรื่อยมา แบ่งการระบาดเป็น 3 รอบ โดยรอบที่ 1 เริ่มจาก 23 มกราคม ถึง 24 พฤษภาคม พ.ศ. 2547 รอบที่ 2 เริ่มจาก 3 กรกฎาคม พ.ศ. 2547 ถึง 12 เมษายน พ.ศ. 2548 และรอบที่ 3 เริ่มจาก 1 กรกฎาคม ถึง 9 พฤศจิกายน พ.ศ. 2548 ระหว่างการระบาดได้มีการใช้มาตรการต่างๆ ในการยับยั้งความรุนแรงและควบคุมการแพร่กระจายของโรค อาทิเช่น การควบคุมการเคลื่อนย้ายสัตว์ปีก และ การทำลายสัตว์ปีกที่เป็นพาหะของโรค

มาตรการการทำลายสัตว์ปีกที่เป็นพาหะของโรคนั้นส่งผลกระทบอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการผลิตไข่ โดยในการระบาดที่ผ่านมา ยอดสะสมในการทำลายสัตว์ปีกนับถึงวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2547 มีจำนวน 26,964,393 ตัว ส่งผลกระทบต่อยอดการส่งออกสินค้ารวมในปี 2547 ซึ่งลดลง 22.9 พันล้านบาท (เชิดชัยและคณะ, 2549) นอกจากนี้รัฐบาลยังมีมาตรการช่วยเหลือเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ อาทิเช่น การพักชำระหนี้สิน การจ่ายค่าชดเชยความเสียหาย และการจัดหาพันธุ์ไก่แก่ผู้เลี้ยงไก่ที่ได้รับความเสียหาย เป็นต้น โดยคาดว่าจะต้องใช้งบประมาณราว 1,500 ล้านบาท (มรกตและอ้อมใจ, 2548)

นอกจากนี้มีการวิเคราะห์ความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เป็นตัวเงิน ค่าใช้จ่ายที่ภาครัฐให้การช่วยเหลือและเงินชดเชยให้กับเกษตรกร และมูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจขั้นต่ำจากการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อไข้หวัดนกของประเทศไทย ดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สรุปค่าใช้จ่ายของภาครัฐในการช่วยเหลือและชดเชยให้กับเกษตรกรจากการระบาดของ
ไข้หวัดนก

รายการ	ค่าใช้จ่าย (ล้านบาท)
ไก่ไข่	
ครั้งที่ 1 (มกราคม 2547 - พฤษภาคม 2547)	984,910,441.90
ครั้งที่ 2 (กรกฎาคม 2547 - เมษายน 2548)	6,733,824.11
ไก่เนื้อ	
ครั้งที่ 1 (มกราคม 2547 - พฤษภาคม 2547)	301,216,347.90
ครั้งที่ 2 (กรกฎาคม 2547 - เมษายน 2548)	4,005,101.10
รวม	1,296,865,715.01

ที่มา: สุรัชย์ (2550)

ตารางที่ 2 มูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจขั้นต่ำจากการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อไข้หวัดนกของประเทศไทย

รายที่	อายุที่เสียชีวิต (ปี)	อายุของการทำงาน (ปี)	รายได้เฉลี่ย (บาท)	มูลค่าความ สูญเสีย ขั้นต่ำ (บาท)
1	7	$60 - 23 = 37$	145,542	5,385,054.00
2	6	$60 - 23 = 37$	145,542	5,385,054.00
3	6	$60 - 23 = 37$	45,080	1,667,960.00
4	58	$60 - 58 = 2$	145,542	291,084.00
5	6	$60 - 23 = 37$	145,542	5,385,054.00
6	13	$60 - 23 = 37$	29,200	1,080,400.00
7	5	$60 - 23 = 37$	29,200	1,080,400.00
8	39	$60 - 39 = 21$	145,542	3,056,382.00
9	18	$60 - 23 = 37$	145,542	5,385,054.00
10	26	$60 - 26 = 34$	145,542	4,948,428.00
11	9	$60 - 23 = 37$	45,080	1,667,960.00
12	14	$60 - 23 = 37$	45,080	1,667,960.00
รวม				37,000,790.00

ที่มา: สุรัชย์ (2550)

นอกจากนี้การระบาดของไข้หวัดนกยังสร้างความเสียหายต่อเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมสัตว์ปีกและการส่งออกเนื้อไก่สดและผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก ประมาณการว่าประเทศไทยสูญเสียรายได้จากการทำลายไก่และการยกเลิกการนำเข้าเนื้อไก่สดและผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก เป็นมูลค่า 6-8 หมื่นล้านบาท และยังทำให้ผู้บริโภคลดความมั่นใจในการบริโภคสัตว์ปีก จากการบริโภค 13 กิโลกรัมต่อคนต่อปีลดลงเหลือ 8 กิโลกรัมต่อคนต่อปี ภายหลังการระบาดของไข้หวัดนก ประเทศญี่ปุ่นและสหภาพยุโรปได้ประกาศยกเลิกการนำเข้าเนื้อไก่สดแช่แข็งจากประเทศไทยส่งผลให้มีปริมาณการส่งออกลดลงจาก 388,913 ตัน เหลือ 26,137 ตัน และจากที่ประเทศญี่ปุ่นได้นำเข้าเนื้อไก่สดแช่แข็งจากไทยร้อยละ 37 ของปริมาณการนำเข้าทั้งหมด การนำเข้าลดลงเหลือเพียงร้อยละ

ละ 3 และจากที่เคยส่งออกเนื้อไก่สดแช่แข็งไปยังสหภาพยุโรปเป็นปริมาณร้อยละ 45 ของการนำเข้าเนื้อไก่สดแช่แข็ง การนำเข้าเหลือเพียงร้อยละ 4

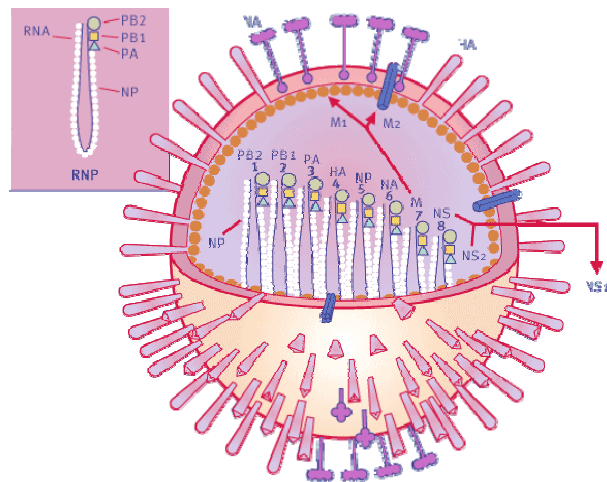
ผลกระทบของโรคไข้หวัดนกต่อการส่งออกสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก ทำให้อัตราการขยายตัวทางเศรษฐกิจ ในปี 2547 ลดลง 0.22 % ต่อปี คิดเป็นมูลค่าลดลง 2.29 หมื่นล้านบาท หรือมีการขยายตัวของการส่งออกลดลง 0.7% ต่อปี (พรทิพาและคณะ, 2549)

ไวรัสไข้หวัดนก

โรคไข้หวัดนก (bird flu หรือ avian influenza) เป็นชื่อโรคที่เรียกตามสาเหตุของไวรัสที่ทำให้เกิดโรค เนื่องจากเชื้อไวรัสชนิดนี้มีนกเป็นตัวแพร่เชื้อ ผู้ที่ได้รับเชื้อมีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเหมือนการได้รับเชื้อไข้หวัดใหญ่ แต่จะมีอาการรุนแรงกว่ามากและส่วนใหญ่จะเสียชีวิตในระยะเวลาอันสั้น (ภาวพันธุ์และประเสริฐ, 2549)

ลักษณะของไวรัสไข้หวัดนก

ไวรัสไข้หวัดนกจัดอยู่ใน Family *Orthomyxoviridae* สามารถแบ่งได้เป็น 3 สกุล (genera) ได้แก่ *Influenza A virus*, *Influenza B virus* และ *Influenza C virus* ซึ่งแบ่งตามความแตกต่างของโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 2 ชนิด คือ matrix protein (M) และ nucleoprotein (NP) (Girard *et al.*, 2005) อนุภาคของไวรัสประกอบด้วยสายพันธุกรรมชนิด RNA สายเดี่ยว สายลบ มีลักษณะเป็นท่อนจำนวน 8 ท่อน แต่ละท่อนจะพันอยู่กับ nucleoprotein (NP) ซึ่งรวมเรียกว่า ribonucleoprotein (RNP) สายพันธุกรรมแต่ละท่อนมีขนาดที่ต่างกันและถูกลอกรหัดเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่แตกต่างกันด้วย ดังแสดงในตารางที่ 3 RNP จะเรียงตัวเป็นเกลียว (helical nucleocapsid) ล้อมรอบด้วยเยื่อไขมัน (lipid bilayer) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเยื่อหุ้ม (enveloped) โดยชั้นนอกมี glycoprotein ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไวรัสแทรกอยู่ คือ Hemagglutinin (HA) และ Neuraminidase (NA) ชั้นในของเยื่อหุ้มมีโปรตีน Matrix (M) เรียงตัวอยู่ แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ M1 ทำหน้าที่เป็น membrane protein และ M2 ทำหน้าที่เป็น ion channel ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างผนังเยื่อหุ้ม รูปร่างลักษณะของอนุภาคไวรัสได้แสดงในภาพที่ 1 ซึ่งชนิดและหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิดได้สรุปไว้ในตารางที่ 3 Influenza A virus ถูกจำแนกเป็นสายพันธุ์ย่อย (subtype) โดยใช้ความแตกต่างระหว่างแอนติเจนของ surface glycoprotein สองชนิด ปัจจุบัน influenza A virus มี HA จำนวน 16 subtype และ NA จำนวน 9 subtype (Horimoto and Kawaoka, 2006)



ภาพที่ 1 รูปร่างลักษณะของอนุภาคไวรัส influenza A virus

ที่มา: Pasteur Institute of Iran Influenza Unit (2008)

ตารางที่ 3 ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนไวรัสไข้หวัดใหญ่

ตอนที่	ชนิดของโปรตีน	หน้าที่
1	PB2	จดจำ M^7 -GpppX ^m N ^m (cap) RNA ของ host เป็นส่วนประกอบของ RNA transcriptase
2	PB1	เป็นส่วนประกอบของ RNA transcriptase และ replication complex, เร่งปฏิกิริยาการต่อสายยาวของนิวคลีโอไทด์
3	PA	เป็นส่วนประกอบของ RNA transcriptase และ replication complex และยังไม่ทราบหน้าที่ที่แท้จริง
4	HA	เป็นไกลโคโปรตีนหลักบนผิวอนุภาคไวรัส เป็นบริเวณที่จับกับ receptor (sialic acid)
5	NP	จับกับ RNA เพื่อทำให้เกิด ribonucleoprotein เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ RNA ของไวรัส
6	NA	เป็นไกลโคโปรตีนบนผิวหน้าของอนุภาคไวรัสอีกชนิดหนึ่ง
7	M1	เป็นโปรตีนที่อยู่ใต้ lipid bilayer
	M2	ทำหน้าที่เป็น ion channel
8	NS1	ยับยั้งกระบวนการ polyadenylation และ pre-mRNA splicing อีกทั้งยับยั้งการทำงานของ interferon
	NS2	จับกับ M1 ทำหน้าที่ส่ง RNPs ออกนอกนิวเคลียส

ที่มา: ภาพพันธ์และประเสริฐ, 2549

สายพันธุ์กรรมและโปรตีน Polymerase

เนื่องจาก influenza A virus มีสายพันธุ์กรรมเป็น RNA สายลบ การลอกรหัส (transcription) เป็น mRNA และการจำลองสายพันธุ์กรรม (replication) เป็นสาย vRNA ของไวรัส จะเกิดโดยการทำงานของเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase complex ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน 3 ชนิด คือ PB2, PB1 และ PA เอนไซม์ชนิดนี้ไม่มีคุณสมบัติตรวจสอบความถูกต้อง (proof reading) ดังนั้นในระหว่างขั้นตอนการจำลองสายพันธุ์กรรมอาจเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) มีการประมาณว่ามีอัตราการกลายพันธุ์ประมาณ 10^{-4} ต่อเบสต่อการจำลองสายพันธุ์กรรมหนึ่งรอบ หรือ

เกิดความผิดพลาดทุกๆ 10,000 เบส (ภาวะพันธุ และประเสริฐ, 2549; Lewis, 2006) ซึ่งเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase complex ถูกแปลรหัสมาจากสายพันธุกรรมของไวรัส 3 ท่อน คือ PB2, PB1 และ PA (ท่อนที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) จากการใช้เทคนิค isoelectric focusing gel พบว่ามีโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง 2 ชนิด คือ Protein base (PB) 1 และ PB2 และโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด คือ Protein acid (PA) RNA ท่อนที่ 1 และ 2 มีความยาว 2,341 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้โปรตีนยาว 759 กรดอะมิโน (PB2) และ 757 กรดอะมิโน (PB1) ส่วน RNA ท่อนที่ 3 มีความยาว 2,233 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 716 กรดอะมิโน โดยที่ PB2 มีหน้าที่จดจำ cap บน pre-mRNA ของเซลล์เจ้าบ้าน (host) มีสามรายงานที่ระบุถึงตำแหน่งการจับของ cap รายงานแรกระบุว่าเป็นตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 533-564 (Li *et al.*, 2001) รายงานที่สองระบุว่ามีสองโดเมน คือ residues 242-282 และ 538-577 (Honda *et al.*, 1999) ส่วนรายงานสุดท้าย ระบุว่า aromatic residues สองตัว (F363 และ F404) จำเป็นสำหรับการจับกับ cap แบบ aromatics sandwich (Fodor *et al.*, 2004) นอกจากหน้าที่ ในการ transcription PB2 ยังเกี่ยวข้องกับการ replication เพราะว่าการ mutation ใน PB2 มีผลกระทบต่อ การ replication แต่ไม่มีผลต่อการ transcription ส่วน PB1 มีหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์เข้ามาต่อให้เป็นสายยาว (polymerization) ในขั้น elongation ซึ่ง PB1 จะต้องจับกับปลายทั้งสองของ vRNA และ cRNA เพื่อเริ่มการ transcription และ replication การจับระหว่างปลาย 3' ของ vRNA จะกระตุ้น endonuclease activity ของ PB1 ในขั้นตอนการสร้าง capped primer ในกระบวนการสังเคราะห์ mRNA โดย catalytic domain ของ endonuclease อยู่บริเวณ residues 508-522 ซึ่งมี residue ที่สำคัญ คือ E508, E519 และ D522 ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอนของโปรตีน PA แต่การ mutation ของ PA ส่งผลกระทบบั้ทั้งกระบวนการ transcription และ replication PA มี proteolytic activity โดยมีกรดอะมิโนสองตัว ที่เกี่ยวข้อง คือ S624 และ T157 (Palese and Shaw, 2007)

นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ของไวรัสอาจทำให้เกิดการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ได้ โดย Gabriel และคณะ (2005) ได้ทำการทดลองโดยใช้ไวรัส A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) ซึ่งเป็น highly pathogenic avian influenza virus และมี multibasic cleavage site ในยีน HA ที่เลี้ยงผ่านไขไก่ฟักอย่างต่อเนื่อง จากนั้นผ่านไวรัสในปอดของหนูพบว่าไวรัสดังกล่าวกลายเป็นไวรัสก่อโรคในหนู ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนใน PB2 สองตำแหน่งคือ D701N และ S714R ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ Polymerase activity ใน mammalian cells (Gabriel *et al.*, 2005) และมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของลำดับกรดอะมิโนใน PA และ PB2 โดยการเปลี่ยนแปลงบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ (conserve amino acid) ที่อะลานีนในปลายคาร์บอกซีตำแหน่งที่สามของ PA

ของ influenza A/WSN/33 แสดงให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่อนุรักษ์สูงที่สุดในทั้ง influenza A, B และ C โดยการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่ง H510A มีผลทำให้เกิดการยับยั้ง endonuclease cleavage ของ capped RNA และการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง K539A จะทำให้ลดการจำลองตัวเองของไวรัส (downregulate replication) และการเปลี่ยนแปลงที่ R638A ทำให้การสังเคราะห์ RNA ผิดปกติและส่งผลให้การเจริญของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงช้าลง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า PA มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการ transcription และ replication นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ตัดสาย RNA (endonuclease cleavage) และอาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการต่อสายยาว (elongation) ระหว่างการสังเคราะห์ RNA ของไวรัส และพบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนสองตำแหน่งใน PB2 คือ F363A และ F404A มีผลให้ไวรัสมีคุณสมบัติ cap-binding ที่ไม่ดี (Fodor *et al.*, 2004)

ได้มีการศึกษาบริเวณใกล้เคียงคาร์บอกซีของ PB1 โดยทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนสามบริเวณที่มีการอนุรักษ์ (conserve) จากกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (positive charge residue) ไปเป็นอะลานีน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ K669, R670 และ R672 มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ของไวรัส ในทางตรงกันข้ามไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ cRNA และ vRNA นอกจากนี้ไวรัสลูกผสมที่มี K669A หรือ R672A มีการสร้าง mRNA ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ cRNA และพบว่าไวรัสอ่อนกำลัง (attenuate) ในเซลล์เพาะเลี้ยง (Kerry *et al.*, 2007)

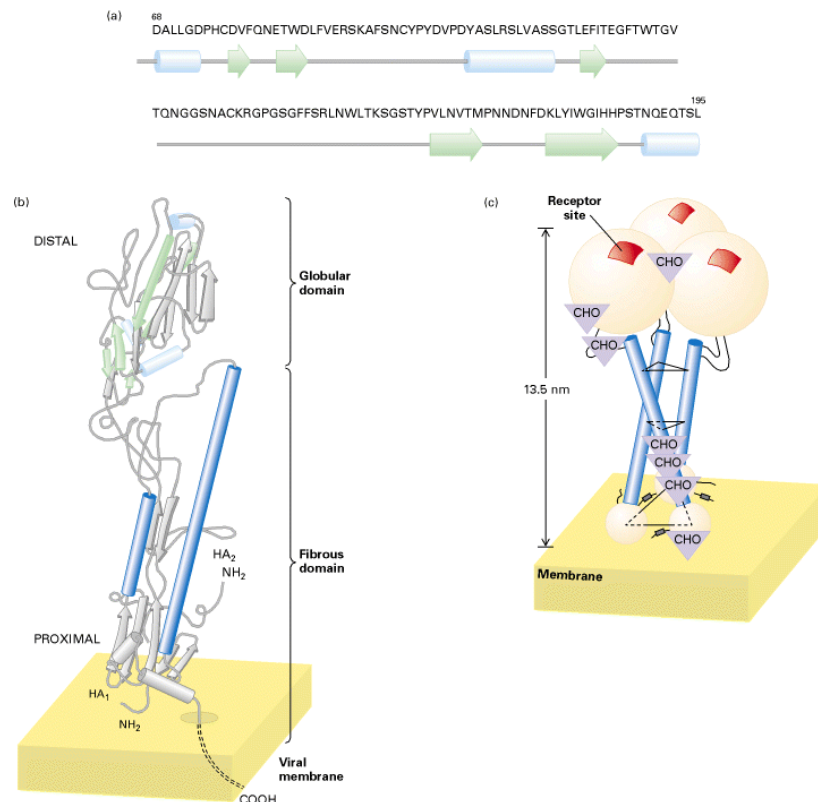
สายพันธุกรรมและโปรตีน Hemagglutinin

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีนของไกลโคโปรตีนของไวรัสจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะแอนติเจนและความรุนแรงของไวรัส ไกลโคโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของไวรัส (virulence) ชนิดหนึ่ง คือ Hemagglutinin โปรตีนชนิดนี้ถูกแปลรหัสจากสายพันธุกรรมสายที่ 4 มีหน้าที่หลัก 3 ประการคือ

1. จับกับ sialic acid บนผิวเซลล์ทำให้เกิดการเกาะติด (attachment)
2. ช่วยให้อนุภาคไวรัสผ่านเข้าไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์ผ่านการเชื่อมของเยื่อหุ้มอนุภาคของไวรัสกับผนังเอนโดโซม และเกิดการปล่อย nucleocapsids เข้าสู่ไซโตพลาสซึม
3. HA เป็นแอนติเจนหลักในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของ HA จะทำให้ไวรัสหลบหนีภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน (host) และอาจก่อให้เกิดการระบาดของโรคได้

โปรตีน HA ถูกแปลรหัสจากสายพันธุกรรมสายที่ 4 มีความยาว 1,742-1,778 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 562- 566 ตัว HA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่มีลักษณะเป็น trimer ที่ยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัสประมาณ $130 \text{ \AA}$ แต่ละ monomer ประกอบด้วย HA1 ที่เป็นทรงกลม (globular) มีขนาด 319-326 กรดอะมิโน ซึ่งมีหน้าที่จับกับ receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน (receptor-binding subunit) โดยส่วนของทรงกลม (globular) ของ HA เกิดจากการที่กรดอะมิโนของ HA1 บริเวณกรดอะมิโนที่ 116-261 ม้วนพับกลายเป็น jelly-roll motif ของ antiparallel β - strands จำนวน 8 สายบริเวณ globular head จะมีส่วนที่อนุรักษ์สูง (highly conserve) ซึ่งเป็นส่วนของ receptor binding site (Isin *et al.*, 2002) HA2 มีขนาด 221-222 กรดอะมิโน มีลักษณะเป็นแท่งซึ่งเป็นบริเวณของ fusion peptide (Hernandez *et al.*, 1996) ซึ่งอยู่บริเวณกรดอะมิโนตัวที่ 1-20 ของ HA2 ซึ่งบริเวณนี้เป็น peptide ที่ไม่มีประจุ (nonpolar) (Isin *et al.*, 2002) จำนวนกรดอะมิโนที่หายไปในส่วน of cleavage site จะอยู่ระหว่าง 1-6 กรดอะมิโน ขึ้นอยู่กับ subtype ซึ่งสายโพลีเปปไทด์ของ HA ถูกสร้างใน endoplasmic reticulum (ER) ในรูปโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว เรียกว่า HA0 (Palese and Shaw, 2007) โปรตีน HA จะต้องถูกตัดให้กลายเป็นสองส่วน คือ HA1 และ HA2 ซึ่งทั้งสองส่วนนี้จะเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (ภาพที่ 2) การตัด HA0 จะเกิดขึ้นภายหลังจากที่ไกลโคโปรตีนถูกขนส่งไปยัง plasma membrane โดย เอนไซม์ subtilisin-like protease เช่น furin หรือ PC6 (Steinhauer *et al.*, 1995) แต่ละ monomer ของ HA จะฝังตัวอยู่ที่เยื่อหุ้มอนุภาคของไวรัส โดย helical transmembrane peptide บริเวณ 27 กรดอะมิโนใกล้ปลายคาร์บอกซีของ HA2 ซึ่งบริเวณนี้จะไม่ปรากฏในภาพโครงสร้างที่เกิดจาก X-ray Crystallography (Isin *et al.*, 2002)

