

สัญญาเลขที่ MS-AR-071/2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษานิวรามิเนสแอกติวิตีของไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 และ
ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1

Study of neuraminidase activity of the avian influenza H5N1 virus and human
influenza H1N1 virus

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผศ. ดร. ดลฤดี สงวนเสริมศรี

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผศ. น.สพ. ดร. พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. นายพรชัย ชำนาญพุด

ศูนย์สุขภาพสัตว์และสุขอนามัยที่ 6 จังหวัดพิษณุโลก

3. นาง จันทร์เพ็ญ ชำนาญพุด

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง

กรมปศุสัตว์ จังหวัดพิษณุโลก

4. น.ส. เนรัญชลา สุวรรณคนธ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

5. น.ส. จุฑามาศ เทพมาลี

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

6. น.ส. อัญชลี ระวีงการ

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

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

ABSTRACT

Neuraminidase (NA) is an envelope surface glycoprotein of influenza A viruses. It cleaves α -(2,3) or α -(2,6) glycosidic linkage between a terminal sialic acid residue of the host cell receptor and hemagglutinin of the viral envelope, thus releasing viral progeny from the infected cell. In this study, a reassortant virus (H1N1-NA-H5N1) containing the NA gene from A/duck/Phitsanulok/ NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) virus and seven remaining genetic segments from A/ Puerto Rico/8/1934 (H1N1) was constructed using reverse genetic technique. The NA activity of the reverse genetic virus was compared with the wild type. The result of plaque assay which quantitative measurement of 1 unit NA activity showed that the H5N1 virus was 2.13×10^7 PFU/ml which was the lowest NA activity among them, and the H1N1 and H1N1-NA-H5N1 were 1.15×10^6 PFU/ml and 1.68×10^6 PFU/ml, respectively. The Real-Time RT-PCR showed that the NA activity of H1N1-NA-H5N1 was lower than that H1N1. The Ct values of H1N1-NA-H5N1 and H1N1 were 13.54 and 16.00, respectively. The kinetic properties of NA showed that V_{max} values of H1N1, H5N1 and H1N1-NA-H5N1 were not significantly different. K_m value was higher for H1N1-NA-H5N1 relative to those value of wild type. It could suggested that the maximum velocity of the enzyme activity does not depend on the viral structure which is different between the H1N1 and H5N1 virus, whereas the binding property of the enzyme may be affected by other viral genetic factors. This study indicated that NA activity of H1N1-NA-H5N1 virus was lower than that of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), and NA activity of A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) was the lowest among them ($p < 0.05$). To our knowledge, this is the first comparative study of NA activity of H1N1 and H5N1 virus using reverse genetic technique. It also indicates that the NA gene may be expressed at a higher level in the H1N1 infected cell than the H5N1 infected cell.

Executive summary

จากการศึกษา neuraminidase activity ระหว่างไวรัส avian influenza A สายพันธุ์ H5N1 (A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1)) ชนิดที่ก่อโรครุนแรงที่มีการระบาดในประเทศไทยเปรียบเทียบกับ human influenza virus สายพันธุ์ H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) โดยศึกษาจาก reverse genetic virus ได้แก่ H1N1-NA-H5N1 ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ที่ประกอบด้วยยีน NA ของไวรัสสายพันธุ์ H5N1 พบว่าไวรัสลูกผสมสายพันธุ์ใหม่มีอัตราการเจริญที่น้อยกว่าไวรัส H1N1 (wild type) และพบว่าการหายไปของกรดอะมิโน 20 ตำแหน่งในบริเวณ NA stalk นั้นไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติในการติดเชื้อของไวรัส ในการศึกษา NA activity ด้วยวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกพบว่า NA activity แปรผันตรงตามความเจือจางของปริมาณไวรัส และยังพบว่า NA activity ของไวรัส H1N1-NA-H5N1 น้อยกว่าไวรัส H1N1 แสดงให้เห็นว่าการหายไปของกรดอะมิโนบริเวณ NA stalk ของไวรัส H5N1 ที่มีการระบาดในประเทศไทยนั้น ส่งผลต่อระดับ NA activity ที่ลดลง การทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดสในไวรัส H5N1 ที่ต่ำกว่าไวรัสสายพันธุ์ H1N1-NA-H5N1 อาจเนื่องมาจากจำนวนของ NA spike บน viral envelope ของ A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) มีจำนวนน้อยกว่าไวรัส H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) นอกจากนั้นในการศึกษาดังนี้ยังบ่งชี้ว่ายีน NA น่าจะมีการแสดงออกในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส H1N1 มากกว่าในเซลล์ที่ติดเชื้อ H5N1 และจากการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์พบว่าค่า Km ของ reassortant virus สูงกว่า wild type นั้นแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการรวมกันระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นมีอื่น ๆ ของเชื้อไวรัสเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ดังนั้นหากมีไวรัสลูกผสมสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นในอนาคต จึงเป็นการยากยิ่งที่จะพยากรณ์ลักษณะของฟีโนไทป์ (phenotype) โดยการศึกษาจากสารพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว

เนื้อหางานวิจัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 (A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1)) ที่แยกได้จากเป็ดในช่วงที่มีการระบาดของไวรัสไข้หวัดนกในจังหวัดพิษณุโลก และตัวอย่างไวรัส influenza A สายพันธุ์ H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) สายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ โดยได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง กรมปศุสัตว์ อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม Thermal cycle (Master cycle gradient, Eppendorf)
2. เครื่องวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)
3. เครื่องนำส่งยีนโดยการชักนำด้วยกระแสไฟฟ้า (Gene Pulser Xcell[™] Electroporation System, Bio-Rad)
4. เครื่อง Real-time PCR (Rotor-Gene[™] 6000 real-time rotary analyzer, Corbett)
5. เครื่องมือวิเคราะห์ภาพ (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad)
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Beckman Coulter)
7. อุปกรณ์พื้นฐานทั่วไปที่มีในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยา เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง, ชุดอุปกรณ์ในการทดสอบ electrophoresis เป็นต้น

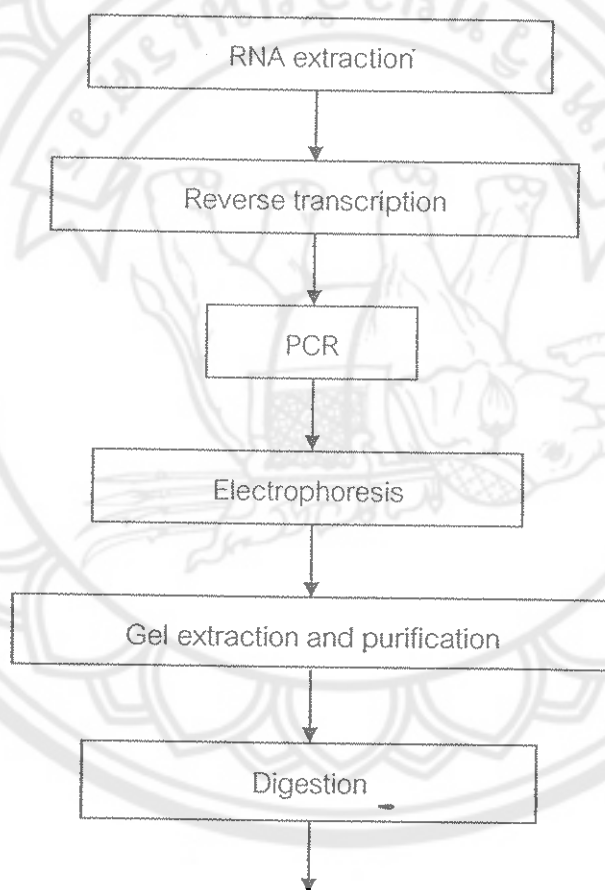
วิธีการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้แบ่งเป็น 3 ส่วนหลักๆ คือ การสร้าง recombinant virus ด้วยเทคนิค reverse genetic การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดส (neuraminidase activity) ของไวรัสจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ H1N1, H5N1 และ H1N1 ที่มีเอ็น NA จากสายพันธุ์ H5N1 และ การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ รายละเอียดดังจะแสดงต่อไป

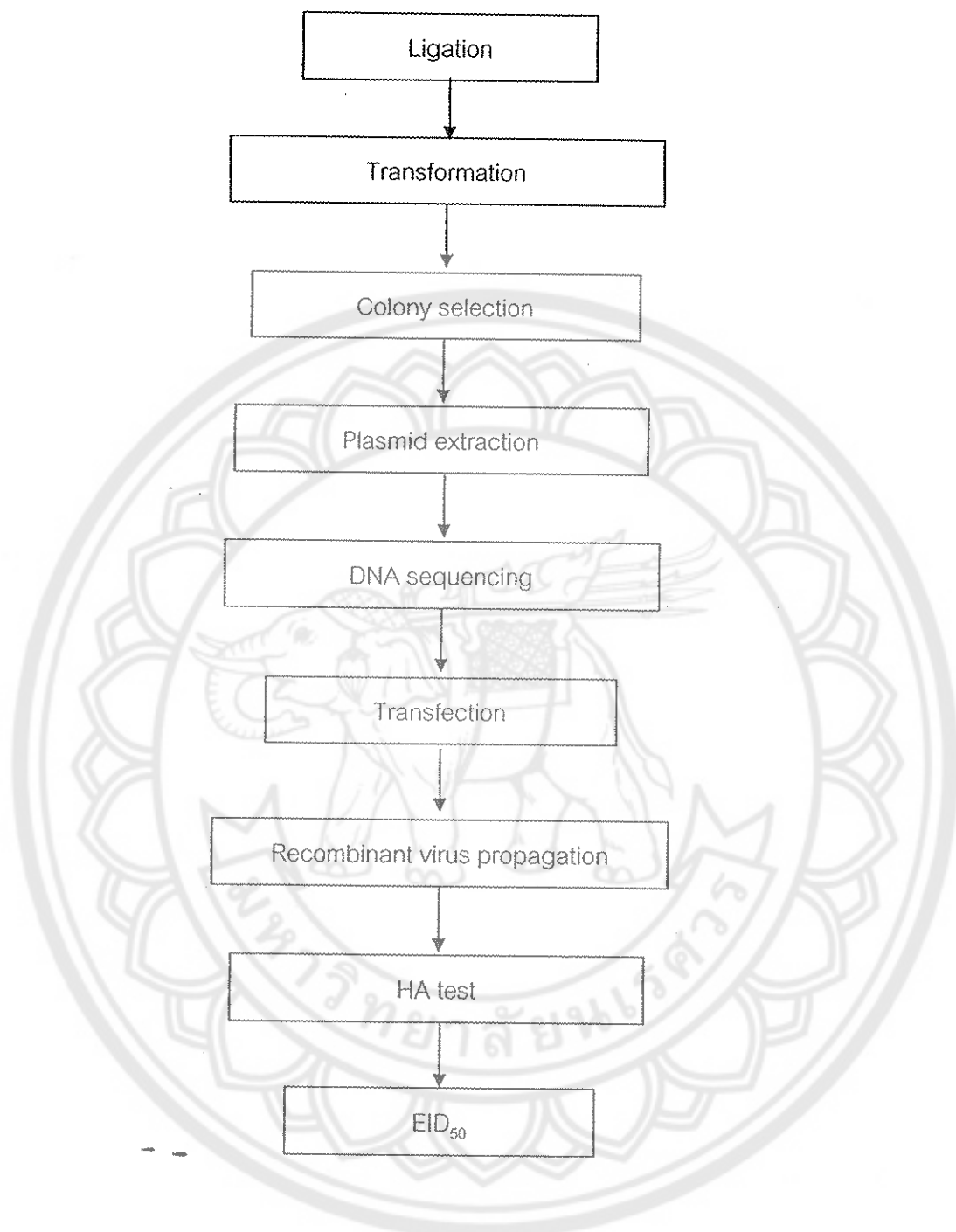
การสร้าง recombinant virus ด้วยเทคนิค reverse genetic

ในขั้นตอนการสร้าง recombinant virus ด้วยเทคนิค reverse genetic จะมีไวรัสที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ในห้องปฏิบัติการจำนวน 1 สายพันธุ์ โดยทำการสร้างพลาสมิดที่มียีน NA ของไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 ส่วนที่เหลืออีก 7 พลาสมิดที่มียีนของ H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) นั้นได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Robert G Webster, St Jude Children Research Hospital, Memphis, USA

การทำการศึกษาโดยภาพรวมในส่วนของการทำงาน reverse genetic ตั้งแต่ขั้นตอนของการสกัด RNA ถึงการทดสอบคุณสมบัติของไวรัส แสดงดังภาพ 21 และรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนแสดงในลำดับต่อไป



ภาพ 21 แสดงขั้นตอนการสร้าง reverse genetic virus



ภาพ 21 (ต่อ)

1. การสกัด RNA (RNA extraction)

