

บทที่ 4

ผลการทดลอง

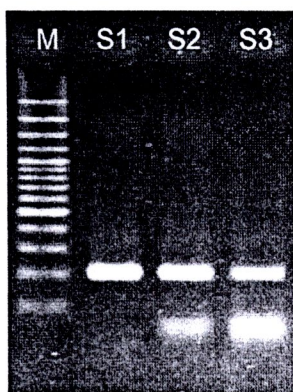
การศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาการตรวจหาเชื้อ influenza A virus โดยการใช้เทคนิค multiplex RT-PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ matrix gene (M) ที่มีความ conserve ต่อ influenza A virus ทุกสายพันธุ์ (subtype) พร้อมกับแยกว่าเป็นสายพันธุ์ H1 H3 H5 โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ Hemagglutinin ของไวรัส ร่วมกับการตรวจหา GAPDH ซึ่งเป็น housekeeping gene ในเวลาเดียวกัน เพื่อเป็นการตรวจสอบว่ามีสาร RNA และสามารถเก็บตัวอย่างได้ถูกต้อง ช่วยในการวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องแม่นยำลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น แล้วทดสอบไพรเมอร์ด้วย cDNA ของเชื้อไวรัสที่สกัดได้จากผู้ป่วยที่ตรวจพบว่าติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1 จำนวน 8 ตัวอย่าง และ H3N2 จำนวน 11 ตัวอย่าง และสัตว์ที่ติดเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 จำนวน 16 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยวิธี in silico PCR

จากการทดสอบด้วยโปรแกรม BLAST และการ alignment พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อยีนที่ออกแบบเท่านั้น

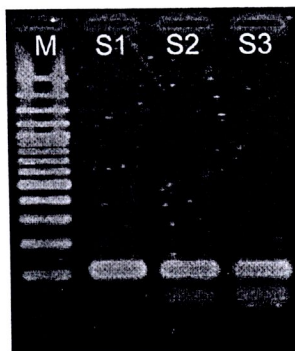
ผลการทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ด้วย monoplex PCR

1. การทดสอบไพรเมอร์ MF5/MR276



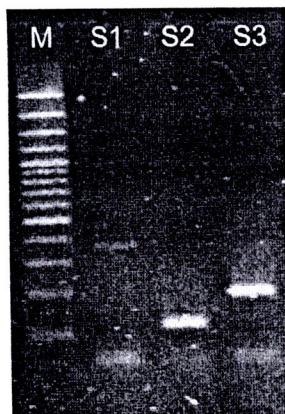
ภาพที่ 4 ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ MF5/MR276 โดยช่อง M คือ 100 bp DNA marker ช่อง S1-S2- คือ cDNA ที่สกัดได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ตามลำดับ ช่อง S3 คือ cDNA ที่สกัดได้จากสัตว์ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H5N1 ได้ PCR product ขนาด 214 bp

2. การทดสอบไพรเมอร์ GAPDH85/GAPDHR191



ภาพที่ 5 ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ GAPDH85/GAPDHR191 โดยช่อง M คือ 100 bp DNA marker ช่อง S1-S2- คือ cDNA ที่สกัดได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไขหวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 ตามลำดับ ช่อง S3 คือ cDNA ที่สกัดได้จากสัตว์ติดเชื้อไขหวัดใหญ่ สายพันธุ์ H5N1 ได้ PCR product ขนาด 107 bp

3. การทดสอบไพรเมอร์ H1F266/H1R627, H3F3/H3R2, H5F3, H5R2++



ภาพที่ 6 ผลการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ H1F266/H1R627, H3F3/H3R2, H5F3/H5R2++ โดยช่อง M คือ 100 bp DNA marker ช่อง S1 คือ cDNA ที่สกัดได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไขหวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1 กับไพรเมอร์ H1F266/H1R3 ได้ PCR product ขนาด 362 bp ช่อง S2 คือ cDNA ที่สกัดได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไขหวัดใหญ่ สายพันธุ์ H3N2 กับไพรเมอร์ H3F3/H3R2 ได้ PCR product ขนาด 112 bp ช่อง S3 คือ cDNA ที่สกัดได้จากสัตว์ติดเชื้อไขหวัดใหญ่ สายพันธุ์ H5N1 กับไพรเมอร์ H5F3/H5R2++ ได้ PCR product ขนาด 191 bp

ผลการถอดรหัสพันธุกรรมของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ใช้เป็น positive control