การตัด HA0 จะเกิดขึ้นที่ผิวเซลล์หรือเกิดขึ้นภายหลังจากอนุภาคไวรัสถูกสร้างและออกมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อ HA0 ของชนิดย่อย H1, H2 และ H3 สามารถถูกตัดด้วย serine protease และ tryptase Clara ที่สร้างโดย Clara cells ของ bronchiolar epithelium ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะจดจำลำดับกรดอะมิโน Q/ E-X-R บริเวณ cleavage site ของ HA0 ส่วน HA ของชนิดย่อย H5 และ H7 นั้น HA1 และ HA2 จะถูกคั่นด้วย polybasic sequence ซึ่งในกรณีนี้การตัด HA0 จะเกิดขึ้นในเซลล์โดย subtilisin-like enzyme และพบว่ามี R-X-R/K-R ที่เป็นจุดจดจำของเอนไซม์ furin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบมากในหลายๆ เซลล์ แทรกอยู่บริเวณ cleavage site เป็นผลให้ไวรัสสามารถติดเชื้อได้ในเซลล์หลายๆ ชนิดมากขึ้น หลังจาก HA0 ถูกตัด จะเกิดโครงสร้าง HA1 และ HA2 ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ที่พร้อมสำหรับการติดเชื้อครั้งต่อไป (Skehel and Wiley, 2000; Subbarao and Joseph, 2007)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ Hemagglutinin (a) primary structure ของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ HA1 ที่ตำแหน่ง 68-195 ได้ลำดับกรดอะมิโนเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) โดย α helices คือบริเวณทรงกระบอกสีฟ้า, β strands คือบริเวณลูกศรสีเขียว และ random coils คือบริเวณเส้นสีขาว (b) โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) ที่เกิดจากการม้วนพับของ helices ใน HA แต่ละ subunit โดยส่วนสีเขียวและสีฟ้าจะสอดคล้องกับภาพ (a) ส่วน proximal domain ที่อยู่ใกล้เชื่อมอนุภาคของไวรัสมีส่วนคล้ายกันเนื่องจากการเรียงแถวกันของ helices ของ HA2 (สีฟ้า) กับ β strands ใน HA1 (c) Quaternary structure ประกอบด้วย 3 subunit ของ HA ส่วนปลายของแต่ละ domain มีบริเวณ (สีเขียว) สำหรับจับกับโมเลกุล sialic acid บนผิวเซลล์เป้าหมาย

ที่มา: National Center for Biotechnology Information. (2008)

จากการศึกษา HPAI virus ที่ระบาดใน central Mexico ในปี 1994-1995 พบว่าทั้งหมดนั้นมีการกลายพันธุ์แบบมีการเพิ่มขึ้นของเบส ทำให้กรดอะมิโนเพิ่มขึ้นอย่างน้อยสองตัว ณ ตำแหน่ง cleavage site ของ HA และมีหนึ่ง isolate มีการกลายพันธุ์แล้วมีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น 4 ตัว (Perdue *et al*, 1997) และได้มีการใช้เทคนิค reverse genetics ในการเปรียบเทียบ avian H5N1 ที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงในไก่ คือ A/chicken/Hong Kong /YU562/01 และไวรัสที่สามารถ

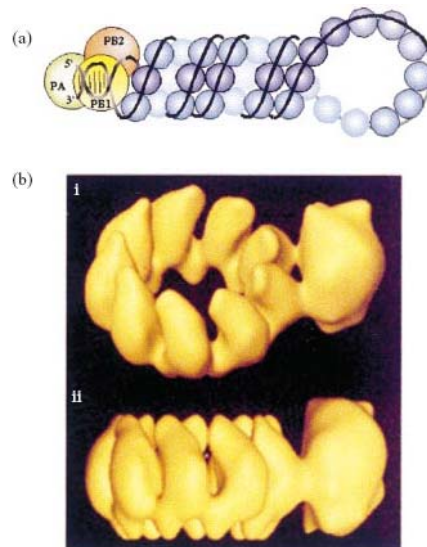
ก่อโรคได้ปานกลางในไก่ คือ A/goose/Hong Kong /437-10/99 พบว่าการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน ณ ตำแหน่ง 97, 108, 126 และ 138 ของไวรัสที่มีความสามารถในการก่อโรคสูง จะทำให้ไวรัสมีความสามารถในการก่อโรคลดลง แต่ในขณะเดียวกันการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งเดียวกันของไวรัสที่มีความสามารถในการก่อโรคได้ปานกลางกลับทำให้ไวรัสมีความสามารถในการก่อโรคมากขึ้น กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 126 เป็นบริเวณที่มีการรายงานว่าเป็นบริเวณที่ต้องจับกับ sialic acid และใกล้เคียงกับ neutralizing epitope และกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 138 อยู่ภายในตำแหน่ง 140S loop ซึ่งเป็น antigenic site ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวน่าจะมีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัส การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่ง 212 และ 217 มีผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ ทำให้ไวรัสที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงมีความสามารถในการก่อโรคเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ทำให้ไวรัสที่มีความสามารถในการก่อโรคได้ปานกลางมีความสามารถในการก่อโรคได้มากขึ้น ซึ่งมีรายงานว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 217 อยู่ใกล้กับ receptor binding site การเปลี่ยนแปลงนี้อาจทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการจับของ HA และ receptor (Hulse *et al.*, 2004) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการถูกตัดของโปรตีน HA ที่ตำแหน่ง cleavage site และความสามารถในการทำให้เกิดโรค (virulence) ของไวรัส โดยใช้เทคนิค reverse genetics พบว่าไวรัสที่มี HA ของ wild type มีบริเวณ cleavage site เป็น R-R-R-K-K-R จะถูกตัดได้ด้วย เอนไซม์โปรตีเอสภายในเซลล์ chicken embryo fibroblasts (CEF) ได้ ส่วนไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ cleavage site ที่มีลำดับกรดอะมิโน R-E-T-R เอนไซม์โปรตีเอสข้างต้นไม่สามารถตัดได้ ไวรัสนี้จึงไม่สามารถก่อโรคได้ในไก่ แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมบริเวณ cleavage site ของ HA มีผลต่อความสามารถในการก่อโรค (Horimoto and Kawaoka, 1994) และการแทนที่เบส (substitution) ณ ตำแหน่ง 129 และ 134 ของไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เสียชีวิต สามารถเปลี่ยนแปลงความชอบในการจับ (receptor-binding preference) ของ HA ของไวรัส H5N1 จาก SA α 2, 3 Gal มาเป็นทั้ง SA α 2, 3 Gal และ SA α 2, 6 Gal และการใช้ Molecular modeling แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงนั้นอาจทำให้ SA α 2, 6 Gal เสถียรใน cis conformation ที่เหมาะสมใน binding pocket (Auewarakul *et al.*, 2007)

สายพันธุกรรมและโปรตีน Nucleoprotein

ในกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัสและการถอดรหัสเป็นโปรตีน สำหรับ influenza A virus ยังมีโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการดังกล่าวนอกเหนือจากโปรตีนโพลีเมอเรส โปรตีนนั้นคือ Nucleoprotein (NP) ซึ่งถูกแปลรหัสมาจากสายพันธุกรรมสายที่ 5 ที่มีความยาว 1,565 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นโปรตีนขนาด 498 กรดอะมิโน เมื่อ NP ถูกสังเคราะห์เป็นโปรตีนในไซโตพลาซึมแล้วจะ

ถูกส่งกลับเข้ามายังนิวเคลียส เพื่อรวมกับสาย RNA กลายเป็น Ribonucleoprotein (RNP) (ภาพที่ 3) พบว่าทั้งสาย virion RNA (vRNA สายลบ) และสายแม่แบบ (cRNA สายบวก) ของไวรัสจะจับกับ nucleoprotein แต่ mRNA ของไวรัสจะไม่จับกับ nucleoprotein (Palese and Shaw, 2007) ซึ่งโปรตีน NP เป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส โดยจะเกี่ยวข้องกับกลไกการเปลี่ยนจากกระบวนการสังเคราะห์ RNA (transcription) ไปเป็นการจำลองตัวเอง (replication) และพบว่า การจำลองตัวเองของไวรัสจะไม่เกิดขึ้นหากไม่มีโปรตีน NP (Biswas *et al.*, 1998; Porrela and Digard, 2002) โปรตีน NP ของ influenza virus มีส่วนของ nuclear localization signal (NLS) ซึ่งอยู่บริเวณกรดอะมิโนที่ 327-345 และ RNA binding domain ซึ่ง NP จะผ่านเข้าไปยังนิวเคลียสโดยอาศัย NLS หลังจาก translation โปรตีน NP รวมตัวกับสาย RNA , และ polymerase complex (PA, PB1 และ PB2) กลายเป็น RNP-complex ก่อนที่จะจับกับ matrix protein (M1) และถูกส่งออกจากนิวเคลียสไปยังไซโตพลาสซึม ไม่ค่อยพบการเปลี่ยนแปลง (mutation) ในยีน NP พบว่าการอนุรักษ์ (conserve) ประมาณ 90 % ใน influenza A virus หลายๆ สายพันธุ์

มีรายงานว่า การหายไปของลำดับเบส (deletion) ของ NLS จะลดการปรากฏของ NP ในนิวเคลียสแต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติ nuclear localization ของ NP ไม่ได้ถูกทำลายทั้งหมดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของบริเวณ NLS มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Tyr-Lys-Arg (กรดอะมิโนตัวที่ 6-8 ของ NP) ไปเป็น Ala-Ala-Ala พบว่าคุณสมบัติ nuclear localization ของ NP ลดลงอย่างมาก โดยไม่คำนึงถึงบริเวณ NLS (Kenji *et al.*, 2007) Elton และคณะ (1999) ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับการ oligomerization ของโปรตีน NP เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงแบบ deletion พบว่ามี 3 บริเวณที่มีความสำคัญต่อการ oligomerization ซึ่ง 2 บริเวณอยู่กลางยื่นส่วนอีก 1 บริเวณอยู่ที่กรดอะมิโน 23 ตัวสุดท้ายทางปลายคาร์บอกซี การแทนที่อะลานีนในตำแหน่งที่ 199 จะลดความแน่นในการจับ (binding affinity) ลง 3 เท่า ในขณะเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงอะลานีนตำแหน่ง 416 จะลดความสามารถในการจับลง 10 เท่า ในทางตรงกันข้ามการเปลี่ยนแปลงที่ F479 จะเพิ่มความสามารถในการจับกันของ NP (self-association) 5 เท่า การลดลงของ oligomerization activity มีความสัมพันธ์กับการลดลงของการ transcription ของไวรัส (Elton *et al.*, 1999)



ภาพที่ 3 โครงสร้างการจัดเรียงตัวของ influenza virus RNPs (a) แสดงการจัดเรียงตัวของ RNP ทรงกลมสี่ฟ้า คือ NP monomer ที่รวมตัวกับ vRNA (เส้นสีดำ) vRNA สายเดี่ยวขดเป็น โครงสร้าง hairpin โดยปลาย 5' และ 3' ของ vRNA จะจับกับ polymerase complex (b) โครงสร้างที่ได้จาก electron microscopy ของ recombinant mini-RNP 27 Å^o resolution โดย RNP ประกอบด้วย 9 NP monomers และ 1 polymerase

ที่มา: Portela and Digard (2002)

สายพันธุกรรมและโปรตีน Neuraminidase

Neuraminidase (NA) เป็นไกลโคโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่อยู่บนอนุภาคของไวรัส NA ถูกสังเคราะห์มาจากสายพันธุกรรมสายที่ 6 มีความยาว 1,413 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ 454 กรดอะมิโน และมี glycosylation site ที่เป็นไปได้ 5 บริเวณ

Neuraminidase มีรูปร่างคล้ายเห็ด (mushroom-shaped) เป็น tetrameric protein ในส่วนปลายของแต่ละ monomer มีรูปร่างคล้ายใบพัด 6 อัน ซึ่งส่วนปลายดังกล่าวจะเชื่อมกับส่วนก้าน (stalk) ที่ประกอบด้วย membrane-spanning domain โดยส่วนโครงสร้างของก้านยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด (Ferraris and Lina, 2008) NA มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้างไวรัสอนุภาคใหม่ โดยมีหน้าที่ตัด sialic acid ออกจาก HA ในขั้นตอนการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์และป้องกันการเกาะติดระหว่าง HA ของอนุภาคไวรัสใหม่กับ sialic acid ของเซลล์เดิม ซึ่งถ้าหาก NA ทำงานอย่างไม่มีประสิทธิภาพจะเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคไวรัสใหม่บริเวณผิวเซลล์ NA จึงเป็น

เป้าหมายในการพัฒนายาต้านไวรัส พบว่ามีกรดอะมิโน 8 ตัวที่เป็น catalytic residue เนื่องจากจับกับ substrate โดยตรง ได้แก่ R118, D151, R152, R224, E-276, R292, R371 และ Y406 และมีกรดอะมิโน 11 ตัว ที่มีความเกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของโครงสร้างของ active site ได้แก่ E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, E277, N294 และ E425 (Ferraris and Lina, 2008; Richard *et al.*, 2008)

Richard *et al.* (2008) ได้ทำการ mutation กรดอะมิโน 11 ตัวในบริเวณดังกล่าว เพื่อศึกษาความเสถียร, activity และความไวต่อ inhibitor ของ NA พบว่า mutant R156K, I222L, H274Y, N294D และ E425D ยังมี activity ของ NA อยู่ระหว่าง 70-100% แต่ mutant D198N และ E119D มี activity ของ NA ลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type (A/Moscow/10/99 (H3N2) ส่วน mutant I222L มีความต้านทานต่อ Oseltamivir (Richard *et al.*, 2008)

สายพันธุกรรมและโปรตีน Matrix

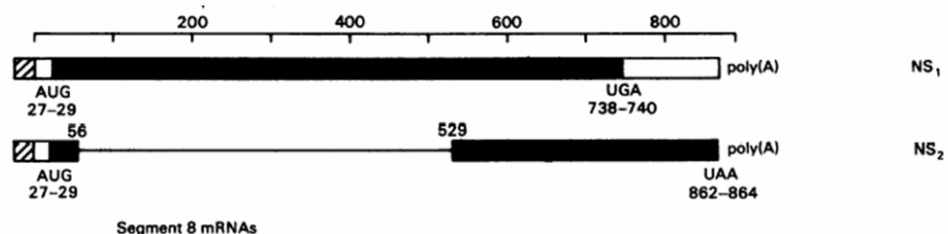
โปรตีนที่ถูกถอดรหัสจากสายพันธุกรรมสายที่ 7 ของไวรัส คือ M1 จะถูกถอดรหัสออกมาจาก mRNA ทั้งสายแต่ M2 ถูกถอดรหัสจาก spliced mRNA โดยโปรตีน M1 จะอยู่ระหว่างด้านในของผิวเยื่อหุ้มไวรัสและ RNP M1 มีส่วนเกี่ยวข้องในหลายขั้นตอนระหว่างการ replication ของไวรัส ซึ่งในช่วงแรกของการติดเชื้อของไวรัส จะต้องเกิดการแยกออกจากกันระหว่าง M1 และ RNP เพื่อให้ RNP สามารถออกไปสู่ไซโตพลาสซึมได้ กลไกการแยกออกจากกันของ M1 และ RNP ถูกควบคุมโดยความเป็นกรดในอนุภาคไวรัสที่เกิดจากการนำไฮโดรเจนไอออนเข้าไปในอนุภาคโดยการทำงานของ M2 M1 ถูกสร้างในไซโตพลาสซึมและจะเข้ามายังนิวเคลียสเพื่อรวมตัวกับ RNP ซึ่งการรวมตัวกันของ M1 สายพันธุกรรมของไวรัสและ NP ไม่เพียงแต่จะทำให้ RNP บิดเป็นเกลียวเท่านั้นและยังช่วยส่ง RNP ออกนอกนิวเคลียสระหว่างการ replication ของไวรัส มีการศึกษาการจับกันระหว่าง M1 และ RNP พบว่ามี 2 โดเมน บน M1 ที่มีความเกี่ยวข้องกับการจับกับ RNA โดเมนแรกประกอบด้วย Zinc-finger motif (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 148-162) อีกโดเมนหนึ่งอยู่บริเวณ 101-RKLLKR-105 (Liu and Ye, 2004) Ye *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาโดยการทำ mutation ทั้งสองบริเวณนี้และใช้เทคนิค reverse genetics สร้างไวรัสที่มี mutation ในสายพันธุกรรม M1 และ M2 พบว่าจะไม่เกิดการสร้างไวรัสถ้ามี deletion 5 หรือ 10 กรดอะมิโน ที่บริเวณปลายคาร์บอกซีของโปรตีน M2 แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงทั้งสองมีความสำคัญมาก ซึ่งยังไม่ทราบเหตุผลแน่ชัดที่การเปลี่ยนแปลงในบริเวณทั้งสองทำให้การสร้างไวรัสล้มเหลว แต่มีเหตุผลที่น่าจะเป็นได้ก็คือ การเปลี่ยนแปลงนั้นทำให้ specific signal ของการจับกับโปรตีน M2 และ โปรตีนอื่นๆ ถูกทำลายไป

และการ mutation ทำให้ส่วนของโปรตีน M1 มีการเปลี่ยนแปลงที่ Zinc-finger motif จึงมีผลต่อการเจริญของไวรัสเล็กน้อย การแทนที่กรดอะมิโนอาร์จินีน ด้วยเซอรีนที่ตำแหน่ง 101 หรือ 105 ของ RKLKR ไม่มีผลต่อ nuclear export ของ RNP หรือการ replication ของไวรัส แต่ในทางตรงกันข้าม การ deletion ของ RKLKR หรือแทนที่ไลซีนด้วยแอสพาราจีน ที่ตำแหน่ง 102 หรือ 104 ของ RKLKR มีผลเป็น lethal mutation แสดงว่า RKLKR โดเมนของ M1 มีความสำคัญในการ replication ของไวรัส (Liu and Ye, 2002)

นอกจากนี้ Liu *et al.* (2002) ยังได้ทำการทดลองเกี่ยวกับการจับของ M1 กับ RNP โดยใช้ M1 ของ A/WSN/33 ซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงด้วยการ deletion หรือการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งและทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน M ที่กลายพันธุ์ภายในหลอดทดลอง จากนั้นทดสอบการจับของ M1 ที่กลายพันธุ์กับ RNP ภายใต้สภาวะต่างๆ พบว่าที่ pH 7.0 M1 ของ wild-type จับกับ RNP ประมาณ 70% แต่ที่ pH 5.0 M1 จะจับกับ RNP ได้น้อยกว่า 5% การ mutation บริเวณที่จับกับ RNA ของ M1 คือ บริเวณ 101 RKLKR 105 และบริเวณ Zinc finger ไม่มีผลกระทบต่อไวรัส การจับกันระหว่าง M1 และ RNP เป็นผลมาจากแรงสองแรงคือ ionic และ hydrophobic ทำให้มีการสันนิษฐานของการรวมตัวกันระหว่าง M1 และ RNP ผ่านสองกลไก คือ การจับกันระหว่างโปรตีนกับ RNA และการจับกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีน แต่เนื่องจาก M1 และ RNA จับกันอย่างไม่จำเพาะ ดังนั้นความจำเพาะของการจับระหว่าง M1 และ RNP อาจขึ้นอยู่กับ การจับกันของ M1 และ NP ดังนั้นจึงเป็นการจับกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีน พบว่า M1 จะจับกับ NP ที่จับกับ RNA แล้วเท่านั้น เนื่องจากการทำการกลายพันธุ์และการแทนที่เบสในบริเวณ โดเมนที่ใช้จับกับ RNA (RNA-binding domain) ของ M1 ยังไม่สามารถทำให้คุณสมบัติของการจับกับ RNP เปลี่ยนแปลง จึงได้มีการทำการศึกษาต่อไปโดยศึกษา hydrophobic domain ของปลาย N ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการจับกับ RNP หรือไม่ ซึ่งได้มีการทำนายว่า M1 มี hydrophobic domain หลักๆ 3 โดเมน สองในสามบริเวณอยู่ในกรดอะมิโน 76 ตัวแรก (กรดอะมิโนที่ 1-20 และ 45-70) โดเมนที่อยู่ภายในกรดอะมิโนที่ 45-70 เกี่ยวข้องกับการจับกับเยื่อหุ้ม (membrane association) M del177-202 มีปลายอะมิโนจำนวน 76 กรดอะมิโน และปลายคาร์บอกซีจำนวน 50 กรดอะมิโน แต่ไม่มี RNA-binding domain การทำให้ RNP-binding activity ของ M ที่กลายพันธุ์ (M del 177-202) ลดลงโดยการลดความสามารถในการเกาะตัวกันของโปรตีนโดยใช้ detergent บ่งชี้ว่า hydrophobic binding domain ที่อยู่บริเวณกรดอะมิโน 76 ตัวที่ปลายอะมิโนของ M1 เกี่ยวข้องกับการจับ RNP โดยไม่เกี่ยวข้องกับการจับ RNA การขาดความสามารถในการจับ RNP ของ mutant M135-202 (ปลายอะมิโนของ M1 หายไปครึ่งหนึ่ง) หลังจากมีการเติม RNase A พบว่ายังมี RNA อยู่สอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่า N-terminal hydrophobic domain เกี่ยวข้องกับการจับ RNP ซึ่งไม่ขึ้นอยู่กับ การจับกับ RNA (Ye *et al.*, 1999)

สายพันธุกรรมและโปรตีน Nonstructural

สารพันธุกรรมสายที่ 8 ของ influenza A virus จะถอดรหัส (encode) ได้โปรตีนสองชนิด คือ NS1 และ NS2 หรือ nuclear export protein (NEP) โดย NS1 จะถูกถอดรหัสออกมาจาก mRNA ทั้งสายแต่ NS2 ถูกถอดรหัสจาก spliced mRNA โดยมีขนาด 230 กรดอะมิโนและ 121 กรดอะมิโน ตามลำดับ (ภาพที่ 4) NS1 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการก่อโรคของไวรัส โดยมีความเกี่ยวข้องกับการลดการทำงานในหลายๆกระบวนการของเซลล์ (Pavesi, 2007) เช่น ยับยั้งการตัด (splicing) mRNA ของเซลล์เจ้าบ้าน, ยับยั้งการเติมอะดีนีนที่ปลาย 3 (polyadenylation) และการส่ง mRNA ของเจ้าบ้านเองออกนอกนิวเคลียส โดยโปรตีน NS1 จะจับกับ U6 snRNA ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ spliceosome โดยใช้ RNA-binding domain และจับกับ polyadenylation factor 2 ชนิดของเซลล์เจ้าบ้านคือ 30 kDa subunit ของ cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) และ poly (A)-binding protein II (PABII) ซึ่งจะยับยั้งกลไก polyadenylation และ nuclear export ส่งผลให้ mRNA ของเซลล์เจ้าบ้าน ไม่สามารถออกนอกนิวเคลียสไปยังไซโตพลาสซึมและทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในไปทำการแปลรหัส (translation) เพื่อสังเคราะห์โปรตีนได้จึงไม่เกิดการแสดงออกของยีน (Brown, 2000)



ภาพที่ 4 บริเวณการแปลรหัสเป็นโปรตีนของ NS1 และ NS2

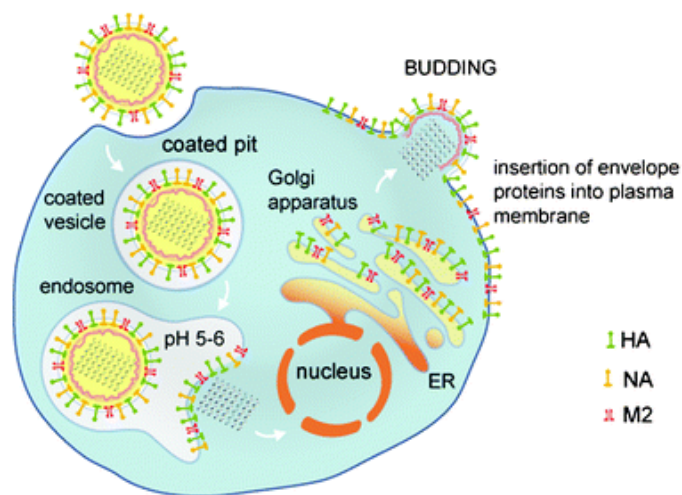
ที่มา: Mccauley and Mahy. (1983)