ตัวอย่าง RNA ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ถูกสกัดจาก allantoic fluid ที่ได้ทำการเพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟักปราศจากเชื้อ โดยใช้ชุดสกัด RNeasy mini kit (Qiagen) วิธีการสกัดสามารถทำได้ดังต่อไปนี้ นำ allantoic fluid 200 ไมโครลิตร (μl) รวมกับ RLT buffer 150 μl ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นเติม 70% ethanol 350 μl ผสมให้เข้ากัน ผสมส่วนผสมดังกล่าวใส่ใน Spin column บั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลาหนึ่งนาทีครึ่ง ทั้งส่วนที่ตกลงมา เติม RW1 700 μl ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม ทั้งส่วนที่ตกลงมา เติม RPE buffer 500 μl ทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบ ทั้งส่วนที่ตกลงมาแล้วปั่นซ้ำอีกหนึ่งรอบ เพื่อเป็นการกำจัด RPE buffer ส่วนที่เหลือ ขั้นตอนสุดท้ายย้าย Spin column ออกมาใส่ในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม RNase free water 50 μl บั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเป็นการล้าง RNA ออกมา เก็บส่วนที่ตกลงมาภายในหลอดซึ่งเป็น RNA ของไวรัส influenza ที่ต้องการ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการทำการศึกษาค้างต่อไป

2. การเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสจาก RNA เป็น complementary DNA (cDNA) (reverse transcription)

การสังเคราะห์ RNA เป็น complementary DNA (cDNA) หรือการบวนการ reverse transcription ทำได้โดยใช้ชุดสำเร็จ Improm II Reverse Transcription System (Promega) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนสำคัญ โดยในขั้นตอนที่ 1 เป็นการทำให้ primer จับกับ RNA ต้นแบบ ปฏิกริยาประกอบด้วย 10 μM Uni12 primer (5' AGCAAAAGCAGG 3') [68] ปริมาตร 1 μl , RNA 1 μl และ nuclease free water 3 μl นำเข้าเครื่อง Thermal cycle โดย Thermal cycle (Master cycle gradient, Eppendroff) ที่ใช้คือ 70°C นาน 5 นาที และ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ขณะรอบปฏิกริยาในขั้นแรกนั้น ให้เตรียมขั้นตอนที่ 2 คือ reverse transcription ดังนี้ ผสม 5X buffer 4 μl (1X), 25 mM MgCl_2 1.2 μl (1.5 mM), 10 mM dNTPs mixed 1 μl (0.5 mM), Ribonucleotide inhibitor 0.5 μl , Reverse transcriptase 1 μl และ nuclease free water 7.3 μl จะมีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 15 μl จากนั้นผสมสารจากปฏิกริยาในขั้นตอนที่ 1 ลงในสารละลายขั้นตอนที่ 2 นำเข้าเครื่อง Thermal cycle (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้คือ 30°C นาน 5 นาที, 42°C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดปฏิกริยาเปลี่ยนจาก RNA เป็น cDNA และหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่ 72°C นาน 15 นาที ภายหลังจากที่เสร็จขบวนการตัวอย่างของ cDNA สามารถเก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ในการศึกษาค้างต่อไป

3. ขบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ในขั้นตอนการทำ PCR นี้ ตัวอย่าง RNA ของไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 จะถูกทำการเพิ่มจำนวนเฉพาะยีน NA เท่านั้น โดยขั้นตอนนี้เป็น การเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอจาก cDNA ที่ได้มาจากข้างต้นเพื่อให้มีปริมาณที่มากพอสำหรับการศึกษาต่อไป โดยใช้ Universal primers set [68] ที่เฉพาะกับยีนแต่ละเส้น คือ Bm-NA-1/Bm-NA-1413R นอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังทำการเพิ่มจำนวนยีนที่เหลืออีก 7 ยีน เพื่อตรวจสอบพลาสมิด H1N1(PR-8) และดูขนาดยีนของสายพันธุ์ H5N1 โดยใช้ primer ดังต่อไปนี้ คือ Bm-PB2-1/Bm-PB2-2341R, Bm-PB1-1/Bm-PB1-2341R, Bm-PA-1/Bm-PA-2233R, Bm-HA-1/Bm-NS-890R, Ba-NP-1/Ba-NP-1565R, Bm-M-1/Bm-M-1027R และ Bm-NS-1/Bm-NS-890R ซึ่งใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน PB2, PB1, PA, HA, NP, M และ NS ตามลำดับ แสดงดังตาราง 3 สำหรับส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนต่างกันดังต่อไปนี้

ยีน PB2

เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 2.4 kb การทำ PCR (Yellow Perpetual Opti Taq DNA polymerase (Hot start), Vivantis) ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X Ampli buffer B 5 μ l (1X), 10 mM dNTPs 1 μ l (0.2 mM), 10 μ M Bm-PB2-1/Bm-PB2-2341R primer 2.5 μ l (0.5 μ M), Yellow Perpetual Opti Taq 2 μ l (2.0 U), cDNA 2 μ l และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 μ l ด้วย ddH₂O นำเข้าเครื่อง PCR (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้ คือ initial denature temperature 95°C เป็นเวลา 2 นาที, denature temperature 94°C เป็นเวลา 20 วินาที, annealing temperature 60°C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension temperature 72°C เป็นเวลา 3 นาที (1 kb ต่อ 1 นาที) จำนวนรอบเท่ากับ 35 cycles และ final extension temperature 72°C เป็นเวลา 7 นาที

ยีน PB1

เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 2.4 kb การทำ PCR (High fidelity (HiFi) Taq DNA polymerase, Invitrogen) ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X PCR buffer 5 μ l (1X), 10 mM dNTPs 2 μ l (0.4mM), 50 mM MgSO₄ 2.5 μ l (2.5 mM), 10 μ M Bm-PB1-1/Bm-PB1-2341R 2 μ l (0.4 μ M), HiFi Taq 0.5 μ l (2.5 U), cDNA 2 μ l และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 μ l ด้วย ddH₂O นำเข้าเครื่อง PCR (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้ คือ initial denature temperature 94°C เป็นเวลา 2 นาที, denature temperature 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing temperature 60°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension temperature 68°C เป็นเวลา

3 นาที (1 kb ต่อ 1 นาที) จำนวนรอบเท่ากับ 35 cycles และ final extension temperature 68°C เป็นเวลา 10 นาที

ยีน PA

เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 2.2 kb การทำ PCR (High fidelity (HiFi) *Taq* DNA polymerase, Invitrogen) ในปฏิกิริยาประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้ 10X PCR buffer 5 μ l (1X), 10 mM dNTPs 2 μ l (0.4mM), 50 mM MgSO₄ 2.5 μ l (2.5 mM), 10 μ M Bm-PA-1/Bm-PA-2233R 1 μ l (0.2 μ M), HiFi *Taq* 0.2 μ l (1.0 U), cDNA 2 μ l และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 μ l ด้วย ddH₂O นำเข้าเครื่อง PCR (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้ คือ initial denature temperature 94°C เป็นเวลา 2 นาที, denature temperature 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing temperature 60°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension temperature 68°C เป็นเวลา 3 นาที (1 kb ต่อ 1 นาที) จำนวนรอบเท่ากับ 35 cycles และ final extension temperature 68°C เป็นเวลา 10 นาที

ยีน HA

เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 1.8 kb การทำ PCR (High fidelity (HiFi) *Taq* DNA polymerase, Invitrogen) ในปฏิกิริยาประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้ 10X PCR buffer 5 μ l (1X), 10 mM dNTPs 1 μ l (0.2 mM), 50 mM MgSO₄ 1.5 μ l (1.5 mM), Bm-HA-1/Bm-NS-890R primer 1 μ l (0.2 μ M), HiFi *Taq* 0.2 μ l (1.0 U), cDNA 2 μ l และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 μ l ด้วย ddH₂O นำเข้าเครื่อง PCR (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้ คือ initial denature temperature 94°C เป็นเวลา 2 นาที, denature temperature 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing temperature 60°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension temperature 68°C เป็นเวลา 2 นาที (1 kb ต่อ 1 นาที) จำนวนรอบเท่ากับ 30 cycles และ final extension temperature 68°C เป็นเวลา 10 นาที

ยีน NP

เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 1.5 kb การทำ PCR (AT Max *Taq* DNA polymerase (Hot start), Vivantis) ปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X buffer S 5 μ l (1X), 10 mM dNTPs 1.75 μ l (0.35 mM), 10 μ M Ba-NP-1/Ba-NP-1565R primer 2.5 μ l (0.5 μ M), AT Max *Taq* 0.4 μ l (2.0 U), cDNA 3 μ l และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 μ l ด้วย ddH₂O นำเข้าเครื่อง PCR (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้ คือ initial denature temperature 94°C เป็นเวลา 2 นาที, denature temperature 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing temperature 56°C

เป็นเวลา 30 วินาที และ extension temperature 72°C เป็นเวลา 1 นาที (1 kb ต่อ 30 วินาที) จำนวนรอบเท่ากับ 35 cycles และ final extension temperature 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ยีน NA

เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 1.4 kb การทำ PCR (Perpetual Opti Taq DNA polymerase (Hot start), Vivantis) ปฏิบัติการประกอบด้วย 10X buffer B 5 µl (1X), 10 mM dNTPs 1 µl (0.2 mM), 10 µM Bm-NA-1/Bm-NA-1413R primer 1 µl (0.2 µM), Perpetual Opti Taq 0.8 µl (2.0 U), cDNA 2 µl และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 µl ด้วย ddH₂O นำเข้าเครื่อง PCR (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้ คือ initial denature temperature 94°C เป็นเวลา 2 นาที, denature temperature 94°C เป็นเวลา 1 นาที, annealing temperature 56°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension temperature 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวนรอบเท่ากับ 35 cycles และ final extension temperature 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ยีน M

เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 1.1 kb การทำ PCR (Perpetual Opti Taq DNA polymerase (Hot start), Vivantis) ปฏิบัติการประกอบด้วย 10X buffer B 5 µl (1X), 10 mM dNTPs 1 µl (0.2 mM), 10 µM Bm-M-1/Bm-M-1027R primer 1 µl (0.2 µM), Perpetual Opti Taq 0.8 µl (2.0 U), cDNA 2 µl และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 µl ด้วย ddH₂O นำเข้าเครื่อง PCR (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้ คือ initial denature temperature 94°C เป็นเวลา 2 นาที, denature temperature 94°C เป็นเวลา 1 นาที, annealing temperature 50°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension temperature 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวนรอบเท่ากับ 35 cycles และ final extension temperature 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ยีน NS

เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 0.9 kb การทำ PCR (Perpetual Opti Taq DNA polymerase (Hot start), Vivantis) ปฏิบัติการประกอบด้วย 10X buffer B 5 µl (1X), 10 mM dNTPs 1 µl (0.2 mM), 10 µM Bm-NS-1/Bm-NS-890R primer 1 µl (0.2 µM), Perpetual Opti Taq 0.8 µl (2.0 U), cDNA 2 µl และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 µl ด้วย ddH₂O นำเข้าเครื่อง PCR (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้ คือ initial denature temperature 94°C เป็นเวลา 2 นาที, denature temperature 94°C เป็นเวลา 1 นาที, annealing temperature 50°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension temperature 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนรอบเท่ากับ 35 cycles และ final extension temperature 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ตาราง 3 แสดง Universal primers [68]

Gene	Forward primer	Reward primer	Size (bp)
PB2	Bm-PB2-1: <u>TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC</u>	Bm-PB2-2341R: <u>ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT</u>	2341+29
PB1	Bm-PB1-1: <u>TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA</u>	Bm-PB-2341R: <u>ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTI</u>	2341+29
PA	Bm-PA-1: <u>TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC</u>	Bm-PA-2233R: <u>ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGIACTI</u>	2233+29
HA	Bm-HA-1: <u>TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGG</u>	Bm-NS-890R: <u>ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGIGITTTI</u>	1778+29
NP	Ba-NP-1: <u>TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGTA</u>	Ba-NP-1565R: <u>ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGIAITTTI</u>	1565+29
NA	Bm-NA-1: <u>TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGAGI</u>	Bm-NA-1413R: <u>ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGITTTI</u>	1413+29
M	Bm-M-1: <u>TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAG</u>	Bm-M-1027R: <u>ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGIAGITTTI</u>	1027+29
NS	Bm-NS-1: <u>TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGTG</u>	Bm-NS-890R: <u>ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGIGITTTI</u>	890+29

หมายเหตุ: 1. ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้บริเวณปลาย 3' แสดง segment specific sequences
 2. ตัวอักษรเฉียงบริเวณปลาย 5' แสดงลำดับเบสบริเวณตำแหน่งจดจำ (recognition sequences) สำหรับ restriction endonucleases *Bsm*BI (Bm) และ *Bsa*I (Ba)
 3. ตัวอักษรปกติแสดงลำดับเบสบริเวณ non-coding region ซึ่งจะมีความคงตัวมากในยีนของ influenza A ทุกเส้น