ผลการตรวจสอบการถอดรหัสพันธุกรรมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ เพื่อยืนยันว่ายีนที่แทรกในพลาสมิดเป็นยีนที่ถูกต้อง โดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยการ BLAST จาก www.ncbi.nlm.gov/Blast พบว่าทุกยีนที่แทรกมีความถูกต้องทุกยีน ดังแสดงในภาพที่ 7 ถึงภาพที่ 11

```
> GapDH_1-1-19917.1 [G] M PREDICTED: Homo sapiens similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (LOC389849), mRNA
length=1188

Score = 133 bits (70), Expect = 4e-31
Identical = 70/70 (100%), Gaps = 0/70 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 ACTCTGTTAAAGTGGATATTGTTGCCATCAATGACCCGTTTCATTGACCTCAACTACATGG 61
Subject 71 ACTCTGTTAAAGTGGATATTGTTGCCATCAATGACCCGTTTCATTGACCTCAACTACATGG 131
Query 61 TGTACATGTT 70
Subject 131 TGTACATGTT 140
```

ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน GAPDH ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ GAPDHF85

```
> GapM1-1-19917.1 Influenza A virus (A/chicken/Nakorn-Patoom/Thailand/01-W2/2019 (H5N1))
Matrix protein M2 and matrix protein M1 (M) gene, partial
length=456
length=456

Score = 493 bits (493), Expect = 0.0
Identical = 456/456 (100%), Gaps = 0/456 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTTATTTATTTGGTTCAGGCTCCCTCAAAAGCCGAGATCGCGCAGAAAATTGAAGATGTCT 61
Subject 18 TTTTATTTATTTGGTTCAGGCTCCCTCAAAAGCCGAGATCGCGCAGAAAATTGAAGATGTCT 94
Query 61 TTTCAGAGAAAGAACACCGATCTCGAGGCTCTCATGAGGTGGCTAAAGACCAAGACCAATCC 120
Subject 94 TTTCAGAGAAAGAACACCGATCTCGAGGCTCTCATGAGGTGGCTAAAGACCAAGACCAATCC 154
Query 121 TGTACGCTCTGACTAAAGGGGATTTTGGGGATTTGTATTTCAGGCTCACCGTGCCTCAGTGAAG 180
Subject 155 TGTACGCTCTGACTAAAGGGGATTTTGGGGATTTGTATTTCAGGCTCACCGTGCCTCAGTGAAG 214
```

ภาพที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน M ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ MF5


```

> ☐ JX_554737.1 Influenza A virus (A/chicken/Cambodia/013101b/2009) segment
4 hemagglutinin (HA) gene, partial cds
Length=1689

Score = 488 bits (246), Expect = 5e-135
Identities = 246/246 (100%), Gaps = 0/246 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 ACTCCAAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAAATATACACCCCTCTCAGGATC 61
      |||
Sbjct 367 ACTCCAAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAAATATACACCCCTCTCAGGATC 326

Query 61 GGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCAGACTGGGCTCAGAAAT 121
      |||
Sbjct 327 GGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCAGACTGGGCTCAGAAAT 386

Query 121 AGCCCTCAAAGAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTT 181
      |||
Sbjct 387 AGCCCTCAAAGAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTT 446

Query 181 ATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCCACCATAGCAATGAG 241
      |||
Sbjct 447 ATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCCACCATAGCAATGAG 506

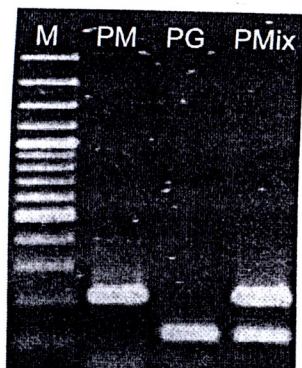
```

ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน H5 ที่แทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยไพรเมอร์ H5F3

ผลการปรับคอนดิชัน multiplex PCR ด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