นอกจากนี้ NS1 โปรตีนยังมีผลต่อการต่อต้าน interferon โดยโปรตีน NS1 เป็น dsRNA binding protein ซึ่งเมื่อ dsRNA ของไวรัสถูกสร้างขึ้นระหว่างการติดเชื้อจะกระตุ้น IFN cascade แต่ถ้าหาก dsRNA ถูกจับโดย NS1 แล้วการตอบสนองโดย IFN จะไม่เกิดขึ้น นอกจากนี้ NS1 ยังสามารถยับยั้ง Protein Kinase R (PKR) โดย NS1 จะจับกับ dsRNA แบบแข่งขันกับ PKR เป็นผลให้ไม่สามารถกระตุ้น PKR และไม่เกิดกระบวนการยับยั้งการแปลรหัสต่อไป (Salvatore and Garcia-Sastre, 2001)

มีการศึกษาการแทนที่กรดอะมิโน Asp ด้วย Glu ในตำแหน่งที่ 92 ของ NS1 จาก A/HK/156/97 (H5N1) ซึ่งเป็นไวรัสของมนุษย์พบว่าเมื่อแทนที่แล้วไวรัสมีการก่อโรครุนแรงในสุกร ลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลายคาร์บอกซีของโปรตีน NS1 ทำให้ไวรัสจับกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ process RNA ของเซลล์ และรบกวนกระบวนการสร้างโปรตีนของเซลล์ ปลายคาร์บอกซีของ NS1 ของ Avian influenza (H5N1) มี motif ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Glu-Ser-Glu-Val (ESEV) และพบว่าไวรัสในสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงที่แยกได้จากมนุษย์มีลำดับกรดอะมิโนบริเวณ motif ดังกล่าวเป็น Glu-Pro-Glu-Val (EPEV) ในทางตรงกันข้ามปลายคาร์บอกซีของไวรัสสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงที่แยกได้ในมนุษย์ ซึ่งลำดับกรดอะมิโนบริเวณ motif เป็น Arg-Ser-Lys-Val (RSKV) และไวรัสที่มี NS1 ของ Avian influenza H5N1 ที่มีปลายคาร์บอกซีเป็น ESEV และ EPEV มีความรุนแรงในเซลล์มนุษย์ (Jia-hai *et al.*, 2006) ในไวรัส H5N1 ของสัตว์ปีกและทุกสายพันธุ์รุนแรงของมนุษย์ มีกรดอะมิโนสองตัวที่สำคัญ คือ Glu ตำแหน่งที่ 227 และ 229 ในขณะที่การแทนที่ Glu ด้วย Asp ที่ตำแหน่ง 92 ของโปรตีน NS1 จะมีผลทำให้ไวรัสสามารถต้านการตอบสนองของ host cytokine จากเซลล์เจ้าบ้านได้ (Pavesi, 2007)

วงจรชีวิตของไวรัส

ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์โดยใช้ไกลโคโปรตีนที่อยู่บนผิวอนุภาค คือ Hemagglutinin จับกับตัวรับ (receptor) ที่อยู่บนผิวของเซลล์ที่จะเข้าไป ซึ่งตัวรับจะประกอบด้วย sialic acid เมื่อไวรัสจับกับตัวรับแล้วจะเข้าไปในเซลล์โดยกระบวนการ endocytosis ปรากฏเป็นถุงเอนโดโซมต่อมาเกิดภาวะเป็นกรดภายในถุงเอนโดโซมกระตุ้นให้เกิดการถอดเปลือกหุ้ม (uncoating) ของไวรัส ซึ่งในสภาวะกรดจะกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวระหว่างผนังอนุภาคไวรัส (virion membrane) และผนังเอนโดโซม (Lanzrein *et al.*, 1994) และภายในอนุภาคของไวรัสจะเกิดสภาวะที่เป็นกรดเช่นกันเพราะโปรตอนจะผ่านเข้ามาในอนุภาคทางโปรตีน M2 เป็นเหตุให้ RNPs และโปรตีน M1 ซึ่งแต่เดิมจับกันอยู่แยกออกจากกัน นอกจากนี้สภาวะกรดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน HA เป็นผลให้เกิดการเชื่อมรวมกับถุงเอนโดโซมและเกิดเป็นรูทำให้ RNPs ถูกปล่อยออกมาสู่ไซโตพลาสซึม (Brown, 2000) ต่อมา RNPs จะเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อจำลองสายพันธุ์กรรมและผลิต mRNA (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 กระบวนการจำลองตัวเองของไวรัส

ที่มา: Royal Society of Chemistry. (2008)

การเข้าสู่เซลล์ของไวรัส

หลังจากที่ไวรัสใช้ไกลโคโปรตีนจับกับตัวรับที่บริเวณผิวเซลล์แล้วจะเกิดการเว้าของเยื่อหุ้มเซลล์หุ้มอนุภาคไวรัสกลายเป็นถุงเอนโดโซมเข้าไปยังไซโตพลาสซึมของเซลล์ ต่อมาจะเกิดการเปลี่ยนแปลง pH เกิดความเป็นกรดมากขึ้นภายในถุงเอนโดโซม เป็นผลให้โครงสร้างของ HA เปลี่ยนแปลงโดยจะขึ้น fusion peptide ทางปลายอะมิโนของ HA2 ออกมาแล้วแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มถุงเอนโดโซม (endosome membrane) เป็นผลให้เกิด pre-fusion membrane โดยปลายอะมิโนของ HA จะอยู่ที่ผนังเอนโดโซมส่วนปลายคาร์บอกซีจะอยู่ที่ผิวอนุภาคของไวรัส (Hernandez *et al.*, 1996) โดยกลไกการเชื่อมระหว่างผนังเอนโดโซมและเยื่อหุ้มไวรัสแบ่งออกได้ 5 ขั้นตอน (ภาพที่ 6) ดังนี้

ขั้นที่ 1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ HA และการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์

หลังจากที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้วโดยอยู่ในถุงเอนโดโซม เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH เกิดสภาพเป็นกรด เนื่องจากการปั๊มเอาโปรตอน (H^+) เข้าไปในถุงเอนโดโซม จากการทำงานของ H^+ -ATPase ในสภาพเป็นกรด HA1 และ HA2 จะถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดย HA1 ซึ่งมีลักษณะเป็นทรงกลม (globule) จะกางออก ส่วน HA2 ที่เป็นส่วนก้านจะมีการเปลี่ยนแปลงการพับของสายโพลีเพปไทด์เป็นผลให้ส่วนของ fusion peptide ที่อยู่ส่วนปลายจะขึ้น

ออกมา คล้ายกับการติดตัวคล้ายมีดพับ ซึ่งส่วนของ fusion peptide ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ต่อจากนั้นจะเกิดการจับกันระหว่าง fusion peptide กับผนังเอนโดโซมและเกิดการเชื่อมรวมระหว่างกันขึ้น

ขั้นที่ 2 การรวมกลุ่มของ HA trimer ที่ fusion site

ในขั้นนี้เกิดการรวมกลุ่มของ HA trimer 3-4 โมเลกุล จากขั้นที่ 1 เป็นผลให้เกิดการเคลื่อนที่เข้ามาทางด้านข้างของ membrane ทั้งสอง

ขั้นที่ 3 Hemifusion

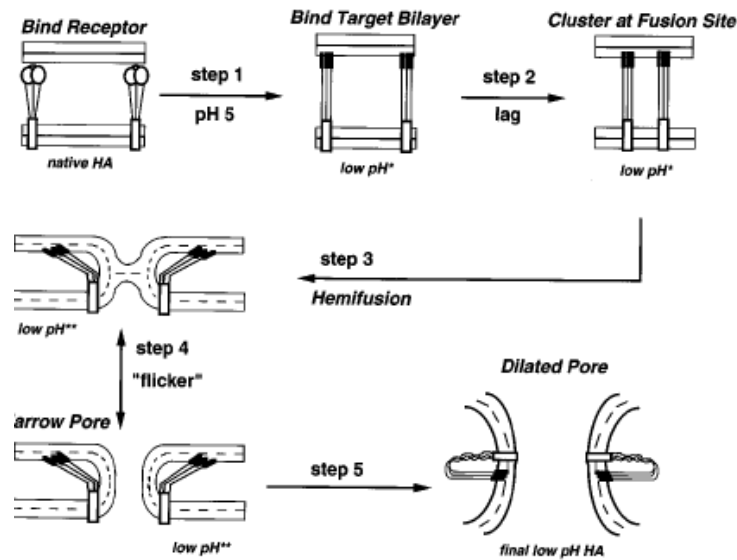
HA trimer ที่ fusion site เริ่มมีการโค้งงอ ซึ่ง HA จะยังยึดติดกับ target membrane โดย fusion peptide และยึดติดกับ membrane ของไวรัส โดย transmembrane domain และเมื่อหลายๆ trimer โค้งงอจะส่งผลให้ membrane ทั้งสองที่ HA ยึดอยู่เข้ามาใกล้ชิดกันมากขึ้น

ขั้นที่ 4 การเกิด fusion pore

จากขั้นตอนที่ 3 จะเกิดโครงสร้าง hemifusion เกิดการเชื่อมกันของสอง membrane กลายเป็น hemifusion diaphragm จากนั้นจะมีการขยับอย่างรวดเร็วเกิดเป็น fusion pore

ขั้นที่ 5 การขยายตัวของ fusion pore

ในขั้นตอนนี้อาศัยกลไกการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับไม่ได้ของ HA ซึ่งมีการเสนอว่า การยืดออกของกรดอะมิโน 20 ตัวทางปลายคาร์บอกซีของ HA2 มีผลให้ HA ขยับผ่านส่วนโค้งของ membrane ใน fusion pore ของขั้นที่ 4 fusion pore จึงสามารถขยายตัวได้ (Hernandez *et al.*, 1996) กลไกการเชื่อมระหว่างผนังเอนโดโซมและเยื่อหุ้มไวรัสทั้ง 5 ขั้นตอนสรุปได้ดังภาพที่ 6

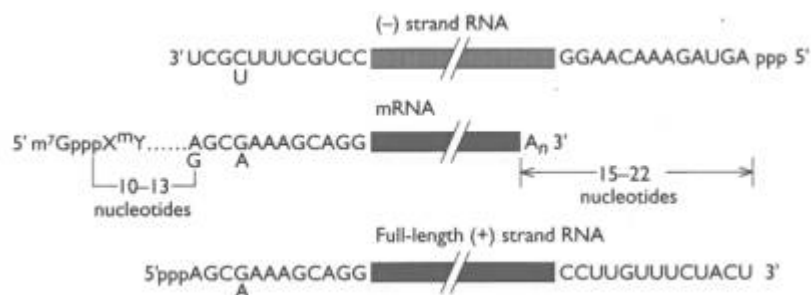


ภาพที่ 6 กลไกการเชื่อมระหว่างผนังเอนโดโซมและเชื้อหุ้มไวรัส โดยเส้นหนาสีดำแทน fusion peptide และ globular head domain ถูกแทนด้วยวงกลม

ที่มา: Hernandez *et al* (1996)

การสร้าง messenger RNA ของไวรัส

สายพันธุกรรมของ influenza A virus ประกอบด้วย noncoding sequence ทั้งปลาย 5' และ 3' บางลำดับเบสเป็นลำดับเบสที่จำเพาะกับแต่ละสายพันธุกรรม แต่ส่วนปลายจะอนุรักษ์ระหว่างสายพันธุกรรมทั้งหมดในกลุ่ม influenza A virus บริเวณอนุรักษ์ 13 นิวคลีโอไทด์ ที่ปลาย 5' และ 12 นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ซึ่งบางส่วนมีลักษณะ invert complementary (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ลำดับเบสบริเวณอนุรักษ์ของสายพันธุกรรมของไวรัส (vRNA), messenger RNA และสายพันธุกรรมที่ใช้เป็นแม่แบบในการจำลองตัวเอง

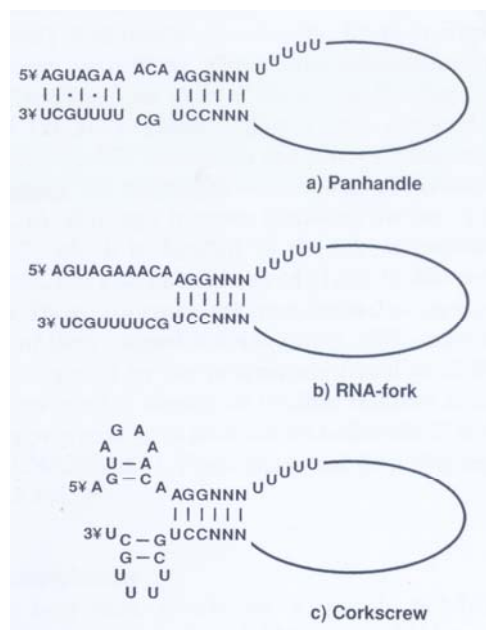
ที่มา: University of Arizona. (2008)

ทำให้มีการเสนอทฤษฎี panhandle structure (Fordor *et al.*, 1994) ที่เกิดจากการจับคู่กันระหว่างปลาย 5' และปลาย 3' จากการศึกษโดยใช้วิธี *in vitro* transcription โดยใช้ RNA template เป็นแบบจำลองหรือการแสดงออกของยีนในสัตว์ทดลอง (gene expression *in vivo*) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปลาย 5' และปลาย 3' ว่ามีความสำคัญในการเป็น promoter การจับคู่กันระหว่างปลายทั้งสองจะมีความสำคัญต่อ endonuclease activity และ polyadenylation

มีการเสนอแบบจำลองที่เกี่ยวกับ secondary structure ของ promoter (ภาพที่ 8) ได้แก่

- Panhandle model ทำนายโดยการจับคู่กันของเบสแบบ Watson-Crick
- RNA – fork model เสนอว่าปลายของ RNA เป็นสายเดี่ยว
- Corkscrew model ที่เสนอว่าบริเวณสายเดี่ยว ในความเป็นจริงแล้ว ได้จับคู่กันเอง

กลายเป็น 5' และ 3' hairpin loop

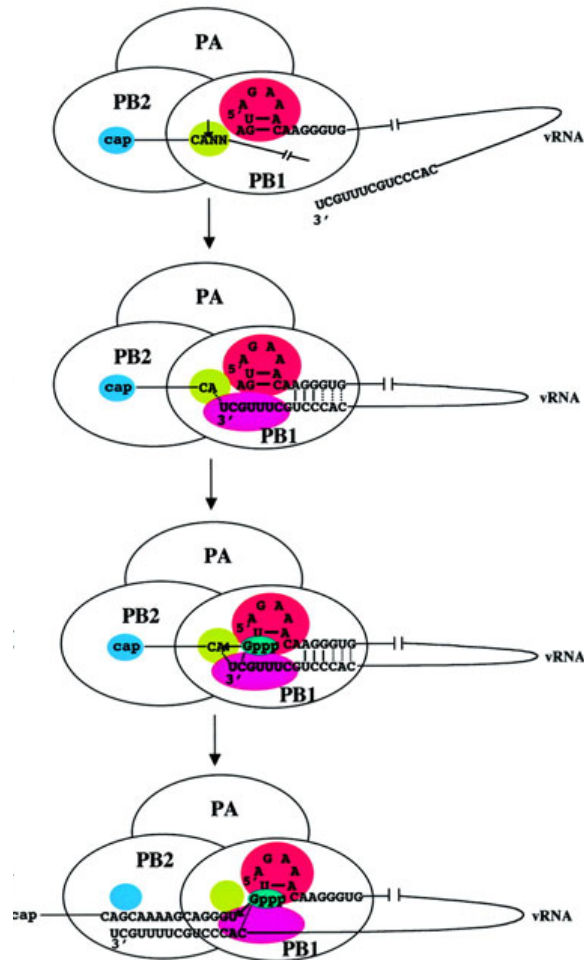


ภาพที่ 8 แบบจำลองของโปรโมเตอร์บน RNA ของไวรัส (vRNA)

ที่มา: Palese and Shaw (2007)

ซึ่งการสังเคราะห์ mRNA เริ่มต้นโดย polymerase protein ทั้ง 3 ชนิดของไวรัส (PB1, PB2 และ PA) มารวมตัวกันเป็นกลุ่มของเอนไซม์ (enzyme complex) กลุ่มของเอนไซม์นี้สามารถทำหน้าที่สังเคราะห์ได้ทั้ง mRNA และ viral RNA ในการสังเคราะห์ mRNA PB2 จะจับกับ mRNA ของ host cell บริเวณปลาย 5' ขณะที่ปลาย 5' ของสายพันธุกรรมของไวรัสจะจับอยู่กับ PB1 และ

ปลาย 3' จะจับกับ PB1 อีกด้านหนึ่ง ซึ่ง mRNA ของเซลล์เจ้าบ้านจะถูกตัด 10-12 เบส จากปลาย 5' และทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์สายบวก การสังเคราะห์สายบวกจะเกิดขึ้นจนถึง บริเวณปลาย 5' ของสายแม่แบบที่มียูริดีน (Uridine) 5-7 นิวคลีโอไทด์ (Voyles, 2002) ส่วนของ poly A ที่ปลาย mRNA ของไวรัส เกิดจากการลอกแบบซ้ำๆ บริเวณยูริดีน (Uridine) 5-7 นิวคลีโอไทด์ จนมีความยาวประมาณ 16 นิวคลีโอไทด์ (Fodor *et al.* 2001) กระบวนการดังกล่าวสรุปได้ดัง ภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการสังเคราะห์ messenger RNA ของไวรัส โดยโปรตีนโพลีเมอร์เรสทั้งสามจะรวมตัวกันและอาศัยคุณสมบัติ endonuclease ใน PB1 ตัด capped-mRNA ของเซลล์เจ้าบ้านที่มีบริเวณปลายเป็นลำดับเบส CA ซึ่ง A จะจับกับ U บนสาย vRNA และเกิดการต่อสายยาวของ mRNA

ที่มา: Nature. (2008)

การจำลองสายพันธุกรรม (replication)

การจำลองสายพันธุกรรมของ influenza virus เกิดขึ้นภายในนิวเคลียสของเซลล์ พบว่า กระบวนการนี้อาศัยเอนไซม์และไพรเมอร์ที่ได้จากเซลล์เจ้าบ้านในการเริ่มจำลองสายพันธุกรรมซึ่ง การจำลองสายพันธุกรรมของ influenza virus ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1. การสังเคราะห์สาย RNA แม่แบบ (RNA template) ซึ่งเป็นสายที่คัดลอกมาจาก vRNA
2. การลอกแบบจากสาย RNA แม่แบบ (RNA template) ไปเป็น vRNA

การเปลี่ยนรูปแบบจากการสังเคราะห์ mRNA ของไวรัสไปเป็นการสังเคราะห์สาย RNA แม่แบบ (RNA template) ต้องเปลี่ยนจากการเริ่มการสังเคราะห์ RNA โดยเปลี่ยน capped RNA ไปเป็น unprimed RNA synthesis และไม่ให้เกิดการหยุด (termination) การสังเคราะห์ RNA ก่อนถึงปลาย 5' และไม่มีการเติมอะดีนีน (polyadenylation) ที่ poly (A) site

การป้องกันไม่ให้เกิดการหยุด (antitermination) ต้องการโปรตีน NP อิสระที่ไม่ได้จับกับ nucleocapsids โดยโปรตีน NP จะจับกับปลาย 5' ของสาย RNA ที่เพิ่งสังเคราะห์เสร็จ ซึ่งโปรตีน NP จะจับกับบริเวณอะดีนีน (A) 4-7 residues บน mRNA เป็นเหตุให้สาย mRNA ไม่สามารถวกกลับมาเพื่อทำให้เกิดการลอกแบบซ้ำๆ บริเวณยูริดีน (U) residues จึงไม่เกิด poly A tail จากกลไกนี้แสดงให้เห็นว่า จำนวนของโปรตีน NP ในเซลล์ที่ติดเชื่อมีส่วนในการควบคุมระดับการสังเคราะห์ mRNA และ การจำลองตัวเองของไวรัส เพราะสายยาวของ RNA แม่แบบ จะถูกสังเคราะห์เมื่อมีโปรตีน NP เท่านั้น

ขั้นตอนต่อไปในการจำลองตัวเองคือ การลอกสาย RNA แม่แบบ เพื่อสร้างสายลบ (vRNA) ขั้นตอนนี้ต้องการโปรตีน NP ในการต่อสายยาว (elongation) จากนั้นสาย vRNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จะรวมตัวเป็น nucleocapsids ซึ่งสามารถ package ไปเป็นไวรัสอนุภาคใหม่ได้

ในการเปลี่ยนกลไกการสังเคราะห์ mRNA ไปสู่การสังเคราะห์ RNA แม่แบบนั้น ต้องการ polymerase ที่เปลี่ยนจาก capped RNA-primed initiation ไปเป็นการสังเคราะห์แบบไม่มี primers (unprimed initiation) ซึ่งกระบวนการทางชีวเคมียังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีทฤษฎีหนึ่งเกี่ยวกับรูปแบบของ polymerase ในกระบวนการจำลองสายพันธุกรรมของ vRNA ว่าอาจจะมีแตกต่างกับรูปแบบที่ใช้ในการสังเคราะห์ mRNA ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์ mRNA polymerase จะสร้าง

เฉพาะ subgenomic และ polyadenylated mRNA polymerase ชนิดนี้ต้องการ PB2 cap-binding protein ในการสร้าง capped RNA primer แต่ไม่ต้องการหน้าที่ของโปรตีน PA อย่างเด่นชัด vRNA และ RNA แม่แบบ จะถูก encapsidated ด้วยโปรตีน NP แต่ mRNA จะไม่ถูก encapsidated ซึ่งในกระบวนการจำลองสายพันธุกรรม (replication) polymerase จะต้องเริ่มต้นด้วยการ unprimed synthesis ของ vRNA และ RNA แม่แบบ สันนิษฐานว่าต้องการโปรตีน PA แต่ไม่ต้องการ PB2 cap-binding protein (Lamp and Krung, 2001)

การควบคุมการแสดงออกของยีนของไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อ

การติดเชื้อ influenza virus สามารถแบ่งระยะการแสดงออกของยีนได้เป็น ระยะเริ่มต้น (early phase) และ ระยะปลาย (late phase) ซึ่งรูปแบบการแสดงออกจะไม่เหมือนกับไวรัสชนิด DNA ที่มีการถอดรหัส (transcription) เกิดขึ้นก่อนและตามด้วยการจำลองสายพันธุกรรม (replication) ในระยะเริ่มต้นการสังเคราะห์ vRNA, mRNA และโปรตีนของไวรัสจะเกิดควบคู่กัน สิ่งแรกที่เกิดขึ้นหลังจากการถอดรหัสครั้งแรกคือ การสังเคราะห์ RNA แม่แบบ ซึ่งจะมีการสังเคราะห์เป็นจำนวนมากในระยะแรกและลดลงในเวลาต่อมา RNA แม่แบบจะถูกเลือกให้เกิดการจำลองตัวเองไปเป็น vRNA อย่างจำเพาะ (Lamp and Krung, 2001)