4. การวิเคราะห์ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis) จากหลังการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ primers ที่จำเพาะในแต่ละยีนแล้วจึงนำดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ได้มาตรวจสอบเพื่อดูขนาดของ PCR product โดยใช้ gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางคือ 0.8 – 1% agarose (Vivantis) gel และย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml ใน 1X TAE buffer (ภาคผนวก ก) โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen) หรือ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) ปริมาณ 1 µl โดยนำ PCR product ที่เพิ่มจำนวนแล้วประมาณ 10% หรือ 5 µl ผสมกับ loading dye 1 µl (ภาคผนวก ก) เพื่อถ่วงให้ดีเอ็นเอ

ลงสู่กันหลุมและป้องกันการฟุ้งกระจายของดีเอ็นเอ ตั้งโปรแกรมเครื่องเป็น 100 โวลต์ เวลา 35-40 นาที หลังจากนั้นจึงสังเกตดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad)

ในกรณีที่ต้องการทำ gel extraction และ purification นั้น ให้ใช้ปริมาณ DNA product 50 µl ผสมกับ loading dye 10 µl เพื่อถ่วงให้ดีเอ็นเอลงสู่กันหลุมและป้องกันการฟุ้งกระจายของดีเอ็นเอ

5. การสกัดดีเอ็นเอจากเจลและการทำให้บริสุทธิ์ (gel extraction and purification)

ขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอมีส่วนของสารพันธุกรรมของไวรัส influenza อยู่หนึ่งชิ้น คือ hemagglutinin (HA) ที่ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ นั้น เกิดส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการ (non-specific product) ของ nonstructural (NS) จากการเลือกใช้ primer คู่ของ Bm-HA-1 และ Bm-NS-890R ดังนั้นในการศึกษาที่ต้องการเฉพาะ HA จึงต้องมีการตัดเฉพาะดีเอ็นเอของ HA ออกมาเท่านั้น นอกจากนั้นยังสามารถใช้ในการแยก PCR product ของยีน NA และยีนอื่นๆ ได้เช่นกันเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของยีนที่ได้จากการทำ PCR โดยนำแผ่นเจล agarose ที่มี PCR product จากการทำ electrophoresis มาวางไว้ที่ UV transilluminator เลือกบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการ ใช้เข็มหมุดปักไว้เพื่อบอกขอบเขตสำหรับตัดเจล หลังทำการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาแล้วจึงทำการแยกดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสำเร็จ GF-1 gel DNA Recovery kit (Vivantis) ทำโดยตัดนำเจลที่ต้องการใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge tube เติม Gel DNA binding buffer (GB buffer) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มที่ 50°C เป็นเวลานาน 10 นาที หรือจนกว่าเจลมีการละลายอย่างสมบูรณ์ นำส่วนของเจลที่ละลายนี้ใส่ใน GF-1 column บนเหยียงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่ตกลงมาจากการปั่นเหยียง เติม Wash buffer ปริมาตร 750 µl ลงใน GF-1 column เพื่อเป็นการล้างส่วนของเจลที่หลงเหลือ แล้วปั่นเหยียงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่ตกลงมาจากการปั่น และปั่นเพื่อเป็นการกำจัดส่วนที่ตกค้างอยู่อีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที ย้าย GF-1 column ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม Elution buffer (EB buffer) ปริมาตร 30 µl ในบริเวณกลางของ GF-1 column ปั่น นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เก็บส่วนที่ตกลงมาจากการปั่นเหยียงที่อุณหภูมิ -20°C ซึ่งเป็นดีเอ็นเอบริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

6. การย่อยพลาสมิดและ PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (digestion)

ในขั้นตอนการโคลนยีน NA (DNA cloning) ก่อนที่จะทำการเชื่อมต่อยีนของไวรัส influenza เข้ากับเวกเตอร์ (vector) คือ พลาสมิด pHW2000 [67] เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอลูกผสม

(recombinant DNA) นั้นจะต้องมีลำดับเบสที่สามารถต่อเชื่อมเข้ากันได้ สามารถทำได้โดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsmBI* ตัดทั้งในส่วนของพลาสมิดเองและดีเอ็นเอของไวรัส ลำดับเบสที่เป็น ตำแหน่งจดจำของทั้งสองเอนไซม์แสดงดังนี้



การย่อยพลาสมิด pHW2000 ที่มีขนาดประมาณ 3 kb ด้วยเอนไซม์ *BsmBI* (New England Biolabs) ในปฏิกิริยาประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้ 10X buffer 3 ปริมาตร 5 μl (1x), *BsmBI* restriction enzyme 1 μl (10.0 U), pHW2000 plasmid 15 μl และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 μl ด้วย ddH₂O จากนั้นป้อนที่ 55°C นาน 2 ชั่วโมง และหยุดการทำงานของเอนไซม์ (inactivated enzyme) ที่ 80°C นาน 20 นาที โดยใช้เครื่อง Thermal cycle (Master cycle gradient, Eppendroff)

การตัด PCR product ของยีน NA ด้วยเอนไซม์ *BsmBI* (New England Biolabs) ในปฏิกิริยาประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้ 10X buffer 3 ปริมาตร 5 μl (1x), *BsmBI* restriction enzyme 1 μl (10.0 U), PCR product 30 μl และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 μl ด้วย ddH₂O จากนั้นป้อนที่ 55°C นาน 2 ชั่วโมง และหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80°C นาน 20 นาที โดยใช้เครื่อง Thermal cycle (Master cycle gradient, Eppendroff)

หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วให้ทำการ purify ดีเอ็นเออีกครั้ง โดยการทำการ gel electrophoresis และ gel extraction and purification ดังข้อ 3.4 และ 3.5

7. การเชื่อมยีนเข้าสู่พลาสมิด (ligation)

หลังจากการย่อยพลาสมิดและ PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วจะได้ ตำแหน่งของเบสที่สามารถเชื่อมต่อกันได้พอดี จึงทำการเชื่อม (ligate) ยีนของไวรัสแต่ละเส้นกับพลาสมิดโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase with PEG (Fermentus) ในปฏิกิริยาประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้ 10x ligation buffer 5 μl (1X), T4 DNA ligase (5.0 U) 1 μl , digested pHW2000 plasmid 3 μl , digested PCR product 14 μl และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 μl ด้วย ddH₂O จากนั้นป้อนที่ 16°C นาน 16 ชั่วโมง และหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่ 65°C นาน 10 นาที โดยใช้เครื่อง Thermal cycle (Master cycle gradient, Eppendroff) จะได้พลาสมิดที่มียีนของไวรัส influenza สายพันธุ์ H5N1 ตามที่ต้องการซึ่งสามารถตรวจสอบเบื้องต้นได้โดยการทำการ gel electrophoresis

8. การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ competent cell (transformation)

วิธีการนำ recombinant vector เข้าสู่ competent cell ในการศึกษาค้างนี้ใช้วิธีการทำ electroporation โดย competent cell ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ ได้แก่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP10 (TOP10 *E. coli*) ก่อนการทำ electroporation นั้นต้องเตรียม LB (Luria-Bertani) (Difco) agar plate ที่มี 100 µg/ml ampicillin นำไปบ่มไว้ที่ 37°C นำ 0.1 cm electroporation cuvette แช่เย็นในน้ำแข็ง ส่วน S.O.C. medium (Invitrogen) ให้นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ electrocompetent cell ปริมาตร 50 µl มาทำให้ละลายในน้ำแข็ง เติม recombinant vector 3 µl ผสมให้เข้ากันอย่างเบามือ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที ดูด mixture solution ที่ได้ใส่ใน cold electroporation cuvette นำเข้าเครื่อง Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad) แล้วรีบเติม S.O.C. medium 250 µl ขั้นตอนนี้ต้องทำอย่างรวดเร็วและเบามือ ห้ามเคาะหลอดเพราะจะทำให้อัตราการ transformation ลดลง จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ใน shaker incubator ที่ความเร็วรอบ 225 rpm นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้นำมา spread ใน LB agar plate ที่มี 100 µg/ml ampicillin ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 50 µl, 100 µl และ 150 µl นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนี (colony) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการศึกษาค้างต่อไป

9. การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับยีนลูกผสม (colony selection)

เชื้อ *E. coli* ที่ได้รับ recombinant DNA จะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin เนื่องจากพลาสมิด pHW2000 มีส่วนของยีนที่ดื้อต่อยาดังกล่าว จากนั้นใช้ห้วงเย็บเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่คัดเลือกไว้ประมาณ 5 ถึง 10 โคโลนี ถ่ายเชื้อลงใน LB broth ที่มี 100 µg/ml ampicillin ปริมาตร 2 ml บ่มใน shaker incubator ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16 ชั่วโมง ที่ความเร็ว 225 rpm เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดสำหรับตรวจว่าไยีนที่ต้องการหรือไม่โดยการทำ PCR และ DNA sequencing ในลำดับต่อไป ขณะเดียวกันนี้ให้เก็บเชื้อใน LB broth ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 10% glycerol ไว้เป็น stock เชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -80°C สำหรับนำมาสกัดพลาสมิดให้ได้ปริมาณมากต่อไป

10. การสกัดพลาสมิด (plasmid extraction)

การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep kit (Fermentas) มีวิธีการดังนี้ คือ ปั่นหลอดอาหารที่เพาะเชื้อด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที ดูดส่วน supernatant ทิ้งไป เติม Resuspension solution 250 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette ดูดขึ้นดูดลงและ vortex จากนั้นเติม Lysis solution 250 µl ผสมให้เข้ากันด้วยการ invert 4 ถึง 6 ครั้ง เติม Neutralization solution 350 µl แล้วผสมอย่างเบามือด้วยการ invert เช่นเดียวกัน ควรเติม Neutralization solution ภายหลังการเติม Lysis solution ไม่เกิน 5 นาที เนื่องจากจะทำให้ได้ส่วน

ของ DNA ของเซลล์ออกมาด้วย จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที ค่อยๆ ดูดส่วนใส ด้านบนลงใน GeneJET™ spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที ที่มีส่วนใสด้านล่าง ไป เติม Wash solution 500 µl ลงใน GeneJET™ spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที ที่มีส่วนใสด้านล่างไป เติม Wash solution 500 µl ทำเช่นเดิมอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงเปล่าๆ ที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที เพื่อกำจัดสารที่ยังหลงเหลืออยู่ใน GeneJET™ spin column ให้หมดไป แล้วย้าย column ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม Elution buffer 50 µl วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 2 นาที เก็บสารละลายพลาสติกที่เป็นส่วนใสด้านล่างนำมาวัดปริมาณความเข้มข้นได้โดยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 nm เก็บพลาสติกไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอใช้ในขั้นตอนต่อไป

สูตรคำนวณความเข้มข้นของสารพันธุกรรม

$$\text{DNA conc. } (\mu\text{g/ml}) = \text{O.D. } 260 \times 50 \times \text{dilution factor}$$

11. ปฏิกริยาการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing reaction)

การตรวจสอบลำดับเบสของยีนทั้ง 8 เส้นว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงและตรวจสอบว่า ยีนของเชื้อไวรัส influenza ได้เชื่อมเข้ากับพลาสติกอย่างถูกต้องหรือไม่นั้น ทำได้ด้วยการหาลำดับสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดวิเคราะห์ Big-dye Terminator Sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems) โดยใช้ปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 10-40 ng ในปฏิกริยาประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้ ddH₂O 13 µl, plasmid DNA purify 2 µl, 3.2 µM specific primers 1 µl (แสดงดังตาราง 4), 5X Big-dye buffer 2 µl (0.5X) และ Big-dye terminator v.3.1 ปริมาตร 2 µl รวม 20 µl จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycle (Master cycle gradient, Eppendroff) ที่มี Thermal cycle คือ initial denature temperature 96°C เป็นเวลา 1 นาที, denature temperature 96°C เป็นเวลา 10 วินาที, annealing temperature 50°C เป็นเวลา 5 วินาที และ extension temperature 60°C เป็นเวลา 4 นาที จำนวนเท่ากับ 25 cycles ต่อจากนั้นกำจัด dye terminator โดยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล (ethanol precipitation) เนื่องจากหลังจากผ่านขบวนการ DNA sequencing โดยใช้ Big Dye v.3.1 ซึ่งหลังเสร็จสิ้นขบวนการยังมีส่วนของ dye terminator หรือส่วนประกอบอื่นๆ ที่เหลือจากปฏิกริยา ดังนั้นต้องมีการกำจัดส่วนดังกล่าวเพื่อไม่ให้มีผลต่อการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป โดยอาศัยวิธีการที่เรียกว่า ethanol precipitation วิธีการทำโดยนำ DNA sequencing product ปริมาตร 20 µl ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ เติม 95% ethanol 50 µl ต่อจากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 2 µl ผสมให้เข้ากัน

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที พร้อมกับหุ้มด้วยฟอลซีเพื่อป้องกันการสัมผัสกับแสง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใส่ออกไปอย่างระมัดระวัง เก็บเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอที่ตกตะกอนอยู่ ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส่ออกไป เก็บส่วนของตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอด นำไประเหย ethanol ออกโดยเปิดฝาหลอดใส่ใน heat block ที่ 90°C นาน 1 นาที ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอที่ต้องการแห้งอยู่ที่ก้นหลอด เติมน้ำ HiDi-formamide (Applied Biosystems) ปริมาตร 20 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex แล้วนำไปบ่มใน heat block ที่ 90°C เป็นเวลานาน 2 นาที โดยปิดฝาหลอดไว้เพื่อป้องกันการระเหย และแช่เย็นที่ 4°C ทันที นาน 2 นาที ดูดใส่ออก ABI นำเข้าเครื่อง ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