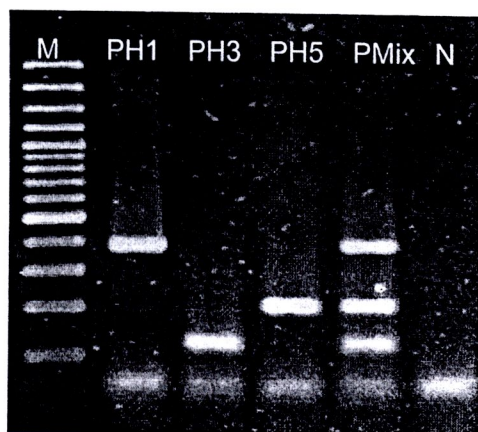
เมื่อได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการแล้ว จึงนำมาใช้ในการปรับสภาวะที่เหมาะสมในระบบ multiplex PCR ซึ่งในปริมาตรสุดท้าย 20 μ l ประกอบด้วย cDNA 0.5-1 μ l ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ใน PCR buffer ความเข้มข้น 1X PCR buffer ประกอบด้วย 10mM Tris-HCl(pH8.3), 50mM KCl, 2mM $MgCl_2$ และ 1 unit *i-Taq*TM DNA Polymerase 1mM dNTPs(0.25mM each) ไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 μ M และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 μ l แล้วนำไปทำ PCR ด้วยคอนดิชันดังนี้ 94°C 3 นาที ตามด้วย 40 cycle ของ 94°C 30 วินาที 58°C 30 วินาที 72°C 1 นาที แล้วต่อด้วย 72°C 10 นาทีและ 25°C 15 นาที

1. ระบบ multiplex M GAPDH



ภาพที่ 12 ผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด โดยการทำ multiplex PCR M GAPDH ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง PM และ PG คือรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M และ GAPDH ตามลำดับ ช่อง PMix คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M และ GAPDH ผสมกัน

2. ระบบ multiplex H1 H3 H5

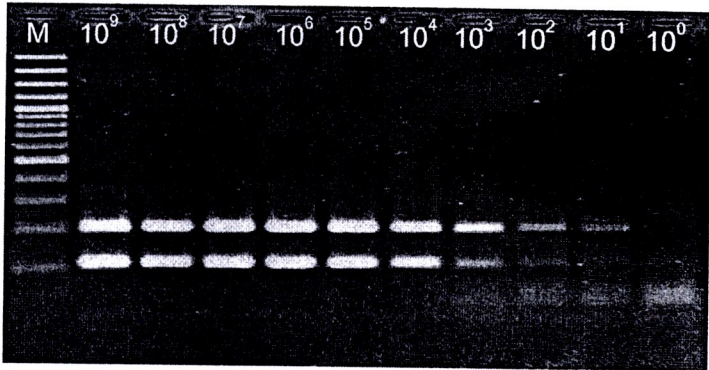


ภาพที่ 13 ผลการเพิ่มจำนวนพลาสมิด โดยการทำ multiplex PCR H1 H3 H5 ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง PH1 PH3 PH5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 ตามลำดับ ช่อง PMix คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW

ผลการทดสอบความไว (Sensitivity)

1. ระบบ multiplex M GAPDH

ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M GAPDH ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ผสมกัน พบว่า multiplex M GAPDH มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 10^3 copies/ μ l ดังภาพที่ 14

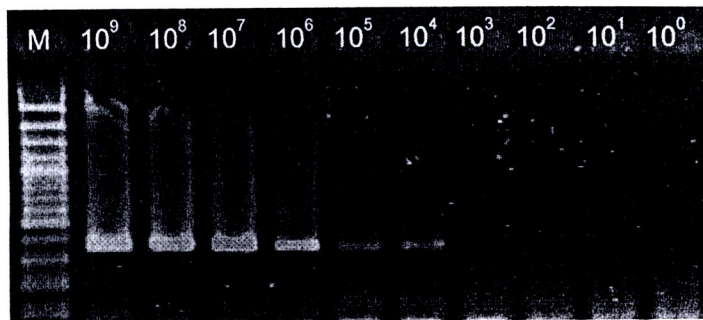


ภาพที่ 14 ผลการทดสอบความไวของ multiplex M GAPDH โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน M GAPDH รวมกัน โดยใช้พลาสมิดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/ μ l ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

2. ระบบ multiplex H1 H3 H5

1.1 พลาสมิด H1

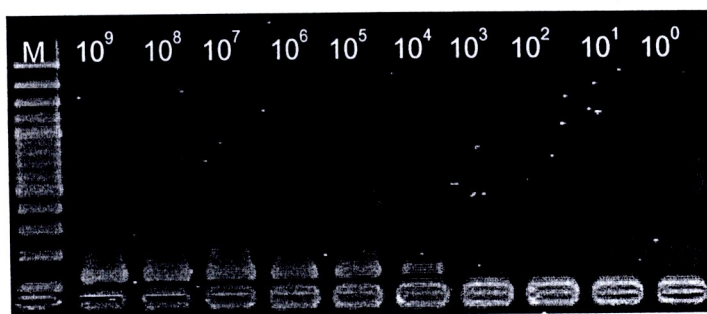
ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 อย่างเดียว พบว่า H1 H3 H5 มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 10^4 copies/ μ l ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/ μ l ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