มีการศึกษาการสะสมของ mRNA ของสายพันธุกรรมทั้ง 8 ของไวรัส ซึ่งความแตกต่างของการแสดงออกของยีน จะสะท้อนถึงหน้าที่ของโปรตีนนั้นๆ ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันของวงจรชีวิตไวรัส เช่น ในช่วงแรกการสังเคราะห์ mRNA และโปรตีนพบว่า NP และ NS1 จะเกิดขึ้นในช่วง ระยะเริ่มต้น ซึ่งโปรตีน NP มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัส (replication) ส่วนโปรตีน NS1 มีหน้าที่ในการต้านภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน ดังนั้นโปรตีนทั้งสองจึงเป็นที่ต้องการในช่วงแรกของการติดเชื้อ ในทางตรงกันข้าม การสังเคราะห์ mRNA และโปรตีน HA, NA และ M จะเกิดขึ้นภายหลัง เนื่องจากพบว่าโปรตีน M1 จะยับยั้งการถอดรหัสเป็น mRNA ของไวรัส ดังนั้นถ้าหากมีการสร้าง M1 โปรตีนขึ้นมาในช่วงแรกจะทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ของไวรัส ดังนั้นโปรตีน M1 จึงถูกสร้างขึ้นในระยะปลายของการติดเชื้อ และนอกจากนี้ M1 ยังเกี่ยวข้องกับการส่ง RNPs ออกนอกนิวเคลียส ดังนั้นการแสดงออกของ M1 จึงต้องเกิดภายหลังการจำลองตัวเองของไวรัสเสร็จสิ้นแล้ว

นอกจากนี้ยังมีการควบคุมการแสดงออกของยีนของไวรัสรูปแบบอื่น คือความแตกต่างของ vRNA promoter ซึ่งจะมีความแตกต่างกันที่ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 4 จากทางด้านปลาย 3'

โดยพบว่าสายพันธุ์กรรม PB1, PB2 และ PA มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นไซโตซีนในขณะที่สายพันธุ์กรรมอื่นๆ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นยูราซิล โปรโมเตอร์ที่มีไซโตซีนในตำแหน่งที่ 4 มีความเกี่ยวข้องกับการลดลง (down regulation) ของการถอดรหัสเป็น mRNA และการเพิ่มขึ้น (up regulation) ของการจำลองตัวเอง (replication) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรโมเตอร์ที่มียูราซิลในตำแหน่งที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนที่ลดลงของ mRNA และโปรตีน polymerase ในเซลล์ที่ติดเชื้อ

จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีนของ influenza จะถูกควบคุมในระดับ translation โดยจากขั้นตอน cap-snatching ของไวรัสจะเป็นการตัดปลาย 5' ของ pre mRNA ของเซลล์เจ้าบ้านเป็นผลให้ mRNA นั้น สลายไป ซึ่งเป็นการยับยั้ง mRNA processing ของเซลล์เจ้าบ้าน และทำให้เกิดการแปลรหัสของ mRNA ของไวรัสได้ดีกว่า (Palease and Shaw, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าเกี่ยวข้องกับโปรตีน NS1 ซึ่งจะไปจับกับบริเวณ 5' noncoding ของ mRNA ของไวรัส และจับกับ eIF4GI ซึ่งมีการเสนอว่าการรวมกลุ่มของโปรตีนดังกล่าวจะช่วยให้ไรโบโซมมาจับที่ปลาย 5' ได้ง่ายขึ้น (Kash *et al.*, 2006)

อาการของโรค

อาการของสัตว์ที่ติดเชื้อไข้หวัดนกจะมีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ แต่จะมีบางอาการที่แตกต่างไป ดังนี้ ในสัตว์จะมีระยะฟักตัวในระดับชั่วโมงไปจนถึง 3 วัน โดยจะแสดงอาการซึม ไม่กินอาหาร หายใจลำบาก หน้าบวม หงอนและเหนียงบวมมีสีคล้ำ (cyanosis) มีอาการทางประสาท เช่น คอบิด ปีกตก สั่น และ ชัก คล้ายกับโรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease) และอาจตายกะทันหันโดยไม่ทราบอาการ (มรกตและอ้อมใจ, 2548) สัตว์ปีกที่มีความไวรับต่อโรค (susceptibility) อาจตายทันทีโดยไม่แสดงอาการ และอาการของโรคค่อนข้างหลากหลาย อาจพบเพียงระบบใดระบบหนึ่ง หรือหลายๆระบบร่วมกัน นอกจากนี้ชนิดของสัตว์ อายุ เพศ และสิ่งแวดล้อมก็มีผลต่อการแสดงอาการเช่นกัน

อาการทางคลินิกของผู้ป่วยไข้หวัดนกมีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่แต่มีอาการรุนแรงมากกว่า ซึ่งสายพันธุ์ H5N1 ก่อให้เกิดความรุนแรงมาก ไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่มีรายงานการติดเชื้อในมนุษย์อายุน้อยที่สุด คือ 1 ปี อายุมากที่สุดคือ 60 ปี ส่วนมากมีประวัติสัมผัสกับสัตว์ป่วยหรือตาย มีระยะฟักตัวประมาณ 2-5 วัน แต่อาจนานได้ถึง 8-17 วัน อาการไข้สูงกว่า 38 องศาเซลเซียส มีอาการปวดเมื่อย อ่อนเพลีย ร่วมกับอาการทางระบบทางเดินหายใจ ซึ่งส่วนใหญ่มักมีอาการไอ และหอบ ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการทางระบบทางเดินอาหารค่อนข้างมาก เช่น ปวดท้อง ท้องเดิน คลื่นไส้

อาเจียน ซึ่งอาการเหล่านี้ อาจเกิดขึ้นก่อนอาการทางระบบทางเดินหายใจจนเป็นเหตุให้แพทย์วินิจฉัยโรคผิด ผู้ป่วยอาจมีภาวะแทรกซ้อนที่พบร่วมด้วย เช่น ภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ (tachyarrhythmias), pulmonary hemorrhage และ Reye's syndrome เป็นต้น ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง มักเสียชีวิตในเวลาประมาณ 9-10 วัน จากภาวะหายใจล้มเหลว (ภาวะพิษและประสิทธิ, 2549)

เทคนิค Reverse genetics

เทคนิค reverse genetics เป็นเทคนิคที่สร้างไวรัสโดยการดัดแปลงยีนเพื่อให้ได้ไวรัสที่มีคุณสมบัติตามต้องการ เช่น มีความสามารถในการติดเชื้อได้ มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ หรือมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ ทำโดยการโคลน complementary DNA (cDNA)

influenza virus มีสายพันธุ์กรรมเป็น RNA สายลบ ในการเริ่มจำลอง RNA (replication) ของไวรัสต้องถูกถอดรหัส (transcription) เป็นสายบวก คือ mRNA โดยการทำงานของ polymerase complex และ nucleoprotein ของไวรัสเอง ซึ่งในกระบวนการ replication อย่างน้อยต้องประกอบด้วย NP และ polymerase protein 3 ชนิด ได้แก่ PB2, PB1 และ PA เนื่องจาก influenza virus มีสายพันธุ์กรรมลักษณะเป็นท่อน ในการที่จะสร้างไวรัสอนุภาคใหม่ขึ้นมาต้องอาศัยสายพันธุ์กรรมทั้ง 8 โปรตีน NP และ polymerase ทั้งสามชนิด จึงเป็นเหตุให้เทคนิค reverse genetics ที่เกี่ยวข้องกับ influenza virus พัฒนาได้ไม่เร็วเท่าที่ควร

ระยะแรก reverse genetics ของ influenza virus ถูกพัฒนาโดย Peter Palese และคณะ ในปี 1989 จะมีกระบวนการถอดรหัส เป็นสาย RNA ของไวรัสในหลอดทดลอง เมื่อได้สายพันธุ์กรรมแล้วจะนำไปผสมกับโปรตีน NP และ polymerase เพื่อสร้าง vRNP complex แล้วจึงนำไป transfect เซลล์ หลังจากนั้น infection ด้วย helper virus เพื่อสร้างสายพันธุ์กรรมส่วนที่เหลือ เนื่องจากส่วนสำคัญในการสร้างไวรัสของระบบนี้คือ helper virus จึงทำให้ระบบนี้มีข้อจำกัดที่ต้องมีระบบการคัดเลือกที่ดีในการเลือก recombinant virus (Neumann and Kawaoka, 2002) ต่อมา Hobom ได้ใช้ RNA polymerase I ในการสังเคราะห์ RNA ของไวรัสภายในเซลล์ ซึ่ง RNA polymerase I เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่มากมายในนิวเคลียสทำหน้าที่สร้าง ribosomal RNA (rRNA) การ transcription โดย RNA polymerase I จะเริ่มและสิ้นสุดที่ตำแหน่ง promoter และ terminator ตามลำดับ ระบบนี้มีความสะดวกมากกว่าระบบแรกที่กำลังกล่าวมาแล้วเพราะไม่ต้องทำการ transcription สายพันธุ์กรรมในหลอดก่อน แต่ระบบนี้ยังใช้ helper virus จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการสร้างอนุภาคไวรัสต่ำ ในปี 1999 มีการพัฒนาใช้ RNA polymerase I promoter ของมนุษย์และใช้ RNA polymerase I terminator

ของหนูในการโคลน cDNA เพื่อทำให้เกิดการถอดรหัสเป็นสายพันธุกรรมทั้ง 8 ของไวรัส หลังจากการ transfection จะเกิดการ transcription โดย RNA polymerase I ได้สายพันธุกรรมทั้ง 8 ของไวรัส ในช่วงแรกของการทดลองมีการ cotransfect ด้วย พลาสมิดของทั้ง 9 โปรตีน ดังนั้นระบบนี้ใช้พลาสมิดทั้งหมด 17 พลาสมิด (8 พลาสมิดสำหรับสังเคราะห์สายพันธุกรรม RNA และอีก 9 พลาสมิดสำหรับการแสดงออกเป็นโปรตีน) ในการ transfection ระบบนี้สามารถสร้างอนุภาคไวรัสได้มากกว่า 1×10^7 อนุภาคต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ได้มีการปรับปรุงระบบโดยใช้พลาสมิดที่ขับเคลื่อนการแสดงออกของโปรตีน 4 ชนิด (PA, PB1, PB2 และ NP) ในการ transcription และ replication กลายเป็นระบบ 12 พลาสมิด (8 พลาสมิดสำหรับการสังเคราะห์สายพันธุกรรม RNA และ 4 พลาสมิดสำหรับแสดงออกเป็นโปรตีน) ระบบนี้สามารถสร้างไวรัสได้มากกว่า 1×10^8 อนุภาคต่อมิลลิลิตร

ต่อมาได้มีการดัดแปลงระบบ RNA polymerase I เป็นระบบ RNA polymerase I/II ซึ่งทำการโคลน cDNA ในทิศทางของสายลบระหว่าง RNA polymerase I promoter และ terminator ส่วน cDNA ในทิศทางของสายบวกจะกลับทิศอยู่ระหว่าง RNA polymerase II promoter และ polyadenylation sequence การ transcription โดย RNA polymerase I จะได้สายพันธุกรรมสายลบ ขณะเดียวกันการ transcription โดย RNA polymerase II ทำให้ได้สายพันธุกรรมสายบวกคือ mRNA ซึ่งทั้ง mRNA และ vRNA จะถูกสร้างจาก cDNA เส้นเดียวกัน (Neumann and Kawaoka, 2001)

เนื่องจากวิธีการผลิตวัคซีนในที่ใช้ในปัจจุบันมีข้อด้อย โดยเฉพาะเรื่องระยะเวลาและความรวดเร็วในการผลิต ดังนั้นเมื่อเกิดการระบาดใหญ่จึงทำให้มีวัคซีนไม่เพียงพอต่อความต้องการ เทคโนโลยีการสร้างไวรัสลูกผสมโดยเทคนิค reverse genetics จึงถูกนำมาใช้ในการสร้างไวรัสเพื่อผลิตเป็นวัคซีน ทำให้สามารถสร้างไวรัสที่มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์ที่ระบาดได้ ซึ่งมีผลกระทบทำให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยย่นระยะเวลาในการผลิตและการพัฒนาวัคซีนซึ่งสามารถทำได้ในระยะเวลาอันสั้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน เทคนิคนี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้ผลิตวัคซีน

วัคซีนที่มีใช้ในปัจจุบัน

วัคซีนที่มีใช้ในปัจจุบันประกอบด้วย 3 ส่วนประกอบ คือ H1N1, H3N2 และ influenza B virus ซึ่งวัคซีนปี 2005-2006 ประกอบด้วย A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/California/7/2004

(H3N2) และ B/Shanghai/361/2002 (Palese, 2006) วัคซีนที่ใช้ในอังกฤษและยุโรปทั้งหมดผลิตมาจากไข่ไก่ฟักและเป็นวัคซีนเชื้อตาย (Inactivated vaccine) (Haque *et al.*, 2007) ซึ่งวัคซีนเชื้อตายยังแบ่งออกได้เป็น whole virus, split-product หรือ subunit ที่เป็นส่วนหนึ่งของ surface antigen ซึ่ง whole virus vaccine จะทำให้เพิ่มปฏิกิริยาการตอบสนองต่อวัคซีนโดยเฉพาะในเด็กและใช้วัคซีนในปริมาณที่น้อย ซึ่งได้มีการศึกษาทฤษฎีที่ว่า whole virus จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า split-product หรือ subunit โดยทำการเตรียม monovalent influenza A (H5N1) จาก A/Vietnam/1194/2004 ซึ่งได้ทำการกำจัดส่วนของ polybasic amino acid ออก และให้ seed virus เจริญในไข่ไก่ฟักและ inactivate ด้วย ฟอर्मาลิน และใช้ อลูมินัมไฮดรอกไซด์เป็น adjuvant โดยพบว่า ในกลุ่มของผู้ที่ได้รับ HA 20 ไมโครกรัมจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน 78% แต่สำหรับ subunit หรือ split virion vaccine ต้องใช้ HA ที่ไม่มี adjuvant ถึง 90 ไมโครกรัม และใช้ split virion vaccine ถึง 30 ไมโครกรัมร่วมกับ adjuvant ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในระดับที่เท่ากัน (Haque *et al.*, 2007) และมีข้อมูลสนับสนุนจากการทดลองที่ฮังการีที่ใช้ whole virus ที่ได้จาก A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) ร่วมกับ adjuvant วัคซีน 1 โดส ประกอบด้วย แอนติเจน 6 ไมโครกรัม กระตุ้นให้เกิด seroconversion 68% จากผู้ที่ได้รับวัคซีน 146 คน (Stephenson *et al.*, 2004) นอกจากนั้นได้มีการพัฒนาวัคซีนเชื้อตาย เพื่อใช้ในสัตว์ โดยใช้ H5N9 (A/Turkey/Wisconsin/1968) ไวรัสที่ได้มีความสามารถในการก่อโรคต่ำและเจริญได้ดีในไข่ไก่ฟัก และพบว่าสามารถให้ความคุ้มโรค 100% เมื่อทำการทดลองในไก่ (Girard *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ยังมีวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live attenuated vaccine) ซึ่งเป็นไวรัสยังมีความสามารถ replicate ได้ในระดับที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยไม่ก่อโรค (Luke and Subbrao, 2006; Haque *et al.*, 2007) ซึ่ง cold-adapted attenuated vaccine เท่านั้นที่องค์การอาหารและยา สหรัฐ (FDA) อนุญาตให้ใช้ในสหรัฐ ซึ่งวัคซีนดังกล่าวนี้ถูกสร้างมาจาก cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 และ B/Ann Arbor/1/66 (Kemble and Greenberg, 2003) โดยจะทำการสร้าง reassortant ระหว่างไวรัสสายพันธุ์ที่มีการระบาดกับสายพันธุ์ที่เป็น cold-adapted (Stephenson *et al.*, 2004) วัคซีนกลุ่มนี้ได้แก่ FluMist มีจำหน่ายในสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี 2003 และแนะนำให้ใช้กับผู้ที่มีอายุระหว่าง 5 ปีถึง 49 ปีและห้ามไม่ใช้กับผู้ที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี และผู้ที่มีอายุสูงกว่า 50 ปี เพราะข้อมูลจากการทดลองภาคสนามยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคในเด็กและผู้สูงอายุ (ภาวพันธ์และประเสริฐ, 2549; Luke and Subbrao, 2006) มีการใช้ไวรัสที่ไม่มีเยื่อ Matrix (M2) เป็นวัคซีนเชื้อเป็นในสัตว์ แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าวัคซีนดังกล่าวนี้จะใช้ได้ ในมนุษย์หรือไม่ (Haque *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีการใช้ไวรัสที่มีการดัดแปลงยีน NS1 มาเป็นวัคซีนเชื้อเป็น พบว่าไวรัสที่ไม่มียีน NS1 จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เจ้าบ้าน จึงได้มีการ

ตัดแปลงไวรัสโดยทำการตัดบางส่วนของยีน NS1 ออกไป แต่ไวรัสยังสามารถเพิ่มจำนวนและกระตุ้น interferon ได้ โดย interferon จะเป็น adjuvant ที่ดีมาก ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการสร้าง immunoglobulin และกระตุ้น dendritic cell ซึ่งวัคซีนเชื้อเป็นจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในประชากรที่ไม่เคยได้รับวัคซีนได้ในการให้วัคซีนเพียงครั้งเดียว (Palese, 2006) และใช้ในปริมาณโคสที่ต่ำกว่าวัคซีนเชื้อตายหรือ subunit vaccine ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้แล้ว

วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก

นับตั้งแต่มีการตรวจพบการระบาดของไข้หวัดนกสายพันธุ์รุนแรงในห่านในจังหวัด Guangdong ประเทศจีนปี 1996 นักวิทยาศาสตร์จีนได้เริ่มพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้หวัดนกสำหรับป้องกันการระบาด โดยใช้ A/turkey/England/N-28/73 ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงชนิด H5N2 ในรูปของวัคซีนเชื้อตาย วัคซีนเชื้อตายที่ได้จาก A/turkey/England/N-28/73 (H3N2) ถูกใช้ใน buffer zone ในการระบาดของไวรัสชนิด H5N1 ในปี 2004 ที่ประเทศจีน ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิค reverse genetics ตัดแปลงสายพันธุ์กรรมของไวรัสชนิด H5N1 สายพันธุ์ไม่รุนแรง A/Harbin/Re-1/2003 (Re-1) ซึ่งเป็นไวรัสที่มียีน HA และ NA จากไวรัส GSGD/96 และอีกหกยีนเป็นของ A/Puerto Rico/8/34 (PR8) โดยใช้ไวรัสดังกล่าวเป็นวัคซีนชนิดเชื้อตาย พบว่าเมื่อให้วัคซีนนี้เพียง หนึ่งโดส ก็จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันยาวนานมากกว่า 10 เดือน และวัคซีนนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในห่านและเป็ดได้เช่นกัน (Qiao *et al.*, 2006)

จากนั้นมีการใช้เทคนิค reverse genetics ในการสร้างไวรัสเพื่อผลิตเป็นวัคซีน โดย Liu *et al.* (2003) ได้สร้างไวรัสสายพันธุ์ H3N2 โดย ใช้ยีนแกนหลักจาก A/PR/8/34 ซึ่ง H5 ได้จาก A/Goose/HK/437.4/99 (H5N3) และได้ทำการกำจัด poly basic amino acid ออกไปแล้ว และ N3 ได้จาก A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) ซึ่งพบว่า HA ปริมาณ 1.2 ไมโครกรัม จะป้องกันไก่ไม่ให้เสียชีวิต (Liu *et al.*, 2003) ต่อมา Tian *et al.* (2005) ได้สร้าง H5N1/PR8 และใช้ไวรัสเป็นวัคซีนเชื้อตายและได้ทำการให้วัคซีนกับไก่, ห่านและเป็ด หลังจากให้วัคซีน 1 สัปดาห์จะตรวจพบ hemagglutination-inhibition (HI) antibody ซึ่งจะมีระดับสูงที่สุดในสัปดาห์ที่หกและค่อยๆ ลดลง ในสัปดาห์ที่ 43 หลังจากการให้วัคซีน และได้มีการศึกษาการฉีดเชื้อทับในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 43 แสดงให้เห็นว่าวัคซีนป้องกันการตายและการแสดงอาการของโรคในไก่ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนในห่านพบว่าวัคซีน 3 โดส ให้ความคุ้มโรค 34 สัปดาห์ และในเป็ดวัคซีน 2 โดส ให้ความคุ้มโรคมากกว่า 52 สัปดาห์

นอกจากนี้มีการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนกโดยใช้ไวรัสพาหะ มีการใช้ adenovirus ในการผลิตวัคซีนไข้หวัดนก โดย Toro *et al.* (2008) ได้ใช้ adenovirus vector ที่บรรจุรหัสของสายพันธุกรรม HA ชนิด H5 ทำการให้วัคซีน แบบ *in ovo* และหลังจากไก่ฟักออกมาแล้ว จะมีการให้วัคซีน adenovirus vector ที่แปลรหัสให้ H7 เข้าได้กล้ามเนื้อ (intramuscular) อีกครั้ง พบว่าจะมีการตอบสนองต่อแอนติบอดีทั้ง H5 และ H7 (Toro *et al.*, 2008) และมีวัคซีนที่ผลิตจาก HA ที่สังเคราะห์ด้วย Baculovirus ซึ่ง Crawford และคณะ (1999) ได้ผลิต HA ที่สังเคราะห์โดย Baculovirus จากสายพันธุกรรม HA ที่ได้จาก A/Chicken/Jalisco/14589-660/94 (H5N2) พบว่า ป้องกันการตายในไก่และไก่ไม่แสดงอาการป่วยหลังการฉีดพิษตับ และไม่มีการขับเชื้อออกทาง ทวารหนักและการขับเชื้อออกทางหลอดลมลดลง (Crawford *et al.*, 1999) นอกจากนี้ Gao และ คณะ (2006) ได้สร้าง adenovirus-based influenza vaccine ที่มีโปรตีน hemagglutinin (HA) ของ A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) (VN/1203/04) ซึ่งเป็นไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยเมื่อเกิดการระบาดของ ไวรัสไข้หวัดนกในเวียดนามในปี 2003-2005 โดยได้ทำให้มีการแสดงออกโปรตีน HA ใน ความยาวที่ต่างกันจาก adenoviral vector เมื่อให้วัคซีนนี้แก่หนู BALB/C ตามด้วยการให้เชื้อ VN/1203/04 (H5N1) แก่หนูโดยให้ทาง intranasal หลังจากนั้น 70 วัน พบว่าการให้วัคซีนจะ กระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีจำเพาะต่อ HA และกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ด้วย และหนูที่ได้รับ วัคซีนที่มีการแสดงออกของ HA สายยาว จะมีความสามารถในการต้านทาน VN/1203/04 มากที่สุด และการให้วัคซีนนี้ได้ผิวหนังเพียงหนึ่งครั้งจะให้ความคุ้มโรคต่อไก่ จากการให้เชื้อพิษ (challenge) ทางจมูก (intranasal) ภายหลังจากการให้วัคซีน 21 วัน ซึ่งไวรัสดังกล่าวจะทำให้ไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ ได้รับวัคซีนตายภายในสองวัน (Gao *et al.*, 2006)