ตาราง 4 แสดง sequencing primers

Primer name	Nucleotide (5'-3')
Bm-NA-1	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGAGT
Bm-NA-1413R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT
NA-F407	CAAAGACAGAAGCCCTCACAGAACA
NA-F925	TCGGAGA(CT)AATCCACGCCCAATGA
NA-R413	GTCTTTGACAGTCCC(AG)TTGGAGTGC
NA-R962	ACTACC(GT)GTCCATCATTGGGGCGT

12. การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (transfection)

ในกระบวนการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงหรือการทำ transfection เพื่อให้เกิดการสร้าง recombinant influenza virus ด้วยวิธี eight plasmids DNA transfection [67] จำเป็นต้องใช้ mammalian cell line ได้แก่ เซลล์ 293H ที่มีคุณสมบัติในการรับพลาสมิดทั้ง 8 ยีน เพื่อประกอบเป็นอนุภาคไวรัสได้ดีและเซลล์ MDCK ซึ่งมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ดี เนื่องจากพลาสมิดที่ใช้มีดีเอ็นเอของไวรัส influenza มีโปรโมเตอร์ (promoter) ที่จำเพาะต่อการแสดงออกของยีนใน mammalian cell โดยก่อนทำ transfection หรือเพิ่มจำนวนไวรัส 1 วัน ต้องเตรียมเลี้ยงเซลล์ 293H และ MDCK ลงใน 6 well tissue culture plate ที่เลี้ยงในอาหาร complete MEM media ให้มีการเจริญของเซลล์ที่ 90-95% confluence (ประมาณ 1.0×10^6 cell/well)

วิธีการทำ Lipofectamine transfection

ในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าไปยัง mammalian cell line มีหลายวิธี สำหรับการศึกษาค้างนี้ได้ใช้ lipofectamine transfection ที่เป็นการใช้ cation lipid เป็นตัวห่อหุ้ม DNA (liposome) แล้วส่งดีเอ็นเอผ่านเข้าไปยัง mammalian cell การที่จะประกอบเป็นอนุภาคไวรัสได้นั้น mammalian cell จำเป็นต้องได้รับทั้ง 8 พลาสมิด ใน 1 เซลล์ เพื่อที่จะเกิดกระบวนการที่จะสร้างเป็นโปรตีนและจีโนมของอนุภาคไวรัสใหม่ได้ ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องเตรียม influenza recombinant plasmid ที่มียีนของไวรัสใช้หัดนกตามกระบวนการต่างๆ ให้พร้อม เพื่อที่จะนำมาทำ transfection ในการศึกษาค้างนี้ได้ประยุกต์ใช้ตามวิธีการทำ lipofectamine 2000 และวิธีการของ Hoffmann และคณะ [67], [83] โดยเตรียมเจือจางพลาสมิด (diluted plasmid) แต่ละปฏิกิริยา (reaction) ให้มีความเข้มข้นละ 4 µg ใน 250 µl OPTi-MEM transfection media เตรียม diluted lipofectamine ในแต่ละ reaction ให้ dilute 80 µl lipofectamine ใน 250 µl OPTi-MEM transfection media ก่อนใช้ให้ผสม lipofectamine เเบาๆ โดยการใช้นิ้วเคาะ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ผสม diluted plasmid กับ diluted lipofectamine (500 µl/1reaction) เเบาๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที นำ 293H cell ที่เตรียมไว้มาดูดอาหารเก่าออก แล้วล้างด้วย 1 ml OPTi-MEM transfection media นำ combined solution ที่มีลักษณะขุ่นๆ แต่ละ reaction ใส่ใน แต่ละหลุม ค่อยๆ เขียง plate ไปมา หรือเลื่อน plate ไปด้านหน้าด้านหลังและด้านข้างไปมาเบาๆ หลังจากนั้นบ่มที่ 37°C ใน CO₂ incubator นาน 6-8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหลังจาก transfection แล้วดูด combined solution ออก ระวังอย่าให้โดนเซลล์เพาะเลี้ยง เติมน้ำ 1 ml fresh OPTi-MEM transfection media บ่มที่ 37°C CO₂ ต่ออีก 36-48 ชั่วโมงหลังจาก transfection แล้วเติมน้ำ 2 µg/ml TPCK-trypsin 1 ml บ่มที่ 37°C ภายใต้สภาวะที่มี 5% CO₂ ต่ออีก 48 หรือ 72 ชั่วโมง จากนั้นดูด media ในแต่ละหลุมปริมาตร 1 ml นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเก็บส่วน supernatant นำไปเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ MDCK ต่อไป

วิธีการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ MDCK ทำได้โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าของเซลล์ MDCK ออกก่อนแล้วจึงนำ transfection supernatant ปริมาตร 500 µl มา inoculate ลงในเซลล์ MDCK แล้วบ่ม ที่ 37°C ใน CO₂ incubator นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาดูดสารละลายทิ้งไป เติมน้ำ MEM ที่ประกอบด้วย 1 µg /ml TPCK-trypsin 2 ml จากนั้นบ่มที่ 37°C ใน CO₂ incubator นาน 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด MDCK transfection supernatant บ่มที่ 5,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็น reverse genetic virus ไวรัสเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักต่อไป

13. การเพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟัก (recombinant virus propagation)

การเพิ่มจำนวนไวรัสโดยการฉีดตัวอย่างในไข่ไก่ฟัก วิธีทำโดยการนำไข่ไก่ฟักที่ทำตำแหน่งฉีดเรียบร้อยแล้ว เช็ดเปลือกไข่ไก่ฟักบริเวณที่ทำตำแหน่งฉีดและอุปกรณ์เจาะไข่ไก่ฟักด้วยสำลีชุบทิชเชอร์ไอโอดีนและเจาะเปลือกไข่ไก่ฟักตรงตำแหน่งที่ฉีด ระวังไม่ให้ไข่ไก่ฟักแตก ร้าว นำกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร (ml) พร้อมเข็มฉีดยาขนาด 26 Gx1/2" ดูดตัวอย่างไวรัสประมาณ 0.1–0.3 ml แล้วค่อยๆ ทิ่มปลายเข็มลงไปตรงๆ บริเวณรูที่เจาะไว้ ค่อยๆ ฉีดตัวอย่างลงไปไข่ไก่ฟัก หลังจากนั้นดึงปลายเข็มขึ้นตรงๆ โดยใช้ไข่ไก่ฟัก 3–5 ฟองต่อหนึ่งตัวอย่าง เช็ดเปลือกไข่ไก่ฟักบริเวณที่ฉีดด้วยสำลีชุบทิชเชอร์ไอโอดีนอีกครั้ง ปิดเปลือกไข่ไก่ฟักด้วยเทปใส บ่มไข่ไก่ฟักในที่ตู้เพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 95% เป็นเวลานาน 4 วัน โดยต้องส่องดูอัตราการตายของไข่ไก่ฟักทุกวัน เมื่อครบเวลาให้เก็บน้ำไข่บริเวณที่เป็น allantoic fluid โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 26 Gx1/2" จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบนเพื่อไว้ใช้ทดสอบต่อไป

14. การตรวจพิสูจน์ไวรัสโดยวิธี hemagglutination test (HA test)

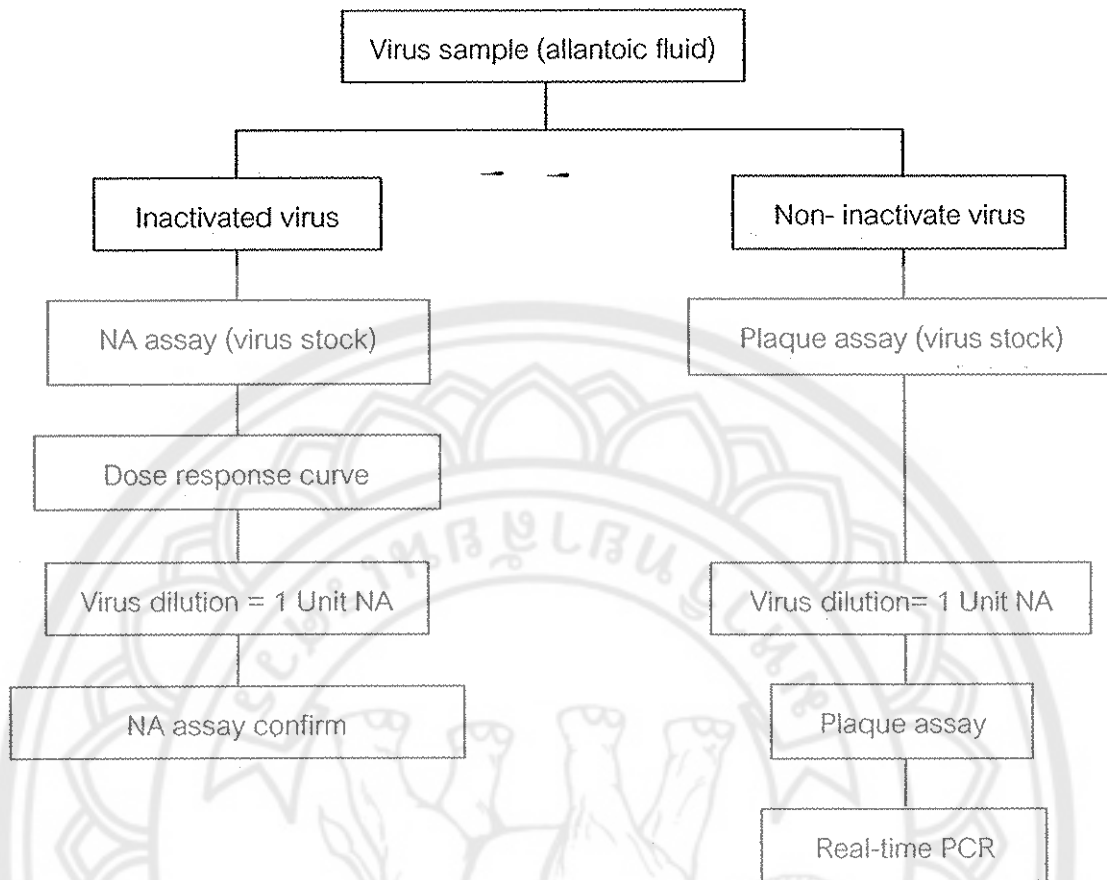
Hemagglutination test เป็นวิธีทดสอบในการตรวจหาไวรัสที่สามารถจับกลุ่มตกตะกอน (agglutination) กับเม็ดเลือดแดง ซึ่งไวรัส influenza A จะมีแอนติเจนบนผิวของอนุภาคได้แก่ hemagglutinin ที่สามารถจับกับ receptor sites บนผิวเม็ดเลือดแดงของสัตว์ได้โดยตรง ทำให้เกิดปรากฏการณ์เม็ดเลือดแดงเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนหรือเป็นร่างแหเชื่อมกันเป็นสะพานต่อกันระหว่างเม็ดเลือดแดงด้วยกันและแอนติเจน การทำ HA test ในการทดสอบจะทำแบบ duplicate คือ 1 ตัวอย่าง ทดสอบ 2 หลุม โดยใช้ 96 well microplate เติม PBS ปริมาตร หลุมละ 25 μ l ดูดน้ำไข่ไก่ฟัก ปริมาตร 25 μ l เติมลงในหลุมที่กำหนดไว้ทั้ง 2 หลุม จากนั้นเติม PBS หลุมละ 25 μ l อีกครั้ง เติมเม็ดเลือดแดงไก่เข้มน้ำ 1% (chicken red blood cell, RBC) ปริมาตร หลุมละ 25 μ l เติมน้ำใน microplate เบบๆ ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 25–30 นาที อ่านผลจากการเกิด hemagglutination และแปลผลการทดสอบโดยผลการทดสอบ HA test เป็นลบ นั่นคือเม็ดเลือดแดงเกิดการตกเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุม ส่วนผลการตรวจสอบ HA test เป็นบวกนั้นจะเกิดการตกตะกอนจากปฏิกิริยาการจับกันของเม็ดเลือดแดงกับแอนติเจนเป็นกลุ่มก้อนหรือเป็นร่างแห นอกจากนั้นถ้าต้องการหาความเข้มข้นไวรัสในตัวอย่าง allantoic fluid สามารถทำได้โดยการค่าไตเตอร์ (titer) โดยทำการเจือจางตัวอย่างไวรัสด้วย PBS แบบ 2-fold dilution ตั้งแต่ undilute จนถึงความเจือจาง 1:2048 ทำเช่นเดียวกับ HA test แปลผลการทดสอบโดยหาค่าไตเตอร์สุดท้ายของไวรัสที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงกับแอนติเจน โดยหลุมสุดท้ายที่เกิดการตกตะกอน ถือได้ว่าเป็นค่าไตเตอร์ที่มีปริมาณไวรัสเป็น 1 HA unit และหลุมต่อเป็น 2 HA unit, 4 HA unit และ 8 HA unit ตามลำดับ