1.2 พลาสมิด H3

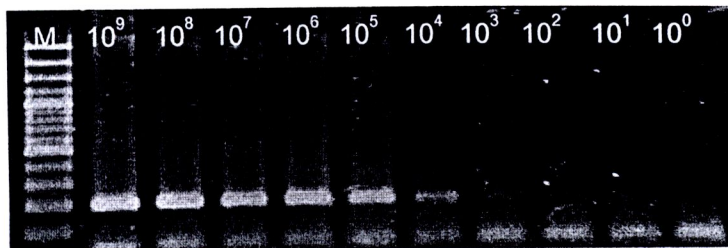
ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H3 อย่างเดียว พบว่า H1 H3 H5 มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 10^4 copies/ μ l ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H3 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/ μ l ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

1.3 พลาสมิด H5

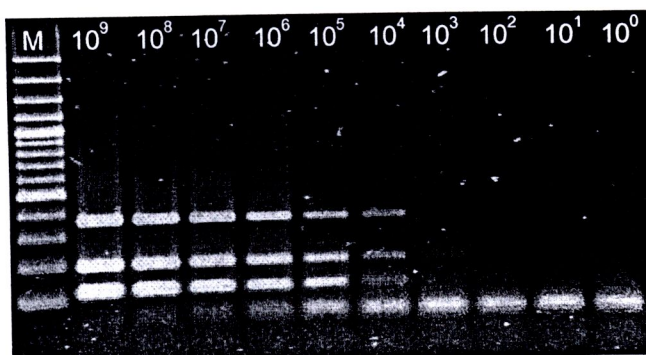
ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H5 อย่างเดียว พบว่า H1 H3 H5 มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 10^4 copies/ μ l ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H5 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/ μ l ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

1.4 รวมพลาสมิด H1 H3 H5

ผลการทดสอบความไวโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ผสมกัน พบว่า H1 H3 H5 มีความไวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของระบบ multiplex H1 H3 H5 เท่ากับ 10^4 copies/ μ l ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบความไวของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน H1 H3 H5 รวมกัน โดยใช้พลาสมิดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^9 จนถึง 10^0 copies/ μ l ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง N คือ DW

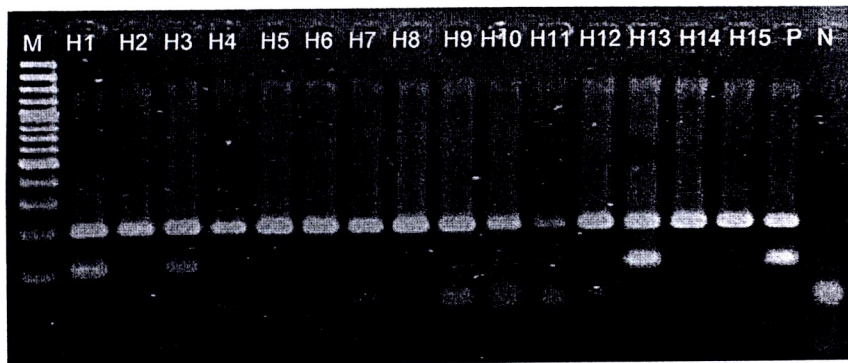
ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

1. การทดสอบด้วยไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1-H15

1.1. ระบบ multiplex M GAPDH

ผลการทดสอบความจำเพาะของระบบ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 ที่ได้จากไขไก่ฟัก (ยกเว้นสายพันธุ์ H1 และ H3 ที่ได้จากผู้ป่วย