มีการผลิต Fowl pox virus vaccine ที่มีสายพันธุกรรม HA และ NA ของไวรัส A/Goose/Guangdong/3/96 (H5N1) (GD3/96) และเมื่อฉีดเชื้อพิษตับโดยใช้ไวรัสที่มีความสัมพันธ์ ใกล้ชิดกับไวรัสไข้หวัดนกที่ระบาดในฮ่องกงในปี 1997 กับไก่ที่ได้รับวัคซีนข้างต้นนี้ก่อน พบว่า ไก่ไม่มีอาการป่วยหรือตายและไม่พบการปล่อยเชื้อออกทางทวารหนักและลำคอ (Qiao *et al.*, 2003) แต่ Fowl pox virus vaccine ทั้งหมดจะให้ความคุ้มโรคไม่แน่นอนในไก่ที่เคยได้รับวัคซีนที่เป็น Fowl pox-based มาก่อน หรือไก่ที่เคยติดเชื้อและมีภูมิคุ้มต่อ Fowl pox virus โดยธรรมชาติ (พรทิพภาและคณะ, 2549)

Park *et al.* (2006) ได้ใช้เทคนิค reverse genetic สร้าง chimeric avian influenza virus ที่ ประกอบด้วยสายพันธุกรรมของ influenza virus ที่มีการแสดงออกของยีน hemagglutinin-neuraminidase ของ NDV แทนที่สายพันธุกรรม NA ของ H5N1 ของ avian influenza virus

นอกจากนี้ยังสร้าง bivalent vaccine ที่เป็น NDV ที่มีการแสดงออกของ ectodomain ของ H7 avian influenza virus ซึ่งการให้วัคซีนนี้เพียงครั้งเดียวก็มักจะชักนำให้ไก่มีภูมิคุ้มต่อ H7N7 สายพันธุ์รุนแรงถึง 90 % และทำให้ไก่มีภูมิคุ้มต่อ NDV อีกด้วย (Park *et al.*, 2006)

Viet *et al.* (2006) สร้าง NDV ที่มีการแสดงออกโปรตีน hemagglutinin ชนิด H5 ของไวรัสไข้หวัดนกโดยใช้เทคนิค reverse genetics ซึ่งใช้ lentogenic NDV clone 30 ทำการแทรกลำดับเบสของสายพันธุ์กรรม HA จาก A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) เข้าไประหว่างสายพันธุ์กรรม fusion (F) และ hemagglutinin-neuraminidase (HN) ของ NDV ได้ recombinant คือ NDVH5 และได้ทำการสร้าง recombinant ชนิดที่สอง คือ NDVH5m ซึ่งได้มาจากการทำให้เกิด silent mutation ในบริเวณ terminal-like sequence ที่อยู่ภายในกรอบการอ่านรหัสของ HA พบว่า NDVH5m มีการแสดงออกมากกว่า NDVH5 ถึง 2.7 เท่า ซึ่ง recombinant ทั้งสองไม่เป็นพิษต่อไก่เมื่อทดลองกับไก่อายุหนึ่งวัน โดยให้ผ่านทาง intracerebral พบว่าการให้ NDVH5m แก่ไก่จะกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทั้ง NDV และ influenza virus ชนิด H5 ซึ่งไก่จะไม่แสดงอาการป่วยหลังจากถูกฉีดเชื้อพิษทั้ง NDV หรือ influenza virus ชนิดรุนแรง และตรวจไม่พบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสจากตัวสัตว์ นอกจากนี้ข้อดีของการใช้ NDVH5m เป็นวัคซีน คือสามารถแยกว่าสัตว์ตัวใดได้รับวัคซีนและสัตว์ตัวใดติดเชื้อ จากการใช้แอนติบอดีต่อ NP ของ influenza virus (Viet *et al.*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

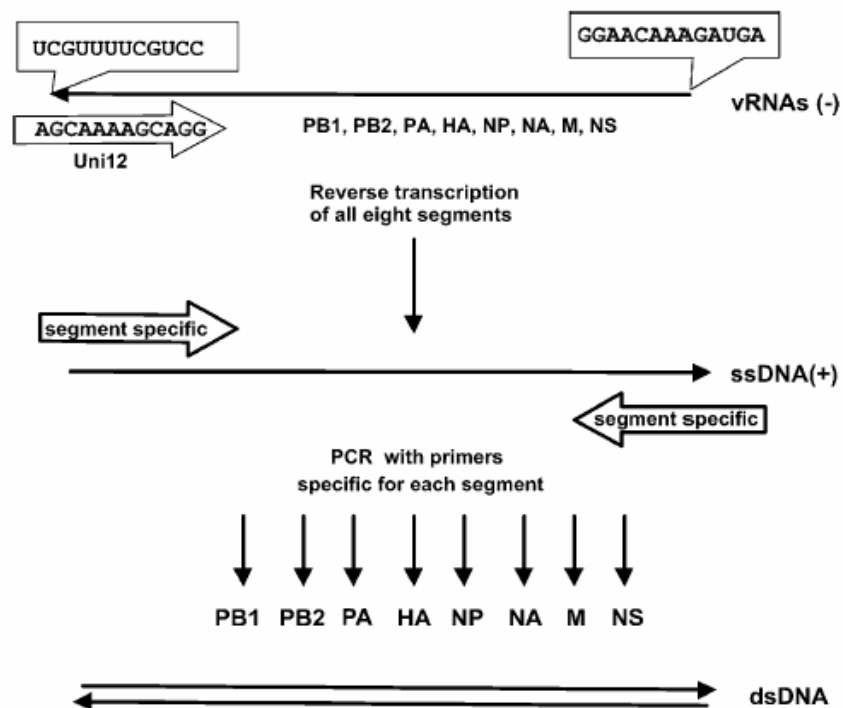
อุปกรณ์

1. หลอดสำหรับใช้ปั่นเหวี่ยง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
2. เครื่องเขย่าปรับอุณหภูมิ
3. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermocycle)
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge machine)
6. เครื่องมือดูดสารละลาย (Micropipette)
7. เครื่องแยกดีเอ็นเอตามขนาดผ่านตัวกลาง (Electrophoresis)
8. ไมโครเวฟ
9. ตู้ฟกไข่
10. DNA Darkreader
11. CO₂ incubator
12. Water bath
13. Refrigerate centrifuge
14. Laminar flow class I
15. Laminar flow class II
16. Inverted microscope
17. Fluorescent microscope
18. อุปกรณ์เครื่องแก้วที่จำเป็นในการทดลอง
19. QIAEX II Gel Extraction Kit
20. QIA prep Miniprep
21. pGEM-T easy vectors
22. Trizol reagent
23. ไข่ไก่ฟัก
24. 293T cell line
25. MDCK cells

วิธีการ

1. การสกัด RNA จากไวรัสและการสังเคราะห์ cDNA

สกัด RNA จาก allantoic fluid ของไข่ไก่ฟักที่ถูก inoculate ด้วย HPAI H5N1 โดยใช้ Trizol reagent® (Invitrogen) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และทำการถอดรหัสย้อนกลับ RNA มาเป็น cDNA โดยเอนไซม์ SuperScript III (Invitrogen) และไพรเมอร์ Uni12 (Hoffmann *et al.*, 2001) ดังภาพที่ 10 ซึ่งในปฏิกิริยา 20 µl ประกอบด้วย 9 µl RNA, 10 mM dNTP (Amresco), 10 mM Uni12 ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน บ่มที่ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น บ่มในน้ำแข็ง 2 นาที แล้วเติมสารดังต่อไปนี้ 5X RT buffer, 0.1 M DTT, 40 U RNaseOUT, 200 U SuperScriptIII ผสมสารละลายให้เข้ากันและบ่มที่ 42°C นาน 50 นาที เมื่อครบเวลาแล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ 95 °C 10 นาที จากนั้นเก็บ cDNA ที่ได้ไว้ใน -20°C



ภาพที่ 10 การทำ RT-PCR โดยไพรเมอร์ uni12 และการเพิ่มจำนวนยีนของ influenza A virus โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะ

ที่มา: Hoffmann *et al* (2001)

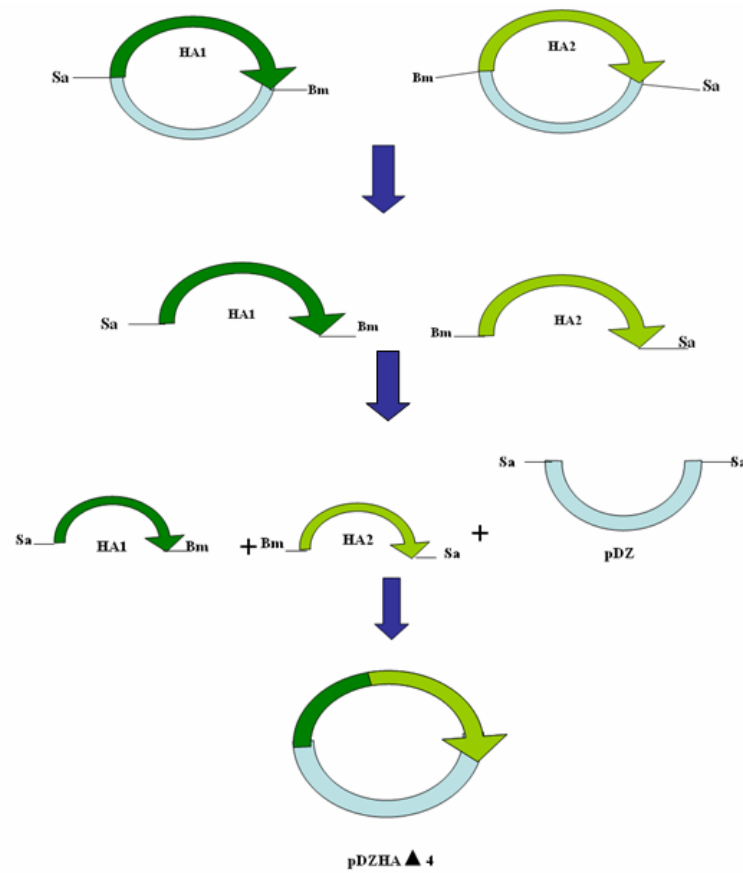
2. การโคลน (cloning) ยีน NA และการดัดแปลงยีน HA

ใช้ cDNA เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีน NA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน NA (Hoffmann *et al.*, 2001) โดยในปฏิกิริยา 50 μ l ประกอบด้วย 4 μ l cDNA, 10X buffer without $MgCl_2$, 25 mM $MgCl_2$, 10 pM ของ Sa_H5NA1 และ Sa_H5NA1413R, 10mM dNTP (Amresco), 1.75 U Taq DNA Polymerase (Roche) โดยใช้อุณหภูมิในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรม ดังนี้ 94 °C 5 นาที เพื่อเป็นการแยกสาย DNA จากนั้นทำการบ่มที่ 94°C 30 วินาที, 45°C 30 วินาที, 72°C 2 นาที ตามลำดับ โดยขั้นตอนนี้จะทำซ้ำ 5 รอบ เพื่อเพิ่ม non specific product จากนั้นจะใช้อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที, 50 °C 30 วินาที, 72 °C 2 นาที ทำซ้ำ 35 รอบและต่อด้วย 72°C 7 นาที เพื่อให้เกิดการต่อสาย DNA เกิดอย่างสมบูรณ์

จากนั้นนำ PCR product มาแยกขนาดด้วย 1% อะกาโรสเจล แล้วตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส มาทำบริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIAEXII (Qiagen) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เชื่อม (ligation) กับ cloning vector โดยในปฏิกิริยา 10 μ l ประกอบด้วย ชิ้นยีน NA, pGEM-T easy (Promega), 2X ligation buffer (Promega) และ 1 U T4 DNA ligase (Promega) ผสมสารละลายและบ่มไว้ที่ 4°C ข้ามคืน จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ 5 μ l มาทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้า *E.coli* TOP10 (Invitrogen) คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาว ซึ่งเป็นโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมมาคัดเลือกโดยวิธี colony PCR เมื่อได้โคโลนีที่ให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1400 คู่เบส เท่าชิ้นยีน เลือกโคโลนีนั้นมาเลี้ยงและสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIA prep[®] จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งไปอ่านลำดับเบส เมื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีน NA พบว่าถูกต้องแล้ว จากนั้นทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วแยกชิ้นยีนมาเชื่อมกับ bidirectional plasmid โดยในปฏิกิริยา 10 μ l ประกอบด้วย พลาสมิด pDZ, ชิ้นยีน NA, 5XBuffer (Invitrogen) และ 1U T4 ligase (Invitrogen) บ่มที่ 23 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ 5 μ l มาทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้า *E.coli* DH5 α ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยวิธี colony PCR เมื่อคัดเลือกโคโลนีได้แล้วนำมาเลี้ยงและสกัด พลาสมิดโดยใช้ QIA prep[®] จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งไปอ่านลำดับเบส

ส่วนของยีน HA จะถูกดัดแปลงโดยแบ่งการเพิ่มจำนวนยีนออกเป็นสองส่วน โดยใช้ไพรเมอร์สองคู่ที่ออกแบบให้เพิ่มจำนวนยีน HA ซึ่งกำจัดส่วนของ polybasic amino acid บริเวณ cleavage site (Liu *et al.*, 2003) ซึ่งปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนใช้รูปแบบเดียวกับยีน NA ข้างต้น จากนั้นนำ PCR product มาแยกขนาดด้วย 1% อะกาโรสเจล

แล้วตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส และ 650 คู่เบส มาทำบริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIAEXII (Qiagen) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แต่ละชิ้นเชื่อม (ligation) กับ cloning vector โดยในแต่ละปฏิกิริยา 10 μ l ประกอบด้วย ชิ้นยีน HA1 หรือ HA2, pGEM-T easy (Promega), 2X buffer (Promega) และ 1 U T4 DNA ligase (Promega) ผสมสารละลายและบ่มไว้ที่ 4°C ข้ามคืน จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ 5 μ l มาทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้า *E.coli* TOP10 (Invitrogen) คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาว ซึ่งเป็นโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมมาคัดเลือกโดยวิธี colony PCR เมื่อได้โคโลนีที่ให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,100 คู่เบส และ 650 คู่เบส เท่าชิ้นยีน เลือกโคโลนีนั้นมาเลี้ยงและสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIA prep[®] จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งไปอ่านลำดับเบส เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า HA1 และ HA2 เป็นส่วนของยีน HA จากนั้นทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วแยกชิ้นยีนมาเชื่อมกับ bidirectional plasmid ในลักษณะ tri-molecular ligation (ภาพที่ 11) โดยในปฏิกิริยา 20 μ l ประกอบด้วย ชิ้นยีน HA1, ชิ้นยีน HA2, พลาสมิด pDZ, 5X ligation buffer (Invitrogen), 2U T4 DNA ligase (Invitrogen) บ่มที่ 22 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ 5 μ l มาทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้า *E.coli* HIT Competent cell[™] (RBC Bioscience) คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาว ซึ่งเป็นโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมมาคัดเลือกโดยวิธี colony PCR เมื่อได้โคโลนีที่ให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส เลือกโคโลนีนั้นมาเลี้ยงและสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIA prep[®] จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งไปอ่านลำดับเบส



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการโคลนยีน HA ในลักษณะ tri-molecular ligation

3. การโคลน (cloning) ยีนแกนหลัก (backbone) ของ SIV (H1N1) และการสร้างจุดตัดของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction site) ภายในยีน

เริ่มจากการเพิ่มจำนวนยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ของ SIV A/SW/IA15/1930 (H1N1) เช่นเดียวกับการเตรียมชิ้นยีนเพื่อโคลน HA โดยใช้ไพรเมอร์สองคู่ที่ออกแบบให้เพิ่มจำนวนยีนแบ่งออกเป็นสองส่วน ซึ่งไพรเมอร์คู่ที่อยู่ภายในยีนจะถูกออกแบบให้มีลำดับเบสที่เป็นจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดยลำดับเบสของไพรเมอร์จะแสดงไว้ในตารางที่ 4 ซึ่งแต่ละชิ้นยีนที่มีการใส่จุดตัดไว้ที่ตำแหน่งต่างๆ ซึ่งเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วจะได้ชิ้นยีนขนาดต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 ทำการเชื่อมชิ้นยีนแต่ละชิ้นเข้าไปยัง cloning vector ทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้า *E.coli* TOP10 (Invitrogen) คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาว ซึ่งเป็นโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมมาคัดเลือกโดยวิธี colony PCR เลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกมาเลี้ยงและสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIA prep® จากนั้นทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วแยกชิ้นยีนมาเชื่อมกับ bidirectional plasmid เช่นเดียวกับการโคลนสายพันธุกรรม HA ทำการถ่ายฝาก (transformation)

เข้า *E.coli* TOP10 (Invitrogen) คัดเลือกโคโลนีโดยวิธี colony PCR เลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกมา
 เลี้ยงและสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIA prep[®] จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งไปอ่านลำดับเบส ซึ่ง
 ขั้นตอนการโคลนที่กล่าวมาข้างต้นจะแสดงในภาพที่ 12 และตำแหน่งที่มีการใส่จุดตัดของเอนไซม์
 ตัดจำเพาะได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

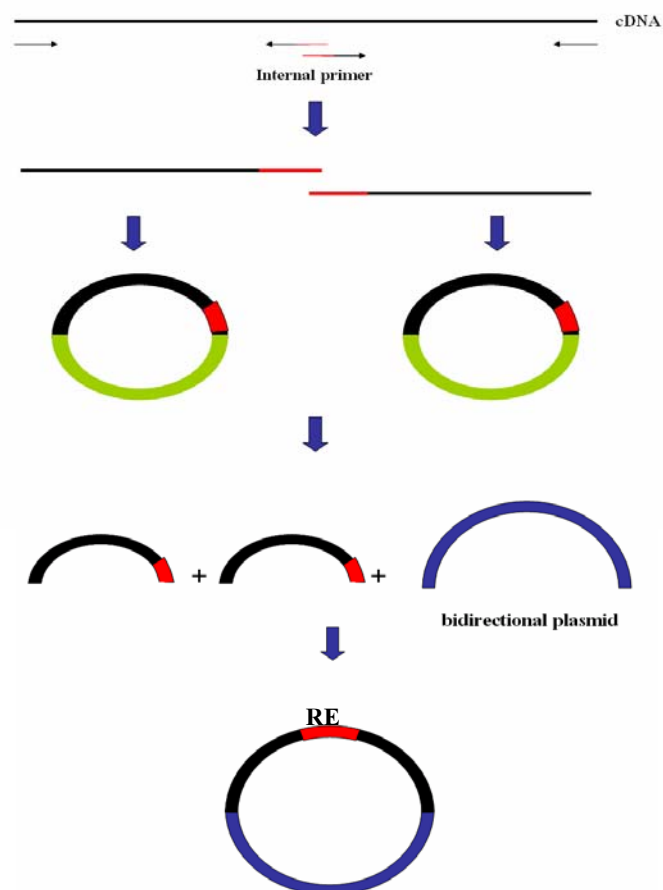
ตารางที่ 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนแกนหลัก

ยีน	จุดตัดของเอนไซม์	ไพรเมอร์
NS	<i>XhoI</i>	5' CC ACT CGA GCT GGA AAG C 3'
		5' G CTT TCC AGC TCG AGT GG 3'
M	<i>SacI</i>	5' CC CAC CCG AGC TCC AGT GC 3'
		5' GC ACT GGA GCT CGG GTG GG 3'
NP	<i>BspEI</i>	5' GG AGG TCC GGA GCC GC 3'
		5' GC GGC TCC GGA CCT CT 3'
PA	<i>BamHI</i>	5' GCA AGT TGG ATC CAA AGT GAG 3'
		5' CTC ACT TTG GAT CCA ACT TGC 3'
PB1	<i>XmaI</i>	5' CA TTA AGC CCC GGG ATG ATG ATG 3'
		5' CAT CAT CAT CCC GGG GCT TAA TG 3'
PB2	<i>BspEI</i>	5' CTG GTC CGG AAA ACA AGA TTC 3'
		5' GAA TCT TGT TTT CG GAC CAG 3'

หมายเหตุ: ลำดับเบสตัวหนา คือ จุดตัดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางที่ 5 ตำแหน่งของจุดตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใส่เข้าไปในสายพันธุกรรมของ SIV (H1N1) และขนาดของชิ้นยีนแกนหลักหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ยีน	ความยาว (คู่เบส)	ตำแหน่งของ จุดตัด	ขนาดของชิ้นยีนเมื่อถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ (คู่เบส)	
PB2	2,341	677	699	1,645
PB1	2,341	1,252	1,244	1,097
PA	2,233	1,256	1,248	985
NP	1,565	586	578	987
M	1,027	697	697	330
NS	890	206	206	684



ภาพที่ 12 ขั้นตอนการโคลน (cloning) ยีนแกนหลัก (backbone) ของ SIV (H1N1)

4. สร้าง reassortant ที่มียีน HA และยีน NA ของ HPAI H5N1

ใช้พลาสมิด pDZ ที่มียีน HA ที่ผ่านการดัดแปลงแล้วและพลาสมิด pDZ ที่มียีน NA ของ HPAI H5N1 และ ยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ของ SIV H1N1 อย่างละ 1 ไมโครกรัม ในสารละลาย lipo-amine transfection reagent (Mirus) นำไป transfect เซลล์ผสมระหว่าง เซลล์ 293T และ MDCK หลังจากนั้น 48-72 ชั่วโมง จะได้อนุภาคไวรัสในสารละลายเหนือเซลล์ (supernatant) ที่ถูก transfect นำสารละลายนั้นไป inoculate ไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน หลังจากนั้น 48 ชั่วโมงทำการเก็บ allantoic fluid

5. การตรวจสอบจำนวนสายพันธุ์กรรมของไวรัสและการวิเคราะห์ยีนของไวรัส rg1930H5N1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction analysis)

สกัด RNA จาก allantoic fluid ในขั้นตอนที่ 3 แล้วทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการทำ RT-PCR โดยใช้ universal primers เพื่อตรวจสอบว่าไวรัสมียีนครบทั้ง 8 ท่อน และทำการวิเคราะห์ต่อไปด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งได้ทำการ purify ขึ้นยีนแต่ละยีนก่อนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เนื่องจากแต่ละยีนของ SIV (H1N1) ได้ทำการใส่ restriction site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม ดังแสดงในตารางที่ 4 ส่วนยีน HA และยีน NA นอกจากจะทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วยังทำการเพิ่มจำนวนขึ้นยีนและส่งไปหาลำดับเบส

6. การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม (DNA analysis)

เมื่อได้ข้อมูลของลำดับเบสของสายพันธุ์กรรมแล้ว ทำการ assemble sequence โดยใช้โปรแกรม seqMan และทำการเปรียบเทียบ (Alignment) ลำดับเบส โดยใช้โปรแกรม MegAlign ของ DNASTAR package

7. ตรวจสอบ infectivity ของไวรัสโดยวิธี Immunofluorescent assay (IFA)

Inoculate rg1930H5N1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบน MDCK cells บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม inoculating media ประกอบด้วย MEM 2 µg/ml trypsin, 0.3% Bovine serum albumin และ 2% L-Glutamine แล้วบ่มที่ 37 °C ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ

เซลล์ MDCK ที่ถูก inoculate ด้วย rg1930H5N1 48 ชั่วโมง มาตรึงด้วย absolute methanol แล้วล้างด้วย PBST (PBS pH7.2, 0.05% tween 20) และบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ต่อ NP 1 ชั่วโมง ที่ 37 °C ล้างด้วย PBST แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิซึ่งเป็น MAb ต่อ IgG ของหนูที่ติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) บ่มที่ 37 °C นาน 30 นาที แล้วล้างออกด้วย PBST หลังจากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