15. การทำ 50 percent egg infective dose (EID₅₀)

การหาปริมาณหรือความแรง (potency) ของไวรัสในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการฉีดเชื้อไวรัสเข้าไข่ไก่ฟักหรือ 50 percent egg infective dose (EID₅₀) ซึ่งเป็นการหาค่าความเจือจางของสารละลายไวรัสที่ทำให้ไข่ไก่ฟักติดเชื้อได้ร้อยละ 50 ทำได้โดยการเจือจางเชื้อไวรัสแบบ 10-fold dilution ตั้งแต่ 10⁻¹ ถึง 10⁻¹⁰ จากนั้นนำแต่ละ dilution ฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก dilution ละ 5 ฟอง ด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟักที่กล่าวก่อนหน้านี้ เก็บ allantoic fluid มาทดสอบ HA test บันทึกผล หาค่า 50 percent end point โดยวิธีของ Reed and Muench รายละเอียดกล่าวไว้ในภาคผนวก ง

การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดส (neuraminidase activity)

วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ neuraminidase (NA activity assay) นั้นในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก โดยมีการปรับปริมาตรลดลงประมาณ 5 เท่า ของปริมาตรการทดสอบเดิม ภายใต้หลักการที่ว่าเอนไซม์นิวรามินิเดสหรือ sialase ที่อยู่บนผิวอนุภาคของไวรัส เมื่อทำปฏิกิริยากับ substrate ที่จำเพาะ คือ fetuin จะเกิดการปล่อย sialic acid ออกมา หลังทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสาร arsenite แล้วสามารถวัดปริมาณ sialic acid ได้โดยเติมสาร thiobarbitulic acid (TBA) จะเกิดสารสีแดงชมพู ตรวจวัดปริมาณได้โดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 549 nm หลังจากได้ไวรัสที่ต้องการครบทั้ง 3 สายพันธุ์ ต่อมาจึงทำการทดสอบ neuraminidase activity ซึ่งมีลำดับขั้นตอนโดยรวมดังนี้



ภาพ 22 การทดสอบ neuraminidase activity

1. การเตรียมไวรัสสำหรับทำ NA assay

เนื่องจากไวรัสที่ใช้ในการศึกษาส่วนหนึ่งเป็นไวรัสที่ได้จากการสร้างไวรัสขึ้นมาใหม่ด้วยเทคนิค reverse genetics โดยใช้ไวรัส H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) เป็นไวรัสต้นแบบ และยีน NA จากไวรัสไข้หวัดนกนำมาประกอบ เพราะฉะนั้นไวรัสที่ใช้ในการศึกษาจึงต้องมีการทำ inactivated virus เพื่อป้องกันการแพร่กระจายออกสู่สิ่งแวดล้อม โดยใช้ 0.01% formalin ที่เจือจางใน PBS จากนั้นค่อยๆ หยดลงใน virus solution ผสมให้เข้ากันดี เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำไวรัสดังกล่าวมาฉีดลงในไข่ไก่ฟักตามวิธีก่อนหน้าเพื่อตรวจสอบว่าไวรัสชนิดนั้นขาดคุณสมบัติในการติดเชื้อแล้วจึงนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การทำ NA assay

ในการที่จะศึกษาเกี่ยวกับ NA activity ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์นั้น ก่อนอื่นจะต้องศึกษาถึงปริมาณของไวรัสที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ในการทดลองหรือ dose response โดยการศึกษาดังกล่าวทำได้โดยเจือจางตัวอย่างไวรัสใน PBS แบบ 2-fold dilution

ตั้งแต่ 1:1,1:2 ถึง 1:62 ตามลำดับ จากนั้นนำไวรัสแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในหลอดฝาเกลียว (Simport Microwtube®, Simport) หลอดละ 10 µl เติม PBS ปริมาตร 10 µl และ fetuin 20 µl ตามลำดับ ในส่วนของ negative control ให้เติม PBS แทนตัวอย่างไวรัส ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37°C นาน 18 ชั่วโมง เติมสารละลาย periodate 20 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เติม arsenite reagent 200 µl ลงในแต่ละหลอดเพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา ในขั้นตอนนี้เมื่อเขย่าจะปรากฏสีน้ำตาลเกิดขึ้นให้เขย่าต่อไปจนสีนั้นหายไปและมีลักษณะขุ่นขึ้นเกิดขึ้น เติมสารละลาย TBA ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ในขั้นตอนนี้ถ้าในตัวอย่างมีเอนไซม์นิวรามินิเดสจะมีสีชมพูเกิดขึ้นและความเข้มของสีจะแปรผันตามปริมาณของเอนไซม์ดังกล่าวที่มีในปฏิกิริยา เมื่อครบเวลานำหลอดทดสอบมาแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที เติม warrenoff reagent 600 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 rpm นาน 5 นาที นำส่วนใสด้านบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Beckman Coulter) ที่ความยาวคลื่น 549 nm โดยกำหนดให้ 1 Unit NA activity คือ ความเจือจางของไวรัสที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 549 nm มีค่าเป็น 0.5 ภายใต้ standard conditions

3. Plaque assay

Plaque assay เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสใน cell monolayer ทำได้โดยการเลี้ยง primary chicken embryo fibroblast cell (PCF) ใน 6 well plate ให้มีจำนวนเซลล์หลุมละ 3×10^6 cell/well บ่มเซลล์ไว้ที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่บน plate ดี ทำการเจือจางไวรัสที่ผ่านการกรองด้วย filter ขนาด 0.45 µm (Minisart®, Sartorius) แบบ 10-fold serial dilution โดยใช้ cold dilute medium (cold MEM 6 ml, 2 µg/ml Typsin) สำหรับการทำให้ plaque assay ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 ในทุกขั้นตอนไม่ต้องเติม trypsin จากนั้นนำเซลล์ PCF มาดูด media เก่าออกให้หมด ล้างด้วย MEM ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 1 ml จากนั้นดูด media ที่ทิ้งไป เติม cold virus dilution ปริมาตร 800 µl ลงแต่ละหลุมอย่างเบา มือ ส่วนหลุมที่เป็น negative control ให้เติม dilute medium แทน แล้วนำเซลล์บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง โดยวางบน Multi-3D-Shaker (BIOSAN) ที่กำหนดความเร็วต่ำที่สุดเพื่อให้ไวรัสมีการกระจายตัวทั่วผิวเซลล์ ในระหว่างที่รอให้ไวรัสยึดเกาะผิวเซลล์อยู่นั้นให้เตรียม overlay medium ที่ประกอบด้วย 0.6% SeaPlaque® Agarose (Cambrex Bio Science Rockland) ใน MEM media โดยนำ 4% Sea plaque ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วไปต้มให้เจลละลายดี จากนั้นนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อไม่ให้เจลแข็งตัวเร็ว ก่อนครบเวลาบ่มไวรัสประมาณ 5 นาที นำ MEM ผสมกับ 4% Sea plaque และ 2 µg/ml Typsin (ปริมาตร 16 µl ใน overlay medium 20 ml) เมื่อ

ครบเวลา 1 ชั่วโมง ดูดไวรัสออกให้หมด ระวังอย่าเอียง plate นานจะทำให้ผิวหน้าเซลล์แห้งและไวรัสมีการกระจุกตัวเป็นแห่งๆ อาจทำให้เซลล์มีการแหงนงั่วได้ แล้วเททับด้วย overlay medium หลุมละ 3 ml อย่างเบา มือ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวดี นำเซลล์ไปไว้ที่ 37°C และมี 5% CO₂ เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จึงนำเซลล์แต่ละหลุมมา fixed ด้วย 10% formaldehyde หลุมละ 500 µl (ค่อยๆ หยดทีละหยดอย่างช้าๆ) วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1-3 ชั่วโมง ค่อยๆ แคะเจลใต้น้ำอย่างเบา มือ ระวังอย่าให้โดนบริเวณผิวเซลล์ จากนั้นย้อมด้วย 0.1% crystal violet หลุมละ 500 µl ค่อยๆ เอียง plate ให้สีกระจายอย่างทั่วถึง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที ดูดสีทิ้งไป ปล่อยให้เซลล์แห้ง นับจำนวน plaque ที่ได้ นำมาคำนวณค่า Plaque Forming Unit (PFU)/ml ดังนี้

$$\text{ปริมาณไวรัส (PFU/ml)} = \frac{\text{จำนวน plaque ที่นับได้}}{\text{ความเจือจางของไวรัส} \times \text{ปริมาณของไวรัสที่เติมลงไป}}$$

4. การทำ one-step real-time PCR

การทำ one-step real-time PCR เป็นวิธีการหาปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่แสดงผลในรูปของค่า Cycle Threshold (Ct) หรือจำนวนรอบของปฏิกิริยาที่ทำให้สารพันธุกรรมมีการเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าหรือสัญญาณ fluorescence ถึงจุด threshold นั้นเอง โดยใช้ RNA ที่สกัดได้จาก virus dilution จากการทำ plaque assay ก่อนหน้านี้เป็น template ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ primer ที่สามารถเพิ่มจำนวนยีน M ของ influenza virus ได้ โดยไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ใช้ primer Matrix1 ซึ่งเคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ [84] ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 นั้นใช้ primer ที่ออกแบบโดยโปรแกรม Primer Premier version 5.0 คือ M1-H5-F และ M1-H5-R แสดงดังตาราง 5 การทำ one-step real-time PCR ทำได้โดยใช้ชุดสำเร็จ SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) มีส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนดังต่อไปนี้ 2X Reaction Mix 12.5 µl (1X), 10 µM primer mixed 0.25 µl (0.1 µM), SuperScript™ III RT/ Platinum® Taq Mix (includes RNaseOUT™) 0.5 µl, RNA template 1 µl และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 25 µl ด้วย DEPC-treated water นำเข้าเครื่อง real-time PCR (Rotor-Gene™ 6000 real-time rotary analyzer, Corbett) โดยสภาวะที่ใช้ คือ 50°C เป็นเวลา 10 นาที, 95°C เป็นเวลา 5 นาที และมี Thermal cycle เป็น denature temperature 95°C เป็นเวลา 15 วินาที, annealing temperature 54°C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension temperature 72°C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวนรอบเท่ากับ 40 cycles และปรับ melting curve analysis ที่ 75°C ถึง 95°C จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ผล

ตาราง 5 แสดง one-step real-time PCR primers

Primer name	Nucleotide (5'-3')	Product size (bp)
Matrix1-F	AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG	101
Matrix1-R	TGCAAAGACATCTTCAAGTCTCTG	
M1-H5-F	CTATCACCAACCCACTAATCAGAC	189
M1-H5-R	TCAGACCAGCACTAGAGTTAGG	

5. การตรวจสอบ real-time PCR products โดยการ sequencing

การทำ one-step real-time RT-PCR เป็นการสังเคราะห์ RNA เป็น cDNA จากนั้น cDNA จะถูกใช้เป็น template สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน M ของ influenza A virus ซึ่งปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนเดียว การทำ one-step real-time RT-PCR (QIAGEN OneStep RT-PCR (Hot start), QIAGEN) ปฏิกิริยาประกอบด้วย 5X buffer 5 μ l (1X), 10 mM dNTPs 2 μ l (0.4 mM), 10 μ M Matrix1-R/F, M1-H5-R/F primer 3 μ l (0.6 μ M), QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 2 μ l, RNA template 4 μ l และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 μ l ด้วย RNase free water นำเข้าเครื่อง PCR (Master cycle gradient, Eppendroff) โดย Thermal cycle ที่ใช้คือ 50°C นาน 30 นาที เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนจาก RNA เป็น cDNA จากนั้นเข้าสู่ initial denature temperature 95°C เป็นเวลา 15 นาที, denature temperature 94°C เป็นเวลา 1 นาที, annealing temperature 54°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension temperature 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวนรอบเท่ากับ 30 cycles และ final extension temperature 72°C เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำ gel electrophoresis และ gel extraction and purification จากนั้นทำ cycle sequencing ตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมตามวิธีที่กล่าวมาก่อนหน้านี้

การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์นิวรามิनिเดส

ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์นิวรามิनिเดสของ influenza A virus ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยให้เอนไซม์นิวรามิनिเดสของไวรัสทำปฏิกิริยากับ substrate ที่จำเพาะในเวลา 1 ชั่วโมง เนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าวนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์กับสารตั้งต้นอย่างชัดเจนและรวดเร็ว [76], [85] ทำโดยการเติม substrate ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 0.03125, 0.0625, 0.09375, 0.125, 0.1875, 0.25, 0.375, 0.5 และ 0.625 หรือใช้ปริมาตร 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20,

30, 40 และ 50 μ l ตามลำดับ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณของ N-Acetyl-neuraminic acid ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจากสูตร

$$\text{N-Acetyl-neuraminic acid } (\mu\text{mol}) = \frac{V \times \text{O.D. } 549}{\epsilon}$$