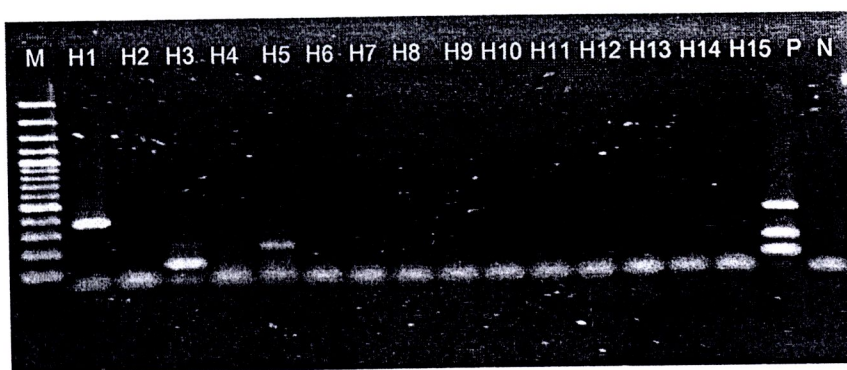
และสายพันธุ์ H5 ที่ได้จากสัตว์ปีก) พบว่าไพรเมอร์ M สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ทุกสายพันธุ์ ในขณะที่ไพรเมอร์ GAPDH สามารถเพิ่มจำนวน ได้เฉพาะสายพันธุ์ H1 H3 H11 H13 เท่านั้น ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง P คือ พลาสมิด M และ GAPDH ผสมกัน ช่อง N คือ DW

1.2. ระบบ multiplex H1 H3 H5

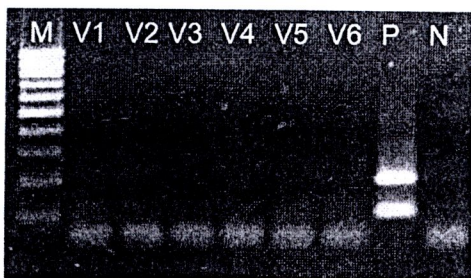
ผลการทดสอบความจำเพาะของระบบ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 ที่ได้จากไขไก่ปัก (ยกเว้นสายพันธุ์ H1 และ H3 ที่ได้จากผู้ป่วย และสายพันธุ์ H5 ที่ได้จากสัตว์ปีก) พบว่าไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้จำเพาะกับสายพันธุ์ของไพรเมอร์เท่านั้น ดังภาพที่ 20



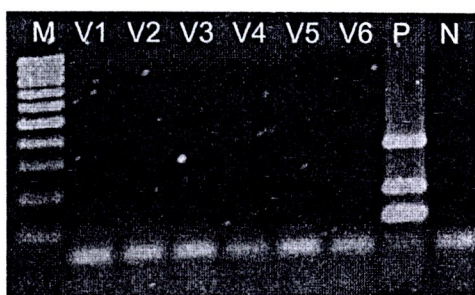
ภาพที่ 20 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H15 ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง P คือ พลาสมิด H1 H3 และ H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW

การทดสอบด้วยไวรัสในระบบหายใจ

ผลการเพิ่มจำนวน cDNA หรือ DNA จากเชื้อ Influenza B virus, Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human parainfluenza viruses (HPIVs), Human metapneumovirus (hMPV), Adenovirus, Human bocavirus (HBoV) พบว่าไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ทั้งในระบบ multiplex M GAPDH และระบบ multiplex H1 H3 H5 ดังแสดงผลในภาพที่ 21 และภาพที่ 22



ภาพที่ 21 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ cDNA/DNA จากเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง V1-V6 คือ Influenza B virus, RSV, HPIVs, hMPV, Adenovirus, HBoV ตามลำดับ ช่อง P คือ พลาสมิด M และ GAPDH ผสมกัน ช่อง N คือ DW



ภาพที่ 22 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ cDNA/DNA จากเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง V1-V6 คือ Influenza B virus, RSV, HPIVs, hMPV, Adenovirus, HBoV ตามลำดับ ช่อง P คือ พลาสมิด H1 H3 และ H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW

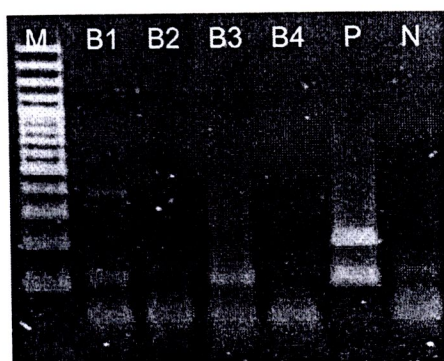
การทดสอบด้วยแบคทีเรียในระบบหายใจ

1.3. ระบบmultiplex M GAPDH

ผลการทดสอบความจำเพาะของระบบ multiplex M GAPDH โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* พบว่า