8. การทำ virus titration (Quantal assay)

ทำการเจือจางเชื้อไวรัสเป็นลำดับ (Serial dilution) แบบ 10 เท่าแล้วทำการ inoculate เชื้อไวรัสลงในเซลล์ MDCK ที่มีลักษณะเป็น monolayer บ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหาร MEM ซึ่งประกอบด้วย Trypsin (Sigma) 2 µg/ml และ bovine serum albumin (BSA) fraction IV (Invitrogen) 0.3% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตผลทางพยาธิวิทยาในเซลล์ (Cytopathic effect; CPE) จะสังเกตเห็น viral infection และ replication จำนวน titer ของไวรัสคือ ส่วนกลับ (Reciprocal) ของ dilution ที่ทำให้ 50% ของเซลล์โฮสต์ที่ถูก inoculated มีการติดเชื้อ ซึ่งถูกคำนวณด้วยวิธีของ Reed และ Muench มีหน่วยเป็น Tissue culture infective dose (TCID₅₀)

9. การทดสอบความสามารถในการสร้าง plaque ของไวรัส

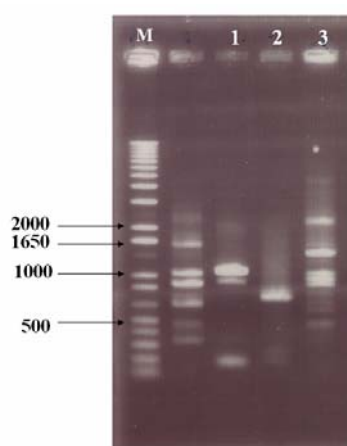
เตรียม MDCK cell ใน 6 well plate จำนวน 6 หลุม inoculate rg1930H5N1 500 ไมโครลิตร บน Monolayer ของ MDCK cell จำนวน 4 หลุม ส่วนอีก 2 หลุมเหลือไว้เป็นหลุมควบคุม บ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว ล้าง inoculum ออกด้วย PBS เติม media ที่ประกอบด้วย MEM, 0.3% BSA และ 1% agarose เติม trypsin (sigma) จำนวน 5 ไมโครกรัม ลงในหลุมควบคุม 2 หลุม หลุมที่มีไวรัส 2 หลุม (with trypsin) ส่วนหลุมที่มีไวรัสอีก 2 หลุม ไม่ต้องเติม trypsin (without trypsin) ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นำไปบ่มที่ 37 °C ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้อมสีเซลล์ด้วยวุ้นผสม neutral red และตรวจดู plaque ซึ่งจะมีลักษณะเป็นจุดใสๆ

ผลและวิจารณ์

ผล

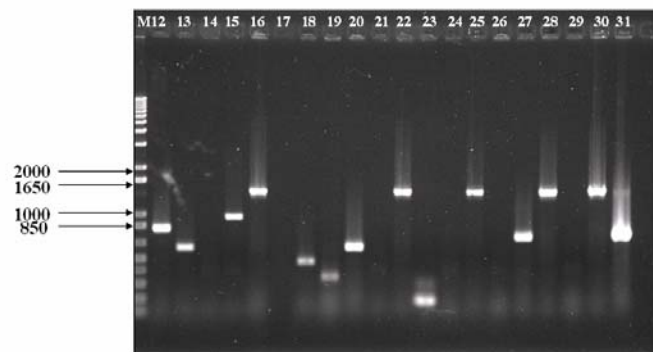
1. การสกัด RNA จากไวรัสและการสังเคราะห์ cDNA

จากการสกัด total RNA ของไวรัสจาก allantoic fluid ของไข่ไก่ฟักที่ inoculate ด้วย HPAI สายพันธุ์ H5N1 จากนั้นทำการถอดรหัสย้อนกลับเป็น cDNA และใช้ cDNA เป็นแม่แบบในการโคลนยีน NA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปรากฏว่าได้ชิ้นยีนขนาดประมาณ 1400 คู่เบส และเมื่อทำการหาลำดับเบสพบว่าเป็นยีน NA ส่วนการโคลนยีน HA ที่ทำโดยใช้ไพรเมอร์สองคู่ ปรากฏว่าได้ชิ้นยีนขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส (HA1) และ 650 คู่เบส (HA2) จากไพรเมอร์ Sa-HA-1, Bm-H5-1025R และ Bm-H5-1020, Sa-NS-890R ตามลำดับ ดังภาพที่ 13 และเมื่อทำการหาลำดับเบสพบว่าเป็นส่วนของยีน HA



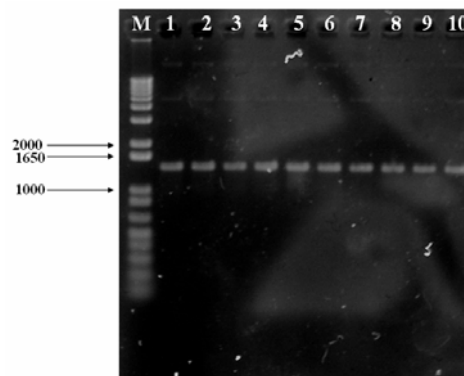
ภาพที่ 13 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของยีน HA1, HA2 และ NA โดย M คือ 1kb Plus DNA ladder 1 คือ ผลของชิ้นยีน HA1, 2 คือ ผลของชิ้นยีน HA2 และ 3 คือ ผลของชิ้นยีน NA

เมื่อทำการเชื่อมชิ้นยีน NA เข้ากับ pGEM T แล้วทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้า *E.coli* DH5 α ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยวิธี colony PCR ได้ผลการคัดเลือกโคโลนีดังภาพที่ 14 ซึ่งจำนวนโคโลนีที่ให้ผลบวก 5 โคลน จากจำนวนที่คัดเลือกทั้งหมด 31 โคลน



ภาพที่ 14 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคโลนีของยีน NA ใน pGEM-T โดย M คือ 1kb Plus DNA ladder ช่องที่ให้ผลบวก ซึ่งมีแถบ DNA ขนาด 1.4 kb คือ 16, 22, 25, 28 และ 30

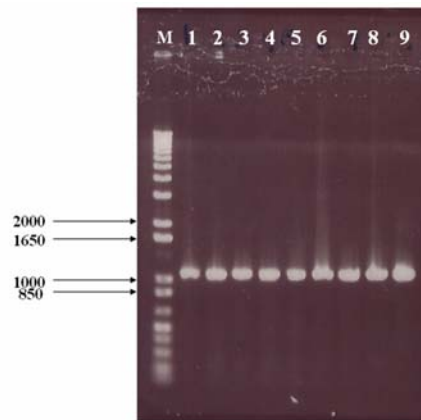
จากนั้นทำการเลือกโคโลนีนั้นมาเลี้ยงและสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIA prep® จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งไปอ่านลำดับเบส พบว่าเป็นลำดับเบสของยีน NA จากนั้นทำการแยกชิ้นยีนมาเชื่อมกับ bidirectional plasmid หลังจากการถ่ายฝากเข้า *E.coli* DH5α ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยวิธี colony PCR ได้ผลการคัดเลือกโคโลนีดังภาพที่ 15 ซึ่งทุกโคโลนีที่คัดเลือกมาให้ผลบวกทั้งหมด



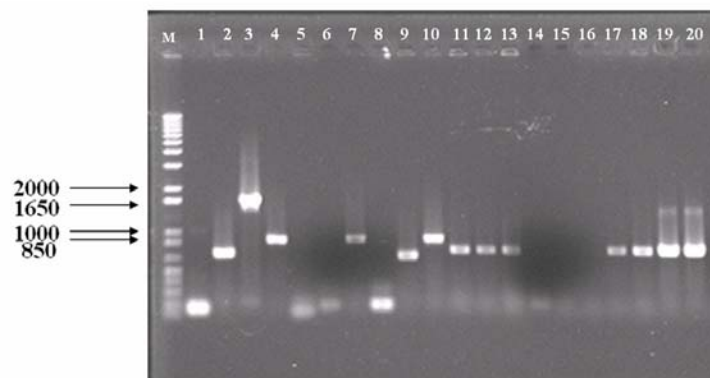
ภาพที่ 15 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคโลนีของยีน NA ในพลาสมิด pDZ โดย M คือ 1kb Plus DNA ladder ทุกโคโลนีให้ผลบวก

หลังจากการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน HA1 และ HA2 แล้วทำการเชื่อมแต่ละชิ้นเข้ากับ pGEM T แล้วทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้า *E.coli* DH5α ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยวิธี colony PCR ได้ผลการคัดเลือกโคโลนีของ HA1 และ HA2 ดังภาพที่ 16 และ 17

ตามลำดับ ซึ่งทุกโคลนที่เลือกมาของยีน HA1 ให้ผลบวกทั้งหมด ส่วนยีน HA2 ให้ผลบวก 7 โคลน จากโคลนที่คัดเลือกมาทั้งหมด 20 โคลน

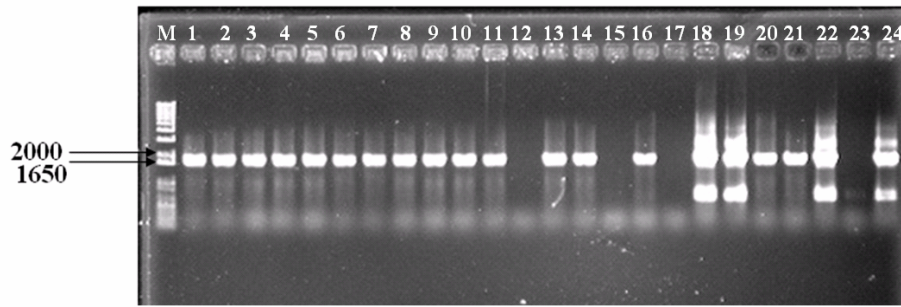


ภาพที่ 16 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคลนของยีน HA1 โดย M คือ 1kb Plus DNA ladder ทุกโคลนให้ผลบวก



ภาพที่ 17 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคลนของยีน HA2 โดย M คือ 1kb Plus DNA ladder ช่องที่ให้ผลบวก ซึ่งมีแถบ DNA ขนาด 650 kb คือ 2, 9, 11, 12, 13, 17, 18, 19 และ 20

จากนั้นทำการ subclone ชิ้นส่วนของยีน HA1 และ HA2 เข้าไปยังพลาสมิด pDZ แล้วทำการแล้วทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้า *E.coli* DH5 α ทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยวิธี colony PCR โดยผลแสดงตามภาพที่ 18 เมื่อเลือกโคลนได้แล้วทำการเลี้ยงแบคทีเรียและสกัดพลาสมิด หาลำดับเบสอีกครั้ง พบว่าลำดับเบสบริเวณ polybasic amino acid บริเวณ cleavage site ถูกกำจัดออกไปตามที่ต้องการ ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 18 Gel electrophoresis แสดงผลการคัดเลือกโคโลนีของยีน HA ที่ผ่านการตัดแปลงแล้วโดย M คือ 1kb Plus DNA ladder ช่องที่ให้ผลบวก ซึ่งมีแถบ DNA ขนาดประมาณ 1.7 kb

Majority	CAGAAATACCCCTCAAATTGAGACAAGA-----GGACTATTTGGGGCTATAGCAGCTTTTATAGAG	
	10 20 30 40 50 60 70	
DQ083550.seq	G.....GA.....G.....AGAAAAAGACA...T.....A.....	999
r1930H5N1_HA		1015
pDZ_1930H5N1_HA		1123

ภาพที่ 19 Alignment ระหว่างยีน HA ของสายพันธุ์รุนแรงซึ่งมี polybasic amino acid, ยีน HA จากไวรัส rg1930H5N1 และ ยีน HA ที่อยู่ในพลาสมิด pDZ ซึ่ง polybasic amino acid ถูกตัดออกไป

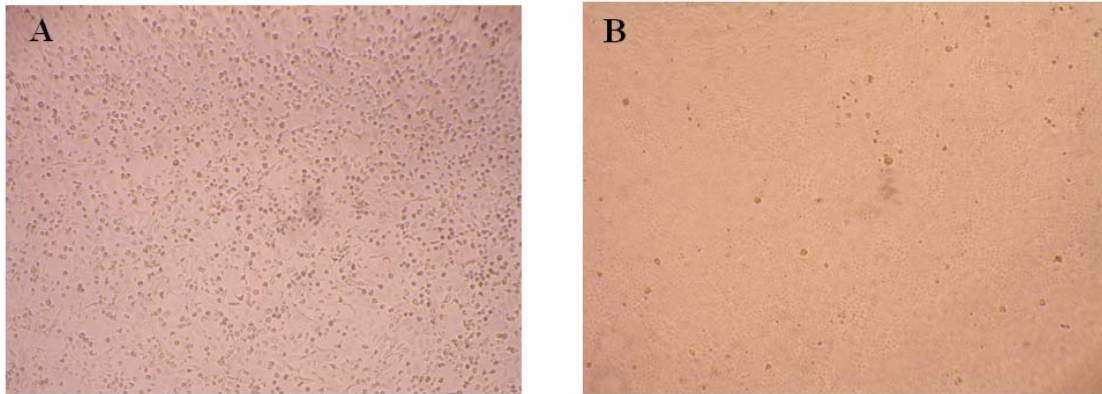
2. การโคลนและการแทรกจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของสายพันธุ์กรรมทั้งหกสายของ SIV H1N1

จากการโคลนชิ้นยีนโดยใช้ไพรเมอร์สองคู่เพื่อทำการแทรกจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้าไปยังสายพันธุ์กรรมของ SIV H1N1 เมื่อส่งพลาสมิดซึ่งมีชิ้นยีนไปตรวจสอบลำดับเบสพบว่าสามารถแทรกจุดตัดของเอนไซม์เข้าไปยังสายพันธุ์กรรมทั้งหกสายได้สำเร็จ ซึ่งลำดับเบสและจุดตัดได้แสดงไว้ในภาคผนวก

3. สร้าง reassortant ที่มียีน HA และยีน NA ของ HPAI H5N1

จากการทำการ transfection เรียกไวรัสลูกผสมที่ได้ว่า rg1930H5N1 ทำการเก็บสารละลายเนื้อเซลล์เพื่อ inoculate ลง MDCK cells และไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน พบว่าไวรัสไม่ทำให้ไข่ไก่ฟักเสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นลักษณะของไวรัสที่มีความรุนแรงของการก่อโรคต่ำ หลังจากนั้น

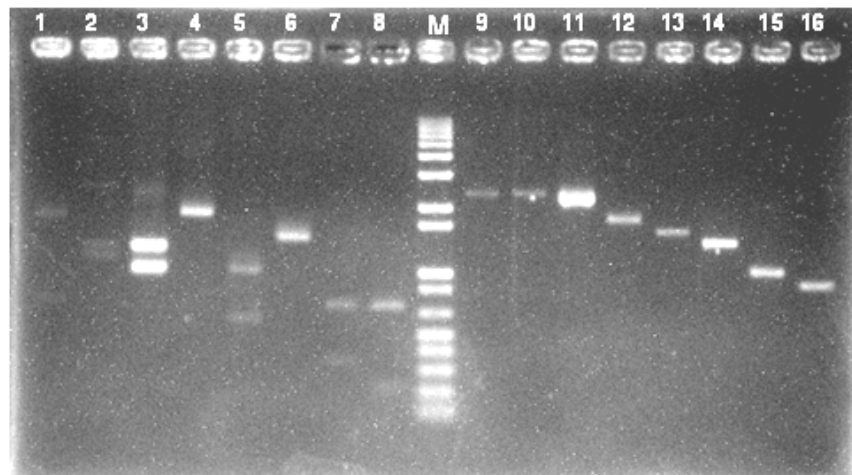
48 ชั่วโมง เก็บ allantoic fluid มาวัดปริมาณไวรัสด้วยการทำ Quantal assay และตรวจสอบผลบวก โดยวิธี IFA จากนั้นคำนวณไตเตอร์ของไวรัสโดยใช้วิธีของ Reich and Muench ปรากฏว่าได้ ปริมาณไวรัส 2×10^9 TCID₅₀/ml ส่วนไวรัสที่ทำการ inoculate ลง MDCK cells พบว่าเกิด CPE เมื่อเปรียบเทียบกับ control ดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 ภาพ MDCK cells ที่ถูก inoculate ด้วย rg1930H5N1 โดยภาพ A เป็น MDCK cell ที่ถูก inoculate ด้วย rg1930H5N1 พบว่าเกิด CPE ส่วน B เป็น MDCK cells ที่ถูก inoculate ด้วย control พบว่าไม่เกิด CPE

4. การตรวจสอบจำนวนสายพันธุกรรมของไวรัสและการวิเคราะห์ยีนของไวรัส rg1930H5N1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction analysis)

ทำการสกัด RNA ของไวรัสจาก allantoic fluid ทำ RT-PCR และทำการเพิ่มจำนวนยีนทั้งหมดของไวรัสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ และนำมาวิเคราะห์โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้ผลดังภาพที่ 21 แถวที่ 4 และ แถวที่ 6 (NA และ HA) จะไม่ถูกตัดด้วย BspEI ส่วนยีนอื่นๆที่มา จาก SIV (H1N1) จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเป็น marker ที่บรรจุเข้าไปในแต่ละยีน

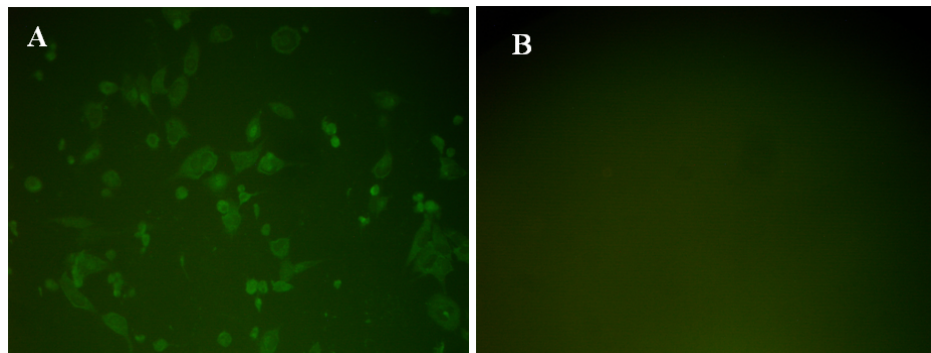


ภาพที่ 21 Gel electrophoresis แสดง restriction analysis ของยีนทั้ง 8 ท่อนของไวรัส rg1930H5N1 ช่องที่ 1 คือ PB2/BspEI, ช่องที่ 2 คือ PB1/XmaI, ช่องที่ 3 คือ PA/BamHI, ช่องที่ 4 คือ HA/ BspEI, ช่องที่ 5 คือ NP/ BspEI, ช่องที่ 6 คือ NA/ BspEI, ช่องที่ 7 คือ M/SacI และ ช่องที่ 8 คือ NS/XhoI. M คือ 1 kb ladder และช่องที่ 9-16 คือ ยีนของ rg1930H5N1 ที่ ไม่ได้ถูกตัดด้วย restriction enzyme.

ซึ่งยีนของ SIV H1N1 เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีขนาดดังนี้ ยีน PB2/ BspEI ได้ชิ้นขนาด 699 และ 1645 คู่เบส, PB1/XmaI ได้ชิ้นขนาด 1244 และ 1097 คู่เบส, PA/BamHI ได้ชิ้นขนาด 1248 และ 985 คู่เบส, NP/ BspEI ได้ชิ้นขนาด 578 และ 987 คู่เบส, M/SacI ได้ชิ้นขนาด 697 และ 330 คู่เบส และ NS/XhoI ได้ชิ้นขนาด 206 และ 684 คู่เบส จะเห็นได้ว่าใน lane 4 และ 6 ซึ่งเป็นยีน HA และ NA ตามลำดับ ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังจะเห็นได้เมื่อเปรียบเทียบกับ lane 12 และ 14 ซึ่งเป็นยีนของ rg1930H5N1 ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ภาพที่ 21) แสดงว่าไวรัสที่ได้ประกอบไปด้วยยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS ของ swine influenza virus (SIV) H1N1 ตามที่ต้องการ และนอกจากนี้ได้สกัด RNA ของ rg1930H5N1 ทำ RT-PCR และเพิ่มจำนวนบางส่วนของสายพันธุกรรม HA และ NA นำไปหาลำดับเบสเพื่อเป็นการยืนยันว่าได้สายพันธุกรรม HA และ NA ของ rescued virus ประกอบด้วยสายพันธุกรรมตามที่ได้ทำการ transfection ไว้ โดยเฉพาะ HA ซึ่งผลที่ได้ยืนยันว่าเป็น HA และ NA ของ HPAI (H5N1) และได้ทำการกำจัดบริเวณ polybasic amino acid บริเวณ cleavage site ออกไปแล้วจริง และทำการเปรียบเทียบลำดับเบสกับลำดับเบสภายใน พลาสมิด pDZ พบว่ามีความเหมือนกัน 100% ดังภาพที่ 19

5. การตรวจสอบ infectivity ของไวรัสโดยวิธี Immunofluorescent assay (IFA)

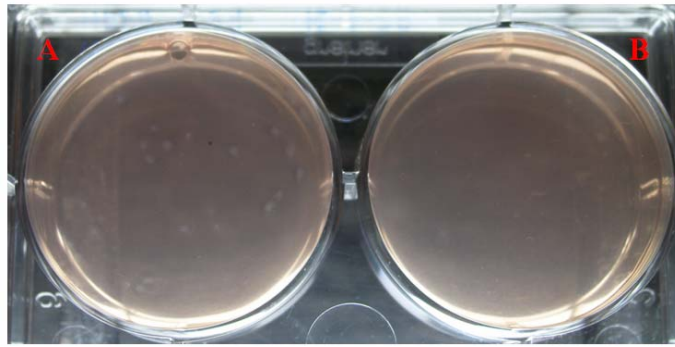
เมื่อนำเซลล์ MDCK ที่ถูก inoculate ด้วย rg1930H5N1 48 ชั่วโมง มาตรึงด้วย absolute methanol และบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ต่อ NP และย้อมด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) นำมาส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์จะเห็นเซลล์ที่ถูก infect ด้วย rg1930H5N1 ติดสีเรืองแสงสีเขียว ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีไวรัสจะไม่มีการเรืองแสงในที่มีค (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 ผลการทำ IFA โดย A คือ IFA ของ rg1930H5N1 จาก allantoic fluid ส่วน B คือ เซลล์ควบคุม

6. การทดสอบความสามารถในการสร้าง Plaque

เมื่อทำ plaque assay ได้ผลตามภาพที่ 23 จะพบว่า rg1930H5N1 virus สามารถสร้าง plaque ได้ในอาหารที่มี trypsin เท่านั้น ซึ่งเป็นข้อยืนยันได้ว่า rg1930H5N1 virus เป็นไวรัสที่มีความรุนแรงในการก่อโรคลด (low pathogenicity) (Horimoto and Kawaoka, 2001)



ภาพที่ 23 ผล plaque assay โดย A คือ rg1930H5N1 virus ในอาหารที่มี trypsin ส่วน B คือ rg1930H5N1 virus ในอาหารที่ไม่มี trypsin