V คือ ปริมาตรทั้งหมดในหลอดทดลอง (ml)

ϵ คือ ค่าประสิทธิ์ของสารตั้งต้น (57,000)

สถิติที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

สถิติที่ใช้ในการเปรียบเทียบระดับนิวรามินิเดสของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ในการศึกษาค้างนี้ ได้แก่ Independent paired simple t-test ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS 15.0 evaluation

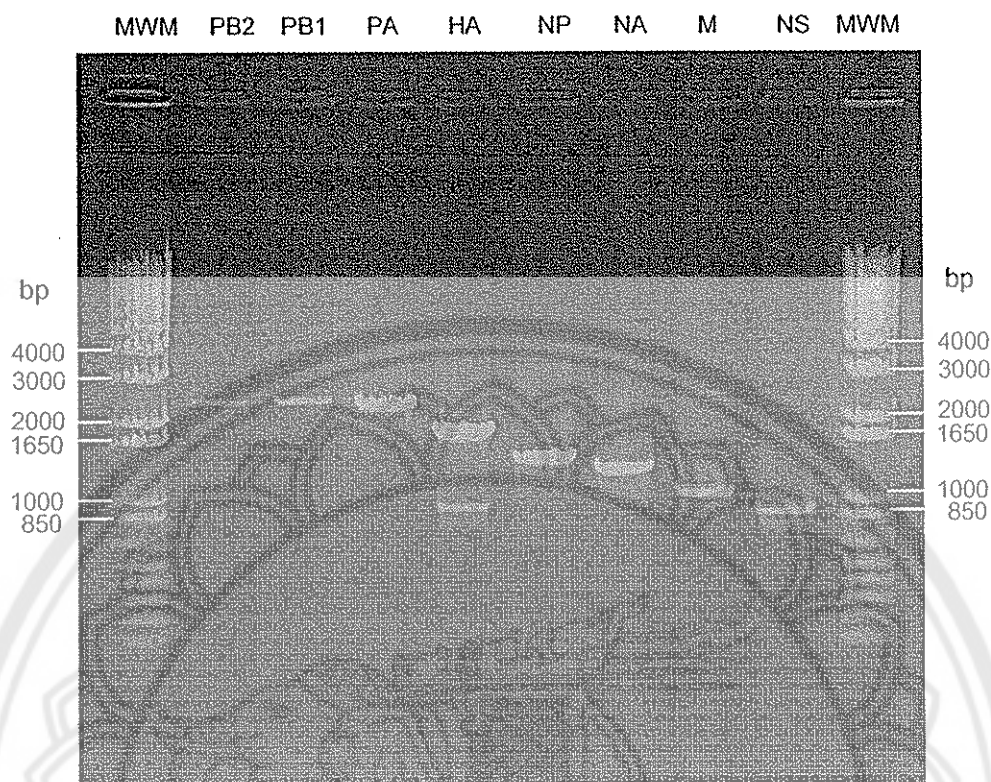
ผลการวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 (A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1)) ที่แยกได้จากเปิดในช่วงที่มีการระบาดของไวรัสไข้หวัดนก ในเขตจังหวัดพิษณุโลก และไวรัส influenza A สายพันธุ์ H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) สายพันธุ์มาตรฐาน โดยได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง กรมปศุสัตว์ อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก

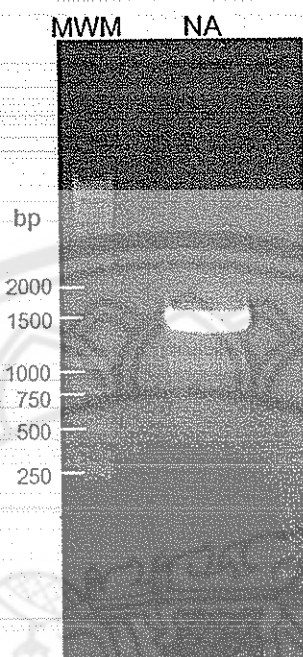
การสร้าง reverse genetic virus สายพันธุ์ H1N1-NA-H5N1

จากการศึกษาเมื่อนำตัวอย่างไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 มาทำการศึกษาคุณลักษณะและขนาดของสารพันธุกรรมทั้ง 8 เส้น โดยการนำตัวอย่างไวรัสจาก allantoic fluid มาสกัด RNA ตามด้วยการทำ RT-PCR โดยใช้ Uni 12 universal primers ซึ่งเป็น primer ที่ใช้สำหรับการเปลี่ยนสารพันธุกรรมแต่ละเส้นจาก RNA เป็น cDNA โดยขบวนการ reverse transcription แล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนยีนแต่ละเส้นโดยใช้ specific primers ที่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้เต็มความยาวทั้งเส้นจะได้ขนาดของยีนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ในยีนแต่ละเส้นที่เพิ่มจำนวนได้นั้นจะมีตำแหน่ง restriction site ของเอนไซม์ตัดเฉพาะ BsmBI (Bm) และ BsaI (Ba) เพิ่มออกมาที่บริเวณปลาย 5' และปลาย 3' เพื่อใช้สำหรับการโคลนเข้าสู่ vector เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ขนาดยีนทั้ง 8 เส้นของ A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) แสดงดังภาพ 23



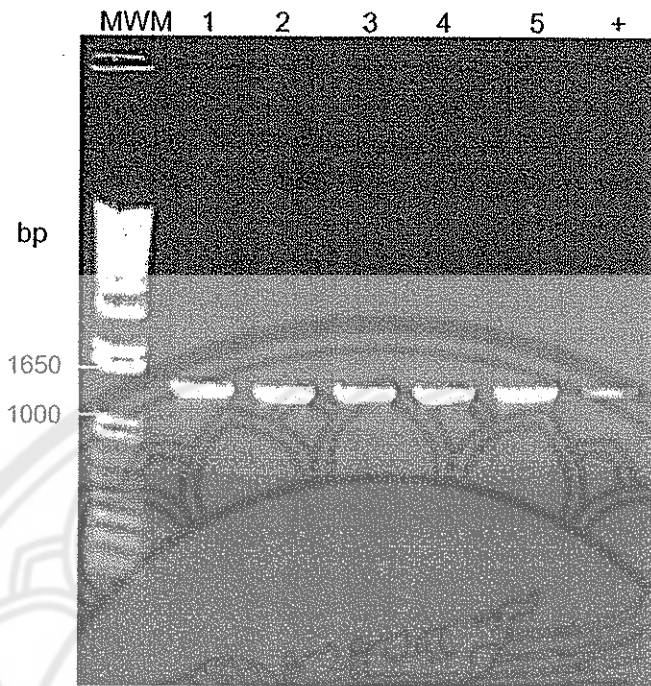
ภาพ 23 แสดงขนาดของยีน PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M และ NS ของ A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1): 1% agarose (Vivantis), 1X TAE buffer, Molecular weight markers (MWM): 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen), 100 Volts เวลา 35 นาที

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการสร้างไวรัสชนิดใหม่ขึ้นในห้องปฏิบัติการจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ ไวรัส influenza A สายพันธุ์ H1N1 ที่ได้รับยีน NA จากไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 โดยวิธีการทาง reverse genetic ดังนั้นจึงได้ทำการเพิ่มปริมาณยีน NA ของไวรัส H5N1 ที่มีขนาดประมาณ 1413 bp โดยใช้ Bm-NA-1/Bm-NA-1413R primer ลักษณะของ PCR product ที่ได้แสดงดังภาพ 24



ภาพ 24 แสดงการทำ gel electrophoresis ยีน NA ของ A/duck/Phitsanulok/NIH6-5-0001/2007 (H5N1): 1% agarose (Vivantis), 1X TAE buffer, 100 Volts เวลา 35 นาที, Molecular weight markers (MWM): GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

หลังจากนำ PCR product ของยีน NA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนและทำให้บริสุทธิ์ ผ่านกระบวนการ digestion ด้วย *BsmBI* restriction enzyme และ ligation โคลนเข้าสู่ pHW2000 vector โดยการทำให้ electroporation หลังการ spread ลงบน LB agar plate ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วคัดเลือกจำนวน 5 โคลนถ่ายเชื้อลงใน LB broth ที่มี 100 µg/ml ampicillin เช่นเดียวกัน นำมาสกัดพลาสมิดทำการตรวจสอบโคลนที่เลือกด้วยการทำ PCR จะทำให้มั่นใจได้ในระดับหนึ่งว่ามียีนที่ต้องการอยู่ใน pHW2000 vector ซึ่งให้ผลแสดงดังภาพ 25



- 5 JUL 2011

ภาพ 25 แสดงผลการทำ gel electrophoresis ของ PCR product จากการโคลนยีน NA ของ A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1): 1% agarose (Vivantis), 1X TAE buffer, 100 Volts เวลา 35 นาที, Lane 1- 5 คือ NA โคลนที่ 1 ถึงโคลนที่ 5, + คือ Positive control (NA ของ H1N1 (A/PR/8/34)), Molecular weight markers (MWM): 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน NA ของไวรัส A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) จากวิธีการทำ sequencing ผ่านการประกอบเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเลือก sequencing primers ในแต่ละเส้นมาประกอบกันโดยโปรแกรม BioEdit พบว่า NA ยีนมีขนาด 1399 นิวคลีโอไทด์ แสดงดังภาพ 26

1 GGAGACCCAA GCTGTTAAG CTAGCAGTTA ACCGGAGTAC TGGTCGACCT
 51 CCGAAGTTGG GGGGGAGCAA AAGCAGGAGT TCAAAATGAA TCCAAATAAG
 101 AAGATAATAA CCATCGGATC AATCTGTATG GTAACCTGGAA TGGTTAGCTT
 151 AATGTTACAA ATTGGGAAC TGTCTCAAT ATGGATCAGT CATTCAATTC
 201 ACACAGGGAA TCAACACAAA GCTGAACCAA TCAGCAATAC TAATTTTCTT
 251 APTGAGAAAAG CTGTGGCTTC AGTAAAATTA GCGGGCAATT CATCTCTTTG
 301 CCCCATTAAAT GGATGGGCTG TATACAGTAA GGACAACAGT ATAAGGATCG
 351 GTTCCAAGGG GGATGTGTTT GTTATAAGAG AGCCATTTCAT CTCATGCTCC
 401 CACTTGGAAT GCAGAACCTT CTTTTTGA CT CAGGGAGCCT TGCTGAATGA
 451 CAAGCACTCC AATGGGACTG TCAAAGACAG AAGCCCTCAC AGAACATTAA
 501 TGAGTTGTCC TGTGGGTGAG GCTCCCTCCC CATATAACTC AAGGTTTGAG
 551 TCTGTTGCTT GGTCAGCAAG TGCTTGCCAT GATGGCACCA GTTGGTTGAC
 601 AATTGGAATT TCTGGCCCAG ACAGTGGGGC TGTGGCTGTA TTGAAATACA
 651 ATGGCATAAT AACAGACACT ATCAAGAGTT GGAGGAATAA CATACTGAGA
 701 ACTCAAGAGT CTGAATGTGC ATGTGTAAT GGCTCTTGCT TTRACTGTAAT
 751 GACTGACGGA CCAAGTAATG GTCAGGCATC ACATAAGATC TTCAAAATGG
 801 AAAAAGGGAA AGTGGTTAAA TCAATCGAAT TGAATGCTCC TAATTATCAC
 851 TATGAGGAAT GCTCTGTTA TCCTGATGCC GGCGAAATCA CATGTGTGTG
 901 CCGGGATAAT TGGCATGGCT CAAATCGGCC ATGGSTATCT TTCAATCAAA
 951 ATTTGGAGTA TCAANTAGGA TATATATGCA GTGGAGTTTT CGGAGACAAT
 1001 CCACGCCCCA ATGATGGAAC AGGTAGTTGT GGTCCGGTGT CCTCTAACGG
 1051 GGCATATGGG GTAAAAGGGT TTTCAATTA ATACGGCAAT GGTGTCTGGA
 1101 TCGGAAGAAC AAAAAGCACT AATCCAGGA GCGGCTTTGA AATGATTTGG
 1151 GATCCAAATG GGTGGACTGA AACGGACAGT AGCTTTTCAG TGAACAAGA
 1201 TATCGTAGCA ATAACCTGATT GGTCAGGATA TAGCGGGAGT TTTGTCCAGC
 1251 ATCCAGAACT GACAGGACTA GATTGCATAA GACCTTGTTC CTGGGTTGAG
 1301 TTGATCAGAG GCGGGCCCAA AGAGAGCACA ATTTGGACTA GTGGGAGGAG
 1351 CATATCITTT TGTGGTGTAA ATAGTGACAC TGTGGGTTGG TCTTGGCCAG
 1401 ACGGTGCTGA GTTGCCATTC ACCATTGACA AGTAGTTTGT TCAAAAAAAC
 1451 TCCTTGTTTC TACTATAAC CCGGCGGCC AAAATGCCGA CTCGGAGCGA
 1501 AAGATATACC TCCCCGGGG CCGGG