- ไพรเมอร์ M ไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะกับไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้
- ไพรเมอร์ GAPDH มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะกับไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้กับดีเอ็นเอของ *Haemophilus influenzae* และ *Streptococcus pneumoniae*

ดังแสดงในภาพที่ 23

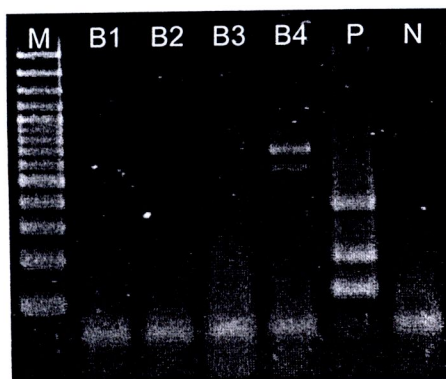


ภาพที่ 23 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex M GAPDH โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง B1 B2 B3 B4 คือ *H.influenzae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* ตามลำดับ ช่อง P คือ พลาสมิด M และ GAPDH ผสมกัน ช่อง N คือ DW

1.4. ระบบ multiplex H1 H3 H5

ผลการทดสอบความจำเพาะของระบบ multiplex M GAPDH โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* พบว่าไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะกับไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ แต่มีการเพิ่มดีเอ็นเออย่างไม่จำเพาะกับดีเอ็นเอ

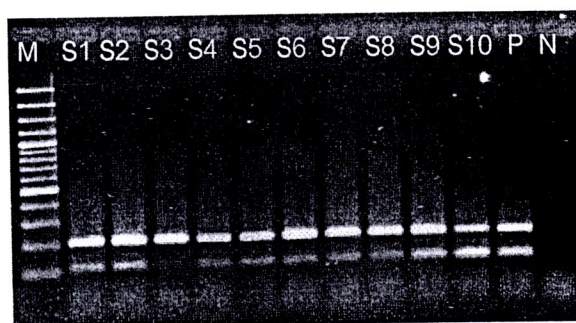
ของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งไม่ได้ PCR product เท่ากับขนาดที่ออกแบบไว้ ดังแสดงในภาพที่ 24



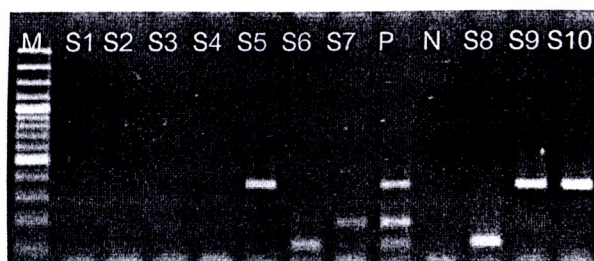
ภาพที่ 24 ผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex H1 H3 H5 โดยใช้ DNA จากเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ช่อง M คือ 100 bp DNA Marker ช่อง B1 B2 B3 B4 คือ *H.influenzae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* ตามลำดับ ช่อง P คือ พลาสมิด H1 H3 และ H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW

ผลการทดสอบด้วย Nasopharyngeal suction จากผู้ป่วย

พบว่าทั้ง multiplex M GAPDH และ multiplex H1 H3 H5 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ เมื่อเปรียบเทียบกับการทำ Whole gene sequencing เมื่อทดสอบด้วย RNA จาก Nasopharyngeal suction จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1(N=8), H3N2(N=11) cDNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จากสัตว์(N=16)



ภาพที่ 25 ตัวอย่างการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้จากผู้ป่วยด้วย multiplex M GAPDH ช่องคือ 100 bp DNA Marker ช่อง S1-S10 คือ cDNA จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 ช่อง P คือ พลาสมิด M และ GAPDH ผสมกัน ช่อง N คือ DW



ภาพที่ 26 ตัวอย่างการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้จากผู้ป่วยด้วย multiplex H1 H3 H5 ช่องคือ 100 bp DNA Marker ช่อง S1-S4 คือ cDNA จากผู้ป่วยติดไม่พบเชื้อไวรัสก่อโรค ช่อง S5, S9, S10 คือ cDNA จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1, ช่อง S6, S8 คือ cDNA จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 และ ช่อง S7 คือ cDNA จากสัตว์ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 ช่อง P คือ พลาสมิด H1 H3 H5 ผสมกัน ช่อง N คือ DW