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

สามารถใช้เทคนิค reverse genetics สร้างไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ได้โดยเรียกไวรัสที่สร้างขึ้นว่า rg1930H5N1 และเมื่อทำการตรวจสอบยีนทั้งแปดตอนของไวรัสโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction analysis) พบว่าประกอบด้วยหกยีนของ swine influenza virus (SIV) H1N1 ได้แก่ ยีน PB2, PB1, PA, NP, M และ NS และอีกสองยีนคือ HA และ NA เป็นของ HPAI H5N1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยโดยส่วนของ HA ที่ผ่านการดัดแปลงกำจัดส่วนของ polybasic amino acid ออกไป เพื่อให้ไวรัสที่มีความรุนแรงในการก่อโรคลดลง และการเปลี่ยนแปลงที่ cleavage site ของ HA ไม่มีผลต่อความเป็นแอนติเจนของ HA เพราะตำแหน่งของ epitopes จะอยู่บนส่วนของ globular head ของ HA (Horimoto *et al.*, 2006)

เมื่อทำการตรวจสอบลำดับเบสของไวรัสพบว่าสามารถกำจัดส่วนของ polybasic amino acid ออกไปได้จริง และพบว่าไวรัสที่สร้างขึ้นมีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำเพราะในขั้นตอนการ inoculate ไวรัสไปยังไข่ไก่ฟักตัวอ่อนของไก่ไม่เสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมง และมีการทำ plaque assay ก็พบว่าไวรัสสามารถสร้าง plaque ได้ในอาหารที่มี trypsin เท่านั้น ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานทดลองของ Subbarao และคณะ (2002) ที่ใช้เทคนิค reverse genetics แบบ 12 พลาสมิด สร้างไวรัสเพื่อใช้เป็นวัคซีน โดยใช้ internal genes ทั้ง 6 เป็นของ A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) ส่วนยีน HA และ NA ได้มาจาก influenza A (H5N1) ของไวรัสที่แยกได้ในฮ่องกงปี 1997 มีการเปลี่ยนแปลงยีน HA ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนตัวที่ 156 ที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโนเซอร์รินโดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์เฉพาะที่ (site-directed mutagenesis) ซึ่งพบว่าสามารถสร้างไวรัสได้ในปริมาณ $10^{8.75}$ EID₅₀/ml โดยไม่ทำให้ตัวอ่อนของไก่ตายและไม่เกิด plaque ใน MDBK cell ถ้าไม่มี trypsin (Subbarao *et al.*, 2003) และสอดคล้องกับงานของ Liu และคณะ (2003) ที่ได้สร้างวัคซีนไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N3 โดยใช้เทคนิค reverse genetics แบบ 8 พลาสมิดและได้มีการกำจัดส่วนของ polybasic amino acid ออก ซึ่งไวรัสที่สร้างได้สามารถเจริญได้ในไข่ไก่ฟักโดยไม่ทำให้ตัวอ่อนตายและไม่สามารถสร้าง plaque ได้ถ้าหาก ไม่มี trypsin เช่นเดียวกัน (Liu *et al.*, 2003)

และยังมีหลายๆ การทดลองที่ใช้เทคนิค reverse genetics ในการสร้างไวรัสเพื่อใช้เป็นวัคซีนซึ่งมีการดัดแปลงยีนที่แตกต่างจากการทดลองนี้ เพื่อให้ได้ไวรัสที่มีคุณสมบัติที่ตรงตามชนิดของวัคซีนที่จะผลิต ดังเช่น Pakkin และคณะ (1997) ได้ใช้เทคนิค reverse genetics ในการสร้าง

วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live attenuated) โดยทำการดัดแปลงยีน PB2 โดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์เฉพาะที่ (Parkin *et al.*, 1997) นอกจากนี้ Song และคณะ (2007) ได้ใช้เทคนิคนี้เช่นกันในการสร้างวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์แต่ทำการกลายพันธุ์เฉพาะที่ในยีน PB1 และ PB2 (Song *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ ระบบไวรัสที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้มีข้อดีกว่าระบบไวรัสที่ได้ตีพิมพ์ข้างต้น เนื่องจากระบบไวรัสที่สร้างขึ้นนี้มีการบรรจุ marker ที่เป็นจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะในยีนแกนหลักทั้งหกยีน ช่วยให้มีความสะดวกในการตรวจสอบและให้ผลรวดเร็ว

เมื่อทำ Immunofluorescent assay และทำการคำนวณไตเตอร์ของไวรัส rg1930H5N1 โดยใช้วิธีของ Reed and Muench ปรากฏว่าได้ปริมาณไวรัส 2×10^9 TCID₅₀/ml แสดงให้เห็นว่าเทคนิค reverse genetics สามารถผลิตไวรัสได้จำนวนมาก และยังเป็นอีกระบบหนึ่งที่น่าจะเป็นทางเลือกในการใช้เป็นไวรัสต้นแบบในการผลิตวัคซีน

ในขณะนี้ผลจากงานวิจัยได้ไวรัสที่พร้อมสำหรับเป็น seed vaccine แล้ว ยังคงรอทำการทดลองในสัตว์ทดลอง เพื่อดูความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไวรัสที่สร้างขึ้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารถใช้เทคนิค reverse genetics สร้างไวรัสที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ สามารถดัดแปลงไวรัสให้มีความรุนแรงลดลงได้ไวรัสปริมาณสูงและมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นเชื้อไวรัสต้นแบบในการผลิตวัคซีน ในกรณีที่เกิดการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ สามารถใช้เทคนิคนี้สร้างไวรัสที่มีความเหมือนกับสายพันธุ์ที่ระบาดเพื่อนำไปผลิตวัคซีนได้อย่างรวดเร็ว

นอกจากนี้เทคนิค reverse genetics ยังเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับจีโนมของไวรัส ช่วยให้เข้าใจถึงหน้าที่และความสำคัญของยีนต่างๆ ของไวรัสได้อีกด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

มรกต ตันติเจริญ และ อ้อมใจ ไทรเมฆ. 2548. ไข้หวัดนกโรคอุบัติใหม่บนโลกใบเก่า. แหล่งที่มา: www.biotec.or.th. 15 ธันวาคม 2549.

พรทิพา เล็กเจริญสุข, เณิมพล เล็กเจริญสุข, ทิพยวรรณ ธนไพศาล และ วันทนี ทมมิด. 2549. บทบาทของวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนกชนิดรุนแรงสายพันธุ์ H5N1 เพื่อการควบคุมโรคในสัตว์ปีกสำหรับประเทศไทย. บริษัทโรงพิมพ์อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ

ภาวพันธ์ ภัทรโกศล และ ประเสริฐ เอื้อวรากุล. 2549. ไข้หวัดใหญ่/ไข้หวัดนก. บริษัทโนว์เลจด์เพรส จำกัด, กรุงเทพฯ

เชิดชัย คำวิจิตรรัตนโยธา, สุรสิงห์ ศรีจำรูญ และ เขาววิทย์ กังแฮ. 2549. การควบคุมโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ

_____. 2549. คู่มือปฏิบัติงานควบคุมโรคไข้หวัดนก. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ

สุรัชย์ ศิลาแก้ว. 2550. การศึกษาความสูญเสียทางเศรษฐกิจและค่าใช้จ่ายทางภาคภูมิด้านไข้หวัดนก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Auewarakul, P., O. Supawiwat, A. Kongchanagul, C. Sangma, Y. Suzuki, K. Ungchusuk, S. Louisirirochanakul, H. Lerdsunran, P. Pooruk, A. Thitithanyanont, C. Pittayawonganon, C. Guo, H. Hiramatsu, W. Jampangern, S. Chunsutthiwat and P. Puthavathana. 2007. An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. **Journal of virology**. 81 (18): 9950-9955.

Biswas, S. K., P. L. Boutz and D. B. Nayak. 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with Influenza virus polymerase proteins. **Journal of virology**. 72 (7): 5493-5501.

- Brown, E. G. 2000. Influenza virus genetics. **Biomed&Pharmacother.** 54: 196-209.
- Brownlee, G. G. and J. L. Sharps. 2002. The RNA polymerase of influenza A virus is stabilized by interaction with its viral RNA promoter. **Journal of virology.** 76 (14): 7103-7113.
- Crawford, J., B. Wilkinson, A. Vosnesensky, G. Smith, M. Garcia, H. Stone and M. L. Perdue. 1999. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccine protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. **Vaccine** 17: 2265-2274.
- Elton, D., E. Medcalf, K. Bishop and P. Digard. 1999. Oligomerization of the influenza virus Nucleoprotein: identification of positive and negative sequence elements. **Virology.** 260: 190-200.
- Ferraris, O. and B. Lina. 2008. Mutation of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. **Journal of clinical virology.** 41: 13-19.
- Fodor, E., D. C. Pritlove and G. G. Brownlee. 1994. The influenza Virus panhandle is involved in the initiation of transcription. **Journal of virology.** 68: 4092-4096.
- Fodor, E., L. L. M. Poon, A. Mikulasova, L. J. Mingay and G. G. Brownlee. 2001. Transcription of influenza A virus genes. **International congress series.** 1219: 427-434.
- Fodor, E., P. Fechter, M. Crow, T. Deng, L. Mingay, J. Sharps and G. G. Brownlee. 2004. Mutational analysis of the PA and PB2 subunits of the influenza RNA polymerase complex leads to new insights into function. **International congress series.** 1263: 25-28.
- Gabriel, G., B. Dauber, T. Wolff, O. Planz, H. D. Klenk and J. Stech. 2005. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. **PNAS.** 102: 18590-18595.

- Gao, W., A. C. Soloff, X. Lu, A. Monticalvo, D. C. Nguyen, Y. Matsuoka, P. D. Robbins, D. E. Swayne, R. O. Donis, J.M. Katz, S. M. Barratt-Boyes and A. Gambotto. 2006. Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. **Journal of virology**. 80 (4): 1959-1964.
- Girard, M. P., T. Cherian. Y. Pervikov and M. P. Kieny. 2005. A review of vaccine research and Development: Human acute respiratory infections. **Vaccine**. 23: 5708-5724.
- Haque, A., D. Hober and L. H. Kasper. 2007. Confront potential influenza A (H5N1) pandemic with better vaccines. **Emerging Infectious Disease**. 13: 1512-1518.
- Hernandez, L. D., L. R. Hoffman, T. G. Wolfsberg and J. M. White. 1996. Virus-cell and cell-cell Fusion. **Annu Rev. Cell Dev. Biol**. 12: 627-661.
- Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R. G. Webster and D. R. Perez. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Arch Virol**. 146: 2275-2289.
- Honda, A., K. Mizumoto and A. Ishihama. 1999. Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. **Genes cells** 4: 475-485.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 1994. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. **Journal of virology**. 68 (5): 3120-3128.
- _____. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A virus. **Clinical microbiology reviews**. 14 : 129-149.
- _____. 2006. Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. **Trends in molecular medicine**. 12 (11): 506-514.

- Horimoto, T., A. Takada, K. Fujii, H. Goto, M. Hatta, S. Watanabe, K. Iwatsuki-Horimoti, M. Ito, Y. Tagawa-Sakai, S. Yamada, H. Ito, T. Ito, M. Imai, S. Itamura, T. Odagiri, M. Tashiro, W. Lim, Y. Guan, M. Peiris and Y. Kawaoka. 2006. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. **Vaccine**. 24: 3669-3676.
- Hulse, D. J., D. R. Perez and R. G. Webster. 2004. Molecular determinants of the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. **International congress series**. 1263: 114-117.
- Isin, B., P. Doruker and I. Bahar. 2002. Functional motion of influenza virus hemagglutinin: a Structure-based analytical approach. **Biophysical Journal**. 82: 569-581.
- Jia-hai, L., Z. Ding-mei and W. Guo-ling. Highlight the significance of genetic evolution of H5N1 avian flu. **Chinese medical journal**. 119 (17): 1458-1564.
- Kash, J. C., A. G. Goodman, M. J. Korth and M. G. Katze. 2006. Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. **Virus research**. 119: 111-120.
- Kemble, G. and H. Greenberg. 2003. Novel generations of influenza vaccines. **Vaccine**. 21: 1789-1795.
- Kenji, O., S. Yoshida, Md. Z. Dewan, H. Shimura, N. Sakamaki, F. Takeshita, N. Yamamoto and K. Okuda. 2007. Mutant influenza A virus nucleoprotein is preferentially localized in the cytoplasm and its immunization in mice show higher immunogenicity and cross-reactivity. **Vaccine**. 25: 4291-4300.
- Kerry, P. S., N. Willsher and E. Fordor. 2008. A cluster of conserved basic amino acids near the C-terminal of the PB1 subunit of the influenza virus RNA polymerase is involved in the regulation of viral transcription. **Virology**. 372 (1): 202-210.

- Lamb, R. A. and R. M. Krung . 1996. *Orthomyxoviridae*: The viruses and their replication, pp. 1353-1395. In D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. **Field virology**. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia.
- Lanzrein, M., A. Schlegel and C. Kempf. 1994. Entry and uncoating of enveloped viruses. **Biochem J.** 302: 313-320.
- Lewis, D. B. 2006. Avian flu to human influenza. **Annu. Rev. Med.** 57: 139-154.
- Li, M-L., P. Rao and R. M. Krug. 2001. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. **The EMBO Journal.** 20: 2078-2086.
- Liu, M., J. M. Wood, T. Ellis, S. Krauss, P. Seiler, C. Johnson, E. Hoffmann, J. Humberd, D. Hulse, Y. Zhang, R. G. Webster and D. R. Perez. 2003. Preparation of standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. **Virology.** 314: 580-590.
- Liu, T. and Z. Ye. 2002. Restriction of viral replication by mutation of the influenza virus matrix protein. **Journal of virology.** 76 (24): 13055-13061.
- Liu, T. and Z. Ye. 2004. Alteration of the basic amino acid domain of wild-type matrix protein reduced influenza virus replication at non-permissive temperature. **International congress series.** 1263: 83-89.
- Luke, C. J. and K. Subbarao. 2006. Vaccines for pandemic influenza. **Emerging infectious Diseases.** 12: 66-72.
- Mccauley, J. W. and B. W. J. Mahy. 1983. Structure and function of the influenza virus genome. **Biochem. J.** 211: 281-294.

National Center for Biotechnology Information. แหล่งที่มา:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.figgrp.524>, 3 เมษายน 2551.

Nature. แหล่งที่มา: <http://www.nature.com/emboj/journal/v22/n5/images/7595019f8.jpg>, 9 สิงหาคม 2551.

Neumann, G. and Y. Kawaoka. 2001. Reverse genetics of influenza virus. **Virology**. 287: 243-250.

_____. 2002. Synthesis of influenza virus: new impetus from an old enzyme, RNA polymerase I. **Virus research**. 82: 153-158.

Palese, P. 2006. Making better influenza virus vaccines?. **Emerging Infectious Disease**. 12: 61-65.

Palese, P. and M. L. Shaw. 2007. *Orthomyxoviridae*: The viruses and their replication, pp. 1647-1689. In D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. **Field virology**. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia.

Park, M-S., J. Steel, A. Garsia-Sastre, D. Swayne and P. Palese. 2006. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: Avian influenza and Newcastle disease. **PNAS**. 103: 8203-8208.

Parkin, N. T., P. Chiu and K. Coelingh. 1997. Genetically engineer live attenuated influenza A virus vaccine candidates. **Journal of virology**. 71: 2772-2778.

Pasteur Institute of Iran Influenza Unit. แหล่งที่มา:

http://www.pasteur.ac.ir/researchDepartment/flu/virus/influ_virus.htm, 25 พฤษภาคม 2551.

- Pavesi, A. 2007. Pattern of nucleotide substitution in the overlapping nonstructural genes of influenza A virus and implication for the genetic diversity of the H5N1 subtype. **Gene**. 402: 28-34.
- Perdue, M. L., M. Garcia, D. Senne and M. Fraire. 1997. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. **Virus research**. 49: 173-186.
- Portela, A. and P. Digard. 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. **Journal of General Virology**. 83: 723- 734.
- Qiao, C., K. Z. Yu, Y. P. Jiang, Y. Q. Jia, G. B. Tian, M. Liu, G. H. Deng, X. R. Wang, Q. W. Meng and X. Y. Tang. 2003. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase genes. **Avian Pathol**. 32 (1): 25-32.
- Qiao, C., G. Tian, Y. Jiang, Y. Li, J. Shi, K. Yu. And H. Chen. 2006. Vaccines developed for H5 highly pathogenic avian influenza in china. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 1081: 182-192 .
- Reed, L. J., H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am J Hyg**. 27: 493-497.
- Richard, M., C. Deleage, M. Barthelemy, Y. P. Lin, A. Hay, B. Lina and O. Ferraris. 2008. Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase inhibitors. **Journal of clinical virology**. 41: 20-24.
- Royal Society of Chemistry. แหล่งที่มา: www.rsc.org/ej/MB/2007/b611613m/b611613m-f1.gif, 6 มิถุนายน 2551.

- Salvatory, M. and A. Garcia-Sastre. Virus versus host: modulation of the host α/β interferon pathways by the influenza A virus NS1 protein. **International congress series.** 1219: 513-520.
- Skehel, J. J. and D. C. Wiley. 2000. Receptor binding and membrane fusion on virus entry: the influenza hemagglutinin. **Annu. Rev. Biochem.** 69: 531-569.
- Song, H., G. R. Nieto and D. R. Perez. 2007. A new generation of modified live-attenuated avian Influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. **Journal of virology.** 81: 9238-9284.
- Steinhauer, D. A., S. A. Wharton, J. J. Skehel and D. C. Wiley. 1995. Studies of the membrane fusion activities of fusion peptide mutant of influenza virus hemagglutinin. **Journal of virology.** 69: 6643-6651.
- Stephenson, I., K. G. Nicholson, J. M. Wood, M. C. Zambon and J. M. Katz. 2004. Confronting the avian influenza threat: vaccine development for a potential pandemic. **The lancet.** 4: 499-509.
- Subbarao, K., H. Chen, D. Swayne, L. Mingay, E. Fodor, G. Brownlee, X. Xu, X. Lu J. Katze, N. Cox and Y. Matsuoka. 2003. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generation by plasmid-based reverse genetics. **Virology.** 305: 192-200.
- Subbarao, K. and C. Luke. 2007. H5N1 viruses and vaccines. **PLoS Pathogens.** 3:1-3.
- Subbarao, K. and T. Joseph. 2007. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. **Nature reviews.** 7: 267-278.

- Tian, G., S. Zhang, Y. Li, Z. Bu, P. Liu, J. Zhou, C. Li, J. Shi, K. Yu and H. Chen. 2005. Protective efficacy in chicken, greese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine develop by reverse genetics. **Virology**. 341: 153-162.
- Toro, H., D-C. C. Tang, D. L. Suarez, J. Zhang and Z. Shi. 2008. Protection of chickens against avian influenza with non-replicating adenovirus-vectored vaccine. **Vaccine**. Article in press.
- University of Arizona. แหล่งที่มา:
http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC433/F08/Influenza%20virus%20RNA%20synthesis_files/image002.jpg, 5 พฤษภาคม 2551.
- Veits, J., D. Wiesner, W. Fuch, B. Hoffmann, H. Granzow, E. Starick, E. Mundt, H. Schirrmeier, T. Mebatsion, T. C. Mettenleiter and A. Romer-Oberdorfer. 2006. Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chicken against Newcastle disease and avian influenza. **PNAS**. 103: 8197-8202.
- Voyles, B. A. 2002. **The biology of viruses**. second edition. McGrawHill. Singapore.
- Webby, R. J., D. R. Perez, J. S. Coleman, Y. Guan, J. H. Knight, E. A. Govorkova, L. R. McClain-Moss, J. S. Peiris, J.E. Rehg, E. I. Tuomanen and R. G. Webster. 2004. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. **The lancet**. 363: 1099-1103.
- Ye, Z., T. Liu, D. P. Offringa, J. Mcinnisc and R. A. Levandowski. 1999. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. **Journal of virology**. 73 (9): 7467-7473.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ลำดับเบสของสายพันธุกรรมทั้ง 8 ของ swine influenza virus (H1N1) ที่ใช้เป็นยีนแกนหลักของ
rg1930H5N1

1.ลำดับเบสของสายพันธุ์กรรมสายที่ 1 PB2

PB2

GATCGCTCTTCTGGGAGCGAAAGCAGGTCAAATATATTCAATATGGAGAGAATAAAA
 GAACTAAGGGATCTAATGTCACAGTCTCGCACTCGCGAGATACTCACAAGGACCACC
 GTGGACCATATGGCCATAATCAAGAAGTACACATCAGGAAGACAGGAGAAAAACCC
 CGCACTTAGAATGAAATGGATGATGGCAATGAAATATCCAATTACAGCAGACAAGA
 GGATAATTGAGACAATCCCTGAGAGAAATGAGCAAGGGCAAACCTCTATGGAGTAAA
 ACGAGCGATGCCGGATCAGACCGAGTGATGGTATCACCTCTGGCTGTGACATGGTGG
 AATAGGAATGGACCAACGACAAGTACAGTTCACTATCCAAAAATCTACAAAACCTTAC
 TTTGAGAAAGCCGAAAGGTTAAAACATGGAACCTTTTGGCCCTGTCCATTTTCGGAAAC
 CAAGTCAAAATACGTCGAAGAGTTGACATAAATCCAGGTCATGCAGATCTCAGTGCC
 AAAGAAGCACAAGATGTTATCATGGAAGTTGTTTTCCCAAACGAAGTGGGAGCCCGA
 ATACTAACATCGGAATCGCAACTAATGATAACTAAAGAAAAGAAAGAAGAACTCCA
 GGATTGCAAAATTTCTCCTTTAATGGTGGCATAACATGTTGGAAAGAGAACTGGTCCCG
GAAAACAAGATTCTCTCCAGTGGCTGGTGGGACAAGCAGTGTGTACATTGAAGTGTT
 GCATTTGACTCAAGGGACATGCTGGGAACAGCTATACACTCCAGGGGGGGAAGTGA
 GGAACGATGATGTTGACCAAAGCTTAATTATAGCTGCTAGAAGCATAGTGAGAAGAG
 CGACAGTATCTGCAGATCCACTGGCATCTCTGTTGGAAATGTGCCACAGCACACAGA
 TTGGTGGAAATAAGGATGGTGGACATCCTTAGGCAGAACCCGACAGAAGAGCAGGCC
 GTGGATATATGCAAGGCAGCAATGGGTCTGAGAATTAGCTCATCCTTTAGCTTTGGC
 GGGTTCACATTTAAGAGAACAAAGTGGCTCATCAGTCAAGAAGGAGGAGGAAGTACT
 TACTGGCAATCTCCAAACATTGAAGATAAGAGTGCATGAGGGATATGAAGAATTCAC
 AATGGTTGGGAGAAGAGCAACAGCTATACTCAGAAAAGCGACTAGGAGATTGGTTC
 AGCTAATAGTGAGTGGGAGAGACGAGCAGTCGATTGCCGAAGCAATAATCGTGGCC
 ATGGTGTTTTTACAAGAGGATTGTATGATAAAGGCAGTTAGGGGTGATCTGAATTC
 ATTAATAGGGCGAACCAGCGATTGAACCTATGCACCAACTTTTGAGGCATTTTCAA
 AAGGATGCAAAAGTGCTTTTTTCAAATTGGGGAATTGAACCCATAGACAATGTGATG
 GGAATGATTGGGATACTGCCCCACTTGACTCCAAGTACTGAGATGTCAATGAGAGGA
 GTGAGAATCAGCAAGATGGGAGTAGATGAGTACTCCAGCACAGAGAGGGTGGTGGT
 GAGCATTGACCGTTTTTTAAGAGTCCGAGACCAACGAGGGAACGTACTATTGTCTCC
 TGAGGAGGTCAGCGAAACACAGGGAACAGAGAAGTTGACGATAACTTATTCATCGT