ภาพ 26 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NA: อักษรเอียง คือ นิวคลีโอไทด์ที่พบในส่วน
 ของ pHW2000 vector, อักษรขีดเส้นใต้ คือ นิวคลีโอไทด์ที่บริเวณรอยต่อของ
 ยีน NA กับ pHW2000 vector, ตัวอักษรปกติ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน NA

ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PB2, PB1, PA, HA, NP, M, และ NS นั้นแสดงในภาคผนวก ง และ electropherogram ของแต่ละ primer แสดงในภาคผนวก จ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน NA ของ H5N1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน NA ของ H1N1 gij|126599290|gb|EF467823.1| Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34(H1N1)) ที่มีขนาด 1413 นิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม BioEdit พบว่ามีความเหมือนและแตกต่างกันดังภาพ 27

	10	20	30	40	50
NA-H1N1				
NA-H5N1	AGCGAAAGCAGGAGTTTAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAACCATT				
	60	70	80	90	100
NA-H1N1				
NA-H5N1	GGATCAATCTGTCTGGTAGTCGGACTAATTAGCCTAATATTGCAAATAGG				
	110	120	130	140	150
NA-H1N1				
NA-H5N1	GAATATAATCTCAATATGGATTAGCCATTCAATTCAAACCTGGAAGTCAA				
	160	170	180	190	200
NA-H1N1				
NA-H5N1	..A.AG..A.CC.AT..G..T..A..TT..T..TG.G.A.....				
	210	220	230	240	250
NA-H1N1				
NA-H5N1	CTGGGTAAAGGACACAACCTTCAGTGATATTAACCGGCAATTCACTCTTT				
	260	270	280	290	300
NA-H1N1				
NA-H5N1	GTCCCATCCGTTGGGTGGGCTATATACAGCAAAGACAATAGCATAAGAATT				
	310	320	330	340	350
NA-H1N1				
NA-H5N1	GGTTCAAAGGAGACGTTTGTGTCATAAGAGAGCCCTTATTPCATGTTT				
	360	370	380	390	400
NA-H1N1				
NA-H5N1	TCACTTGGAAATGCAGGACCTTTTTCTGACCCAAGGTGCCTTACTGAATG				
	410	420	430	440	450
NA-H1N1				
NA-H5N1	ACAAGCATTCAAGTGGGACTGTTAAGGACAGAAGCCCTTATAGGGCCTTA				
	460	470	480	490	500
NA-H1N1				
NA-H5N1	ATGAGCTGCCCTGTCCGTGAAGCTCCGTCCCGTACAATTCAAGATTGA				
	510	520	530	540	550
NA-H1N1				
NA-H5N1	ATCGGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCATGTCATGATGSCATGGGCTGGCTAA				
	560	570	580	590	600
NA-H1N1				
NA-H5N1	CAATCGGAATTTTCAGGTCCAGATAATGGAGCAGTGGCTGTATTTAAATAC				

ภาพ 27 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NA ของ H5N1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน NA ของ H1N1 gij|126599290|gb|EF467823.1| Influenza A virus : NA-H1N1 คือ (A/Puerto Rico/8/34(H1N1)), NA-H5N1 คือ (A/duck/Phitsanulok/NIH6-5-0001/2007 (H5N1))

```

          610          620          630          640          650
NA-H1N1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NA-H5N1  AACGGCATAATAACTGAAACCATAAAAAGTTGGAGGAAGAAAATATGAG
          660          670          680          690          700
NA-H1N1  GACACAAGAGTCTGAATGTGCCTGTGTAATGGTTCATGTTTTACTATAA
NA-H5N1  A..T.....A.....C..T..C.....G...

          710          720          730          740          750
NA-H1N1  TGACTGATGGCCCGAGTGTATGGGCTGGCCTCGTACAAAATTTTCAGATC
NA-H5N1  .....C..A..A..A...T.A...A..AC.T..G..C.....A..G

          760          770          780          790          800
NA-H1N1  GAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCGATAGAGTTGAATGCACCTAATTCICA
NA-H5N1  .....A.....A..GGT.....AG.C..A.....T.....A...

          810          820          830          840          850
NA-H1N1  CTATGAGGAATGTTCCCTGTTACCCTGATACCGGCAAAGTGTATGTGTGT
NA-H5N1  .....C.....T.....G.....G..A.C.CA.....

          860          870          880          890          900
NA-H1N1  GCAGAGACAATTGGCATGGTTCGAACCGGCATGGGTGTCTTTTCGATCAA
NA-H5N1  ....G..T.....C..A..T.....A.....A.....

          910          920          930          940          950
NA-H1N1  AACCTGGATTATCAATAGGATACATCTGCAGTGGGGTTTTCCGGTGACAA
NA-H5N1  ..TT...G.....T..A.....A.....A.....

          960          970          980          990          1000
NA-H1N1  CCCGGCTCCCGAAGATGGAACAGGCAGGTGTGGTCCAGTGTATGTTGATG
NA-H5N1  T..A..C...A.T.....T..T.....G....CCTC.A.C.

          1010         1020         1030         1040         1050
NA-H1N1  GAGCAAACGGAGTAAAGGGATTTTCATATAGSTATGTTAATGTTGTTGG
NA-H5N1  .G...T.T..G.....A..G.....T..AA..C..C.....C...

          1060         1070         1080         1090         1100
NA-H1N1  ATAGGAAGGACCAAAGTAC-AGTTCAGACATGGGTTTGAGATGATT
NA-H5N1  ..C....A..A.....-...T.A.....GAGC..C.....A.....

          1110         1120         1130         1140         1150
NA-H1N1  GGGATCCTAATGGATGGACAGAGACTGATAGTAAGTTCTCTGTGAGGCAA
NA-H5N1  .....A.....G.....T..A..G..C....GC..T..A....AA...

          1160         1170         1180         1190         1200
NA-H1N1  GATGTTGTGGCAATGACTGATTGGTCAGGGTATAGCGGAAGTTTCGTICA
NA-H5N1  ...A.C..A.....A.....A.....A.....G.....T..C...

          1210         1220         1230         1240         1250

```

ภาพ 27 (ต่อ)


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NA-H1N1 ACATCCTGAGCTGACAGGGCTAGACTGTATGAGGCCSTGCTTCTGGTTG
NA-H5N1 G.....A..A.....A.....T..C..A..A..T..T.....

          1260      1270      1280      1290      1300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NA-H1N1 AATTAATCAGGGGACGACCTAAAGAAAAACAATCTGGACTAGTSCGAGC
NA-H5N1 .G..G.....A..G..G..C.....G..GC.....T.....G....

          1310      1320      1330      1340      1350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NA-H1N1 AGCATTCTTTTTGTGGCGTGAATAGTGATACTGTAGATTGGTCTTGGCC
NA-H5N1 .....A.....T..A.....C.....G..G.....

          1360      1370      1380      1390      1400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NA-H1N1 AGACGGTGTGAGTTGCCATTACGATTGACAAGTAGTCTGTTCAAAAAA
NA-H5N1 .....C.....T.....

          1410
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NA-H1N1 -CTCCTTGTTTCTACT
NA-H5N1 A.....

```

ภาพ 27 (ต่อ)

เมื่อนำลำดับ amino acid ของทั้ง H1N1 ที่ประกอบด้วย 454 amino acid และ H5N1 ที่ประกอบด้วย 449 amino acid มาทำการศึกษเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างกัน แสดงผล ภาพ 28

```

          10          20          30          40          50
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  MNPNQKIITIGSICLVVGLISLILQIGNIISIWISHSIQTGSQNHTGICN
H5N1  ....K.....M.T.MV..M.....L.....H..N.-.KAEP-
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90         100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  QNIITYKNSTWVKDTTSVILTGNSSLCPIRGWAIYSKDNSIRIGSKGDVF
H5N1  ---.SNT.FLIE.AVA..K.A.....N..V.....
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  VIREPFTSCSHLECRTFFELTQGALLNDKHSSGTVKDRSPYRALMSPVGE
H5N1  .....N.....H.T.....
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  APSPYNSRFESVAWSASACHDGMGWLTTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITET
H5N1  .....TS.....S.....D.
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  IKSWRKKILRTQESECAVNGSCFTIMTDGSPDGLASYKIFKIEKGVTK
H5N1  ....NN.....V.....N.Q..H...M...V.
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260         270         280         290         300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  SIELNAPNSHYEECSYCPDTGKVMCVCERDNWHGSNRPWVSFDQNLBYQIG
H5N1  .V.....Y.....A.EIT.....N..E...
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310         320         330         340         350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  YICSGVFGDNERPEDGTGSCGPVYVDGANGVKGFSYRYGNGVWIGRTKSH
H5N1  .....N.....SSN..Y.....FK.....T
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360         370         380         390         400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  SSRHGFEMIWDPNGWTTETDSKFSVRQDVVAMTDWMSGYSGSPVQHPELTGL
H5N1  N..S.....S...K..I..I.....
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          410         420         430         440         450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  DCMRPCFWVELIRGRPKEKTIWTSASSISFCGVNSDTVDSWSPDGAELPF
H5N1  ..I.....S.....G.....G.....
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          460         470         480         490         500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
H1N1  SIDK
H5N1  T...

```

ภาพ 28 แสดงลำดับกรดอะมิโนของยีน NA ของ A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนยีน NA ของ A/Puerto Rico/8/34(H1N1); g|126599290|gb|EF467823.1| Influenza A virus

เมื่อนำลำดับ amino acid ในยีน NA ของไวรัส A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) กับ
ไวรัส A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) มาทำการศึกษาเปรียบเทียบความ
เหมือนและแตกต่างกัน แสดงผลดังภาพ 29

```

          10          20          30          40
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        MNPNQKIITIGSICMVVGIISLMLQIGNIISIWVSHSIQT
          .....K.....T.MV.....L.....I.....H.

          50          60          70          80
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        GNQHQAEPNCQSIITYENNTWVNQTYVNI SNTNFLTEKAV
          .....K.....I.....

          90          100         110         120
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        ASVILAGNSSLCPI SGWAVH SKDNGIRIGSKGDV FVIREP
          .....K.....N.....Y.....S.....

          130         140         150         160
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        FISCSHLECR TFFLTQ GALLNDKHSNGTVKDRSPHRTLMS
          .....

          170         180         190         200
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        CPVGEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGT SWLTIGISGPDN
          .....S.....

          210         220         230         240
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        GAVAVLKYNGLIITDTIKSWRNNILRTQESE CACVNGSCFT
          .....

          250         260         270         280
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        VMTDGPSNGQASYKIFKMEK GKVVKSVELNAPNYHYE ECS
          .....H.....

          290         300         310         320
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        CYPDAGEITCVCRDNWHG SNRPWVSFNQNLEYQIGYICSG
          .....

          330         340         350         360
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        VFGDNPRENDGTGSCGPVSPNGAYGVKGF SFKYGNVWIG
          .....S.....

          370         380         390         400
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        RTKSTNSRSGFEMIWDPNGWGT DSSFSVKQDIVAITDWS
          .....E.....

          410         420         430         440
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        GYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPK ESTIWTSG
          .....

          450         460
Gs/GD/1/96  .....|.....|.....|.....|
H5N1        SSISFCGVNSDTVGSWPD DAELPFTIDK
          .....G.....

```

ภาพ 29 แสดงลำดับกรดอะมิโนของยีน NA ของไวรัส A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1):

Gs/GD/1/96 กับไวรัส A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) : H5N1

เมื่อนำลำดับ amino acid ในยีน HA ของ Influenza A virus (A/chicken/Thailand/CH-2/2004(H5N1)) กับไวรัส A/duck/Phitsanulok/NAH6-5-0001/2007 (H5N1) มาทำการศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างกัน แสดงผลดังภาพ 30

```

          10          20          30          40
HSN1-AY649382  DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGK
HSN1

          50          60          70          80
HSN1-AY649382  LCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCFEFINVPEWSYIV
HSN1

          90         100         110         120
HSN1-AY649382  EKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHELLSRINHFEEKIQIIPKS
HSN1

          130        140        150        160
HSN1-AY649382  SWSSHEASLGVSSACPYQKSSFFERNVWLIKKNSTYPTI
HSN1                                     X

          170        180        190        200
HSN1-AY649382  KRSYNNTNQEDLLVLGGIHHFNDAAEQTKLYQNPITYISV
HSN1                                     W

          210        220        230        240
HSN1-AY649382  GTSTLNQRLVPRITRSKVNQGSGRMEFEWTKLKNPDAIN
HSN1

          250        260        270        280
HSN1-AY649382  FESNGNFIAPYAYKIVKKGDSITMKSELEYGNQNTKQQT
HSN1

          290        300        310        320
HSN1-AY649382  PMGAINSSMPFFHNIRPLTIGECPKYVKSNRLLVATGLRNS
HSN1

          330        340        350        360
HSN1-AY649382  PQRERRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQ
HSN1

          370        380        390        400
HSN1-AY649382  GSGYAADKESTQKALDGVTNKVNSTIDKMNTQFEAVGREF
HSN1

          410        420        430        440
HSN1-AY649382  NNLERRIENLNKKMEDGFLDVWWTYNAELLVLMENERTLDE
HSN1                                     X

          450        460        470        480
HSN1-AY649382  HDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECME
HSN1

```

ภาพ 30 แสดงลำดับกรดอะมิโนของยีน NA ของไวรัส A/chicken/Thailand/CH-2/2004 (H5N1): H5N1-AY649382 กับไวรัส A/duck/Phitsanulok/NAH6-5-0001/2007 (H5N1): H5N1, เครื่องหมายสี่เหลี่ยม คือ ตำแหน่ง N-linked glycosylation site ที่เพิ่มมา 1 ตำแหน่งในบริเวณของ HA1

```

          490      500      510      520
H5N1-AY649382 .....|.....|.....|.....|.....|.....|
H5N1          SVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIY
          .....R.....