CAATGATGTGGGAGGTTAATGGCCCTGAATCAGTGTTGGTCAACACCTATCAGTGGA
 TCATCAGAACTGGGAACTGTTAAAATTCAGTGGTCACAGGATCCTACAATGCTAT
 ACAATAAAATGGAATTTGAACCATTTCAATCTTTGGTTCCTAAGGCTGCAAGAGGTC
 AATACAGTGGGTTTGTGAGAACTCTATTCCAGCAAATGAGGGATGTGCTTGGAACAT
 TTGACACTGTTTCAGATAATAAACTTCTCCCCCTTGCAGCTGCTCCACCAAAGCAGAG
 TAGAATGCAGTTTTCTTCTCTGGCTGTGAATGTAAGAGGATCAGGAATGAGAATACT
 TGTAAGGGGCAATTCTCCTGTGTTCAACTACAACAGGACCACTAAGAGACTCACAGT
 TCTCGGAAAGGATGCAGGTGCTTTAACTGAAGACCCAGATGAAGGCACAACCTGGAGT
 GGAGTCTGCTGTTCTGAGAGGATTCTCATTCTGGGCAAAGAAGACAGGAGATATGG
 GCCAGCATTAAGCATCAATGAACTGAGCAATCTTGCAAAAGGGGAGAAGGCTAATG
 TACTAATTGGGCAGGGAGACGTGGTGTGTTGGTAATGAAACGGAAACGGGACTCTAGC
 ATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAAGAATTCGGATGGCCATCAATTAGTGT
 CAAATAGTTTAAAAACGACCTTGTTTCTACTAATAGAAGAGCGATG

หมายเหตุ: บริเวณลำดับเบสที่เป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
 BspEI

2. ลำดับเบสของสายพันธุกรรมสายที่ 2 PB1

PB1

GATCGCTCTTCTGGGAGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACT
 TTGCTTTTCCTGAAAGTGCCAGCGCAAAATGCTATAAGCACAAACGTTCCCTTACACTG
 GAGACCTCCTTACAGCCATGGGACAGGAACAGGATATACCATGGATACTGTCAACA
 GAACACATCAGTACTCAGAAAAGGGAAAATGGACAACAAACACTGAACTGGAGCA
 CCACAATAAACCCGATTGATGGACCACTGCCAGAAGATAATGAACCGAGTGGTTAT
 GCCCAAACAGATTGTGTATTGGAAGCAATGACTTTCCTTGAGAAGTCCCACCCCGGT
 ATCTTTGAAAACATGCCTTGAAACGATGGAAGTTGTTTCAGCAAACACGAGTGGAC
 AAGCTGACGCAAGGCCGACAGACCTATGACTGGACTCTAAATAGGAACCAGCCTGCT
 GCAACAGCATTGGCCAACACAATAGAAGTGTTTCAGATTAAATGGCCTCACGGCCAAT
 GAATCTGGAAGGCTCATAGACTTCCTCAAGGATGTTATGGATTGATGGACAAAGGA
 GAAATGGAAATCACAACCCATTTTCAGAGAAAAAGAAGAGTGAGAGACAACATGAC
 TAAGAAAATGGTGACGCAGAGAACAATAGGTAAAAAGAAGCAGAGGTTGAACAAA

AGAAGTTATCTAATCAGGGCACTGACCCTGAACACAATGACAAAAGATGCTGAGAG
AGGGAAGCTAAACGGAGAGCGATTGCCACCCAGGGATGCAAATACGGGGATTG
TATATTTTGTGAGACACTGGCAAGGAATATATGTGAAAACTTGAACAATCAGGAC
TGCCAGTTGGAGGTAATGAGAAGAAAGCCAAGTTGGCAAATGTTGTAAGAAAAATG
ATGACCAATTCTCAGGACACTGAGCTTTCTTTACCATCACTGGAGATAACACCAAAT
GGAATGAAAATCAGAATCCTCGGATGTTTTTGGCTATGATCACGTACATAACCAGAA
ATCAGCCCGAATGGTTCAGGAATGTTCTGAGTATTGCTCCAATAATGTTCTCAAATAA
AATGGCAAGATTGGGAAAGGGGTACATGTTTCGAGAGCAAGAGTATGAAGCTTAGAA
CTCAAGTACCTGCAGAGATGCTATCAAGCATCGACTTGAAATATTTCAATGATTCAA
CAAGGAAAAAATTGAAAAATCCGACCGCTCTTAATAGATGGGACTGCATCATTAA
GCCCCGGGATGATGATGGGTATGTTTAATATGTTAAGCACTGTATTGGGTGTTTCCA
TCCTGAATCTTGGGCAAAAGAAATACACCAAGACTGCTTACTGGTGGGATGGTCTTC
AATCTTCTGATGATTTTGCTCTGATTGTGAATGCACCCAATCATGAGGGAATTCAAGC
CGGAGTCGACAGGTTTTATCGAACCTGTAAGCTACTTGGAATCAATATGAGCAAAAA
AAAGTCTTACATAAATAGAACGGGAACATTTGAATTCACAAGCTTTTTCTATCGCTAC
GGGTTTGTGCCAATTTTCAGCATGGAGCTTCCTAGTTTTGGGGTATCTGGGATCAATG
AGTCTGCAGACATGAGTATTGGGGTTACTGTCATCAAAAACAATATGATAAACAATG
ATCTTGGTCCAGCAACAGCCCAAATGGCCCTCCAGTTGTTTCATCAAAGATTACAGGT
ACACGTACCGGTGTACAGGGGTGACACTCAAATACAAACCCGAAGATCATTTGAAA
TAAAGAACTGTGGGATCAAACCCGTTCAAAGGCTGGACTGCTGGTCTCCGATGGAG
GCCCCAATTTGTACAATATTAGAAATCTCCACATTCTGAAGTCTGCTTGAAATGGGA
ATTGATGGATGAGGATTACAAGGGGCGTTTGTGCAATCCGCTGAATCCATTTGTCAG
CCATAAAGAGATTGAATCAGTGAATAACGCAGTGGTGATGCCAGCACATGGTCCAGC
CAAACCATGGAATATGATGCTGTTGCTACAACACACTCCTGGATCCCCAAAAGAAA
TCGATCCATCTTGAACACGAGCCAGAGAGGAATACTTGAAGATGAGCAAATGTACCA
AAAATGCTGCAACCTATTTGAAAAGTTCTTTCCCAGCAGCTCATACAGGAGACCAGT
CGGGATTTCAGTATGGTGGAGGCCATGGTTTCTAGGGCCCGAATTGATGCACGCAT
TGATTTTGAATCTGGGAGGATAAAGAAAGAGGATTTGCTGAGATCATGAAGATCTG
TTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAGTAGTGAATTTAGCTTGTCTTCATGA
AAAAATGCCTTGTTTCTACTAATAGAAGAGCGATG

หมายเหตุ: บริเวณลำดับเบสที่เป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ XmaI

3. ลำดับเบสของสายพันธุกรรมสายที่ 3 PA

PA

GATCGCTCTTCTGGGAGCGAAAGCAGGTACTGATCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGA
CAATGCTTCAATCCGATGATTGTCGAGCTTGCGGAAAAGGCAATGAAAGAGTATGGA
GAGGACCCGAGAATCGAAACAAACAAATTTGCAGCAATATGCACCCACATGGAAGT
ATGCTTCATGTATTCAGATTTTCACTTCATCAATGAACGGGGCGAATCAATAATCGTA
GAATCTGGCGATCCAAATGCACTCTTGAAGCACAGATTTGAAATAATCGAAGGAAGA
GATCGAGCAATGGCCTGGACGGTGGTGAACAGCATTTGTAACACTACAGGGGTTGGG
AAACCAAAGTTTCTCCCAGATCTGTATGACTACAAGGAAGATAGATTCATTGAGATT
GGTGTTACAAGGAGAGAAGTCCACATATACTACCTGGAAAAGGCCAATAAAATAAA
ATCTGAAGAGACACACATTCACATTTTCTCATTACGGGAGAAGAAATGGCCACAAA
GGCCGACTACACTCTCGATGAAGAAAGTAGGGCTAGAATCAAAACCAGGCTATTAC
CATAAGACAAGAGATGGCTAGCAGAGGCCTTTGGGATTCCTTTGCGCCAGTCCGAGAG
AGGCGAAGAGACAATTGAAGAAAGATTTGAAATCACAGGGACAATGCGCAGGCTTG
CCGACCAAAGTCTCCACCGAATTTCTCCAGTCTTGAAAACCTTTAGGGCATATGTGGA
TGGATTCGAGCCGAACGGCTACATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCCAAAGAAGT
AAATGCTAGAATTGAACCTTTTCTGAAGACAACACCACGCCCCTTAGGCTGCCAGG
TGGGCCCCCTGTTTTAGCGATCCAAATTCCTGTTGATGGATGCCCTGAAATTAAGC
ATTGAAGACCCAAGCCATGAAGGAGAGGGGATACCGCTATATGATGCGATCAAGTG
CATGAAAACGTTCTTTGGGTGGAAGGAACCCATTATTGTTAAGCCACACGAAAAAGG
AATAAATTCAAATTACCTTTTGGCATGGAAGCAAGTACTGGCAGAAATACAGGATAT
TGAGAGTGAGAAAAAAGTTCCAAGGACTAAGAATATGAAGAAAACAAGCCAGTTAA
AGTGGGCACTTGGGGAGAATATGGCACCAGAAAAAGTAGATTTTGACGACTGTAAG
GATGTAAGCGATCTGAAGCAATATGACAGTGATGAACCAGAATTTAGGTCGCTTGCA
AGTTGGATCCAAAGTGAGTTCAACAAAGCATGTGAACTGACTGATTCAAGCTGGAT
AGAACTCGATGAGATTGGAGAAGATGTGGCTCCGATTGAGCACATTGCAAGCATGAG
AAGGAATTATTTACAGCAGAGGTGTCTCATTGCAGAGCCACAGAATACATAATGAA
GGGAGTGTACATCAATACTGCTTTGCTTAATGCATCTTGTGCAGCAATGGACGATTTT

CAATTGATTCCAATGATAAGCAAGTGTAGAACTAAAGAGGGAAGGCGAAAGACCAA
 TTTGTACGGGTTTCATCATAAAAGGAAGATCCCCTTAAGGAATGACACCGACGTGGT
 AAATTTTGTGAGCATGGAGTTTTCCCTCACTGACCCAAGACTTGAACCGCACAAATG
 GGAAAAGTACTGTGTTCTTGAGATAGGAGACATGCTTCTAAGAACTTCCATAGGCCA
 AGTGTCAAGGCCTATGTTCTGTATGTGAGGACAAATGGGACCTCAAAAATTAAAAT
 GAAATGGGGAATGGAAATGAGACGTTGCCTCCTTCAGTCCCTTCAGCAGATTGAGAG
 TATGATTGAAGCTGAGTCCTCTGTCAAGGAGAAAGACATGACCAAAGAATTCTTTGA
 GAACAAATCAGAAACATGGCCCATTGGAGAGTCCCCCAAAGGAGTGGAAGAAGGTT
 CCATTGGGAAGGTCTGTAGGACTTTGTTGGCAAAGTCGGTTTTCAACAGCTTGTATGC
 ATCTCCACAAC TAGAAGGATTCTCAGCTGAATCAAGAAAATTGCTTCTTATCGTTCAG
 GCTCTTAGGGACAATCTGGAACCTGGAACCTTTTGATCTTGGGGGGCTATATGAATCA
 ATTGAGGAGTGCCTGATTAATGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCTTCTTGGTTCAACT
 CCTTCCTCACACATGCACTGAGATAGTTGTGGCAGTGCTACTGTTTGCTATCCATACT
 GTCCAAAAAAGTACCTTGTTTCTACTAATAGAAGAGCGATG

หมายเหตุ: บริเวณลำดับเบสที่เป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
 BamHI

4. ลำดับเบสของสายพันธุกรรมสายที่ 5 NP

NP

GATCGCTCTTCTGGGAGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACTGAGTGACATCGAA
 ATCATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCATACGAACAAATGGAACTGGTGGAGA
 ACGCCAGAATGCCACGGAAATCAGAGCATCTGTCTGGAAGAATGATTGGTGGGAATTG
 GAAGATTCTACATCCAAATGTGCACCGAACTCAAACCTCAGTGATTATGAGGGACGGC
 TGATTCAGAACAGCATAACAATAGAGAGAATGGTGCTCTCTGCTTTTGACGAGAGGA
 GGAACAAATATCTGGAAGAACATCCAAGCGCTGGGAAAGACCCTAAGAAAACCTGGA
 GGACCCATATACAGGAGAATAGACGGAAAGTGGAATAAGAGAACTCATCCTTTATGA
 CAAAGAAGAAATAAGGAGAATCTGGCGCCAAGCCAACAATGGTGAGGATACAACAG
 CCGGTCTGACTCACATGATGATCTGGCATTCCAATTTGAATGATGCCACTTATCAGAG
 GACAAGAGCTCTTGTTCTGCACCGGAATGGATCCCAGGATGTGCTCTCTGATGCAGGG
 TTCAACTCTCCCCAGGAGGTTCCGGAGCCGCAGGTGCTGCAGTCAAAGGAGTTGGGA

CAGTGGTGATGGAGTTGATCAGAATGATCAAACGTGGAATCAATGATCGGAACTTCT
 GGAGGGGTGAAAATGGACGAAGGACAAGAATTGCCTATGAAAGAATGTGCAACATT
 CTCAAAGGGAAATTTCAAACAGCTGCACAGAGAGCAATGATGGATCAAGTGAGAGA
 GAGCCGAAACCCAGGAAATGCTGAAATCGAAGATCTCATCTTTCTGGCACGATCCGC
 ACTCATATTACGAGGATCAGTTGCACACAAGTCCTGTCTGCCTGCCTGTGTGTATGGA
 CTTGCTGTAGCCAGTGGACATGACTTTGAAAGAGAGGGGTACTCTCTGGTCGGAATA
 GACCCTTTCAGACTGCTTCAAAACAGCCAAGTATTCAGCCTAATCAGACCAAATGAA
 AACCCAGCGCACAAAGAGTCAATTAGTGTGGATGGCATGCCATTCTGCTGCATTTGAA
 GATTTAAGGGTATCAAGCTTCATAAGAGGGAAAAGAGTGGTTCCAAGAGGGCAGCTT
 TCCACCAGAGGGGTTTCCAGATTGCTTCCAATGAGAACATGGAGACTATGGACTCTAGT
 ACTCTTGAAGTGAAGCAGATACTGGGCCATAAGGACCAGAAGTGGAGGAAACAC
 TAATCAACAGAGGGCATCTGCGGGCCAAATCAGCGTGCAACCTACATTCTCGGTGCA
 GAGAAATCTCCCTTTTGAGAGAGCAACCGTTATGGCAGCATTCACTGGGAACACAGA
 GGGAAGAACATCAGACATGAGAACCGAAATCATAAGGATAATGGAAAGTGCAAGAC
 CAGAAGATGTGTCTTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAA
 CGAGCCCGATCGTGCCTTCCTTTGACATGAGTAACGAAGGATCTTATTTCTTCGGAGA
 CAATGCAGAGGAGTATGACAATTAAAGAAAATACCCTTGTTTCTACTAATAGAAGAG
 CGATG

หมายเหตุ: บริเวณลำดับเบสที่เป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
 BspEI

5. ลำดับเบสของสายพันธุกรรมสายที่ 7 M

M

GATCGCTCTTCTGGGAGCAAAAGCAGGTAGATGTTGAAAGATGAGCCTTCTAACCGA
 AGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATCGTCCCATCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGC
 ACAGAGACTTGAAGATGTTTTTGCAGGGAAGAACACCGATCTTGAGGCTCTCATGGA
 ATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGAATTTTAGGATTTGT
 GTTCACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAA
 TGCCCTTAACGGGAACGGTGACCCAAATAACATGGACAAAGCAGTTAAACTGTACAG
 GAAACTTAAGAGGGAGATAACATTCCACGGGGCCAAAGAAGTAGCGCTCAGTTATTC

TGCTGGTGCACCTTGCCAGTTGTATGGGCCTCATATACAACAGAATGGGGACTGTTAC
 CACTGAAGTGGCATTGTCCTAGTATGCGCAACCTGCGAACAGATTGCTGATTCCCA
 GCATCGGTCTCACAGGCAAATGGTAACAACAACCAATCCACTAATCAGACATGAGAA
 CAGAATGGTACTAGCCAGCACTACGGCTAAAGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCGA
 GTGAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGATTGCTAGCCAGGCTAGGCAAATGGTACAA
 GCGATGAGAACAGTTGGGACCCACCCGAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAGATGATCTT
 CTTGAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAG
 TGACCCTCTCGTTGCTGCCGCAAGCATCATTGGGATCCTGCACTTGATATTGTGGATT
 CTTGATCGTCTTTTTTTCAAATGCATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAAAGAG
 GGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCGGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGGCAGAAACAG
 CAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAGTAAAAA
 ACTACCTTGTTTCTACTAATAGAAGAGCGATG

หมายเหตุ: บริเวณลำดับเบสที่เป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

SacI

6. ลำดับเบสของสายพันธุกรรมสายที่ 8 NS

NS

GATCGCTCTTCTGGGAGCAAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGATTCCAACACTG
 TGCAAGCTTTCAGGTAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGGTTTGACAGACAA
 AAAATTGGGTGATGCCCCATTCCTTGATCGGCTCCGCCGAGATCAAAAGTCTCTAAG
 AAGAAGAGGCAGCACCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCCACTCGAGCTGGAAAGC
 AGATAGTGGAGCGGGTTCTGGAGGAAGAATCCAACGGGGCACTTAAAATGACCATT
 GCCTCTGTACCTGCTTCGCGTTACCTAGCTGACATGACTCTTGAGGAGATGTCAAGGG
 ACTGGTTCATGCTCATGCCCAAGCAAAAAGTGGCAGGCTCTCTTTGTATAAGAATGG
 ACCAGGCGATCATGGAAAAGAGCATCATACTGAAAGCGAACTTCAGTGTGATTTTCG
 ACCGGTTGGAGACTTTAATACTACTAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGAGCAATTGTTG
 GCGAAATTTACCATTTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGC
 AGTTGGGGTCTCATCGGAGGGCTTGAATGGAATGGTAACACGGTTCAAGTCTCTGA
 AAATCTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCCGTAATGAGAATGGGAGATCTTCACTACC
 TCCAAAACAGAAATGGAAAGTGGCGGGAACAATTAGGTCAGAAGTTTGAAGAAATA

AGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACACAGACTGAAGATAACAGAGAATAGTTTCGA
GCAAATAACATTTATGCAAGCCTTGCAACTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAG
AACTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCTTGTTTCTACTAATAGAA
GAGCGATG

หมายเหตุ: บริเวณลำดับเบสที่เป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
XhoI

9. ลำดับเบสของยีน HA ที่ผ่านการดัดแปลงแล้ว

HA delete4

GTGCTGTCTCATCATTTTGGGCGAAGAATTCGAGTCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAG
CACCGGACTACTGGGTCGTACCTCCGAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGGTTCA
ATCTGTCAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTGC AATAGTCAGTCTTGTTAAAAGT
GATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATA
ATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAA
CGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGATTGTAGTGT
AGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGGAATG
GTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTACCCAGGGGATTT
CAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAAT
TCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTAGGGGTGAGCTC
AGCATGTCCATACCAGGGAAAGTCCTCCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAA
AAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGA
TCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCT
CTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATT
GGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGT
TCTTCTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATT
TCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGA
AAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAGGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCG
ATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCA
AATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCGACCGGGCTCAGAAATACCCCTCAAA
TTGAGACAAGAGGACTATTTGGGGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGG

GAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTAC
GCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAA
CTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAA
CTTAGAAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTTAGATG
TCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTT
TCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAA
TGCAAAAGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATGAATG
TATGGAAAGTGTAAGAAACGGGACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAA
GACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAATTTACCAA
ATACTGTCAATTTATTCTACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTG
GTCTATCCTTATGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAAT
TTGTGAGTTCAGATTGTAGTTAAAACCACCCTTGTTTCTACTAATAACCCGGCGGCCC
AAAATGCCGACTCGGAGcGAAAGATATACcTCCCCGGGGCCCCGGGAGGGCGCGTTC
CCG

ภาคผนวก ข
เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารสูตร LB (Luria-Bertani medium) ประกอบด้วย

bacto-tryptone	10	กรัมต่อลิตร
bacto-yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	10	กรัมต่อลิตร

ปรับ pH ให้มีค่า 7.0 โดยเติม 5 N NaOH ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร และนำไปทำให้ปลอดเชื้อ

อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

เป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุลโดยอาศัยหลักที่ว่าชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน ดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตทำให้ดีเอ็นเอมีประจุลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะส่งผลให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก จากหลักการดังกล่าวจึงใช้วิเคราะห์ดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้า ผ่านตัวกลางคือวุ้น (gel) ทำให้สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอตามขนาดและรูปร่างได้

ตัวกลางที่นิยมโดยทั่วไปคือ polyacrylamide gel และ agarose gel โดยที่ polyacrylamide gel มักใช้ในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 500 คู่เบส ส่วน agarose gel ใช้ในการแยกดีเอ็นเอขนาด 200 bp - 20 kb

องค์ประกอบของ 50X TAE (Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer)

ประกอบด้วย

Tris Base	242	กรัมต่อลิตร
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตรต่อลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตรต่อลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายตามที่ต้องการ

การเตรียม 1% (w/v) agarose gel

1. ชั่งผง agarose มา 1 กรัม ในขวดรูปชมพู่
2. เติม 1X TAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงไป
3. ให้ความร้อนจน agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกับ TAE
4. ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นหรือมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงใน gel chamber ที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว
5. แกะเจลที่แข็งตัวแล้วออกมาจาก gel chamber ใส่ในเครื่องสำหรับทำ electrophoresis แล้วเทบัฟเฟอร์ 1X TAE ลงไปให้ท่วมเจล

การทำ Electrophoresis

1. นำสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบผสม loading dye แล้วใส่ลงในช่องใส่สาร (well)
2. ให้กระแสไฟฟ้า และใช้เวลาตามที่ต้องการ
3. เมื่อเสร็จสิ้นการให้กระแสไฟฟ้าแล้วนำเจลออกมาย้อมในสีย้อม (ethidium bromide) (หากมีการใส่ลงไปในเจลแล้วให้ข้ามขั้นตอนนี้ไป) เป็นเวลา 10 นาที
4. ทำการล้างสีย้อมออกโดยนำเจลไปแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 10 นาที
5. นำเจลที่ได้ไปดูภายใต้แสง UV จะเห็นแถบดีเอ็นเอที่เรืองแสง

วิธีการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* (transformation)

1. ละลาย competent cell ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละหลอดมีเซลล์ 50 ไมโครลิตรในน้ำแข็ง
2. เติมพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครลิตรลงใน competent cell ที่อยู่ในหลอด แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
3. Heat shock เซลล์ที่ 42 องศาเซลเซียส (สามารถใช้อุณหภูมิสูงสุดได้ที่ 52 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20-30 วินาที และย้ายไปบ่มในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที
4. เติมหาอาหารเหลว LB ลงไป 250 ไมโครลิตร และนำไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. นำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะตามที่ต้องการ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาว จุฑารัตน์ ลิดจันทร์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	1 มิถุนายน 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดตาก
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นิสิต
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