          530      540      550
H5N1-AY649382 .....|.....|.....|.....|.....|.....|
H5N1          STVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI*
          .....-.....

```

ภาพ 30 (ต่อ)

หลังจากที่ได้ตรวจสอบ recombinant plasmid ที่มียีน NA ของไวรัสสายพันธุ์ H5N1 ว่า ถูกต้องจากลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดทั้งยีน NA ของ H5N1 และยีนทั้ง 8 เส้นของ H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) เพื่อสำหรับใช้ในการทำ transfection ผลการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดแสดงดังตาราง 6

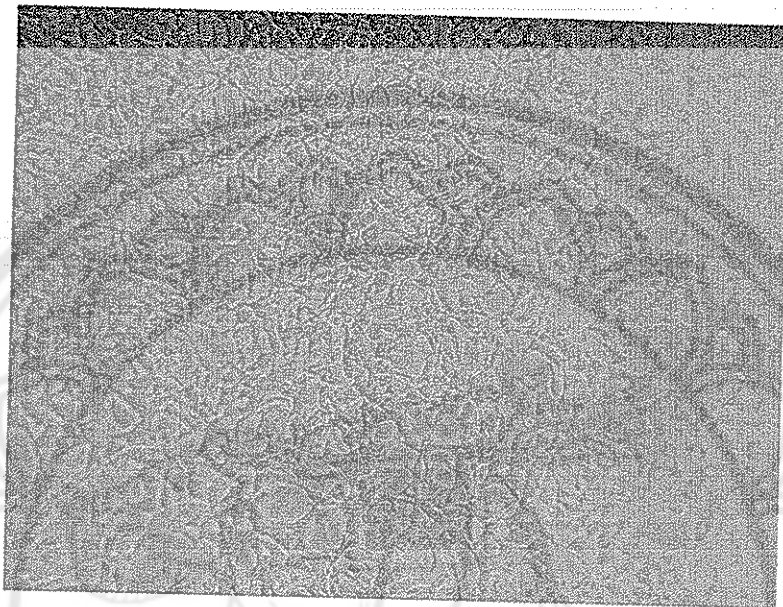
ตาราง 6 แสดงความเข้มข้นของ H1N1 และ H5N1 plasmid

Insert gene	O.D. at 260 nm	Conc. (µg/ml)
PB1	0.070	350.0
PB2	0.041	205.0
PA	0.059	295.0
HA	0.060	300.0
NP	0.055	275.0
NA	0.047	235.0
M	0.086	430.0
NS	0.072	360.0
NA (H5N1)	0.080	400.0

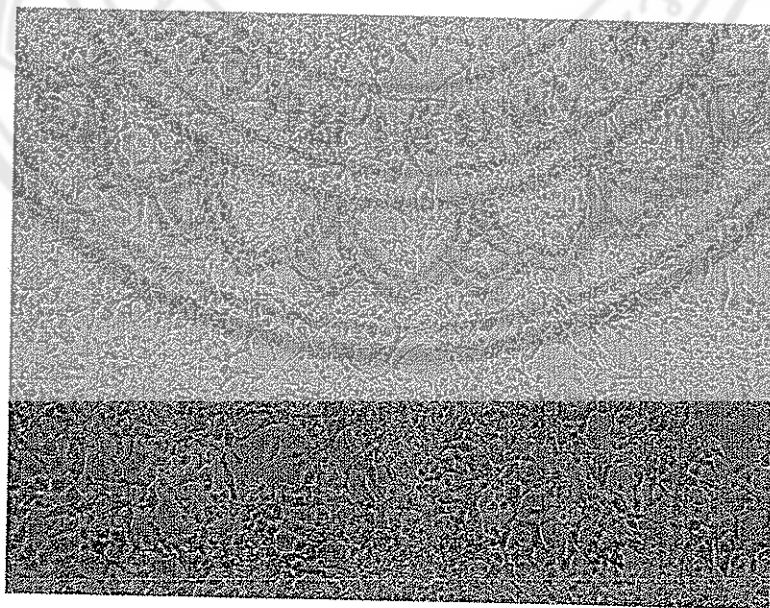
หมายเหตุ: ความเจือจาง เป็น 1:100

การทำ transfection ในการศึกษาครั้งนี้ทำเป็น duplicate หรือ 1 ตัวอย่าง ทำ 2 ซ้ำ กล่าวคือ positive control เป็นการสร้างไวรัส H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) โดยการใส่ยีนทั้ง 8 เส้นของ PR 8 เข้าไปในปฏิกิริยา, negative control ไม่มีการเติมยีน NA ดังนั้นในปฏิกิริยาจะมีเพียง 7 ยีนเท่านั้น ส่วน

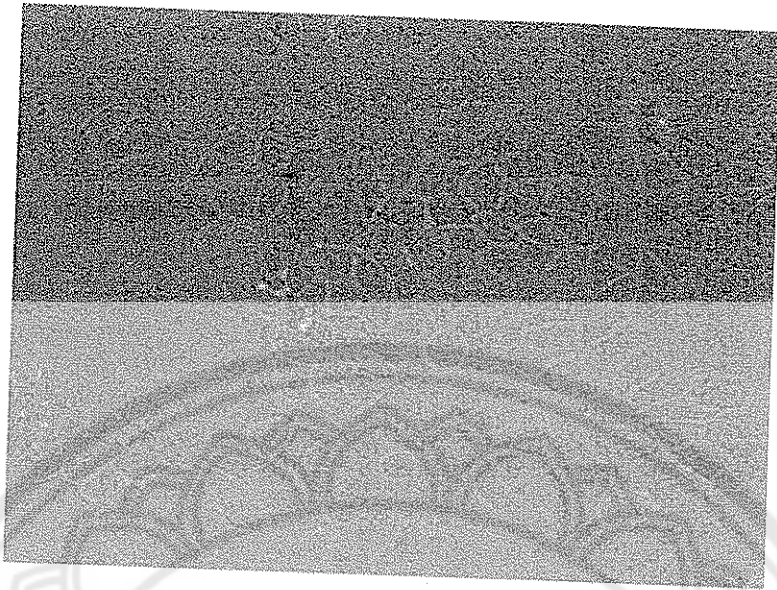
reverse genetic virus หรือ H1N1-NA-H5N1 คือ ใส่ยีน NA ของ H5N1 และยีนที่เหลืออีก 7 เส้น คือ PB2, PB1, PA, HA, NP, M, และ NS เป็นของ PR 8 หลังการทำ transfection พบลักษณะที่เปลี่ยนแปลงบนเซลล์ 293H และ MDCK ดังภาพ 31 ถึง 33



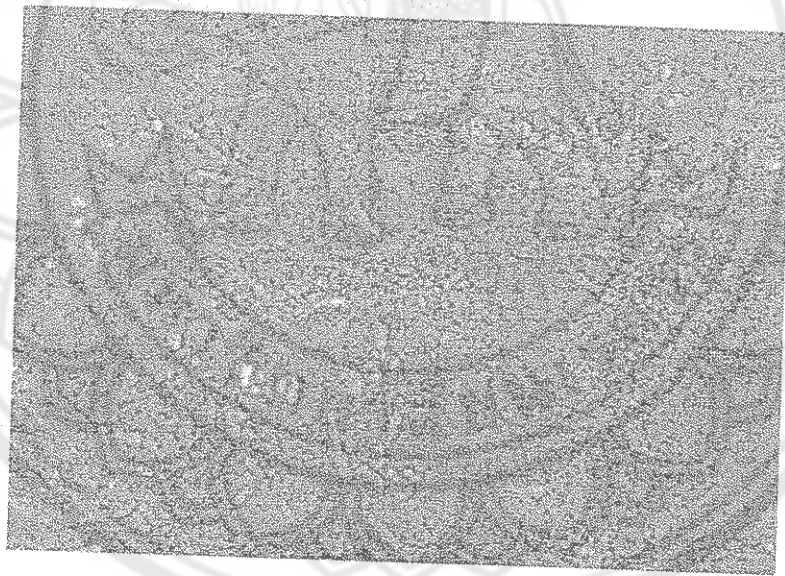
ภาพ 31 แสดงลักษณะ normal 293H cell ภายใต้กล้อง inverted microscope กำลังขยาย 100 เท่า (OLYMPUS)



ภาพ 32 แสดงลักษณะ cytopathogenic effect (CPE) ของ 293H cell ภายใต้กล้อง inverted microscope กำลังขยาย 100 เท่า (OLYMPUS)



ภาพ 33 แสดง normal MDCK cell ภายใต้กล้อง inverted microscope
กำลังขยาย 100 เท่า (OLYMPUS)



ภาพ 34 แสดงลักษณะ cytopathogenic effect (CPE) ของ MDCK cell ภายใต้
กล้อง inverted microscope กำลังขยาย 100 เท่า (OLYMPUS)

เมื่อนำ supernatant ของ MDCK cell มาฉีดเพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟักและนำ
allantoic fluid มาทดสอบ HA test ได้ผลการศึกษาดังตาราง 7

ตาราง 7 ผลการศึกษา HA test จากการทำ transfection

Transfection virus	experiment 1	experiment 2	—
H1N1-NA-H5N1	+	+	—
positive control	+	+	—
negative control	-	-	—

หมายเหตุ: + คือ HA positive

- คือ HA negative

หลังจากได้ไวรัสตามที่ต้องการแล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักเพื่อให้ได้ไวรัสปริมาณมากพอสำหรับการศึกษาขั้นต่อไป คือ สำหรับทดสอบ EID_{50} , ทำ NA assay และ plaque assay โดยเก็บไวรัสประมาณ 50 ml และทดสอบ HA titer ของไวรัสแต่ละชนิด คือ H5N1, H1N1 และ reverse genetic virus พบมีค่าเป็น log 6, log 10 และ log 9 HA titer ตามลำดับ จากนั้นแบ่งเก็บ (aliquot) ตัวอย่างไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ $-80^{\circ}C$ สำหรับทดสอบต่อไป

การตรวจหาคุณสมบัติความแรงในการติดเชื้อของไวรัส

การตรวจหาคุณสมบัติความแรงในการติดเชื้อ (potency) ของไวรัสในการศึกษานี้ใช้วิธีการฉีดเชื้อไวรัสเข้าไข่ไก่ฟักหรือการหาค่า EID_{50} ซึ่งเป็นการหาค่าความเจือจางของสารละลายไวรัสที่ทำให้ไข่ไก่ฟักติดเชื้อได้ร้อยละ 50 โดยศึกษาทั้งไวรัส A/duck/Phitsanulok/NAH6-5-0001/2007 (H5N1), H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) และ reverse genetic virus ได้ผลดังตาราง 8 ถึง 10

ตาราง 8 ผลการทำ EID₅₀ ของไวรัส A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1)

Dilution of inoculum	Number of eggs infected				
	1	2	3	4	5
10 ⁻¹	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	+	+	+	+
10 ⁻⁷	+	+	+	+	+
10 ⁻⁸	+	+	+	+	+
10 ⁻⁹	-	+	-	-	-
10 ⁻¹⁰	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + คือ HA positive

- คือ HA negative

ตาราง 9 ผลการทำ EID₅₀ ของไวรัส H1N1

Dilution of inoculum	Number of eggs infected				
	1	2	3	4	5
10 ⁻¹	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	+	+	+	+
10 ⁻⁷	+	+	+	+	+
10 ⁻⁸	-	-	+	-	-
10 ⁻⁹	-	-	-	-	-
10 ⁻¹⁰	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + คือ HA positive

- คือ HA negative

ตาราง 10 ผลการทำ EID₅₀ ของไวรัส H1N1 (NA-H5N1)

Dilution of inoculum	Number of eggs infected				
	1	2	3	4	5
10 ⁻¹	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	+	+	+	+
10 ⁻⁷	-	+	+	-	+
10 ⁻⁸	-	-	-	-	-
10 ⁻⁹	-	-	-	-	-
10 ⁻¹⁰	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + คือ HA positive

- คือ HA negative

จากการคำนวณ EID₅₀ โดยวิธี Reed and Muench mathematical technique (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก จ ข้อมูลดิบ) พบว่าไวรัส H5N1, H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 มีค่า infectivity titer ของ virus suspension ปริมาตร 1 ml เป็น 10^{9.52}, 10^{8.625} และ 10^{8.16} EID₅₀/ml ตามลำดับ นั่นคือปริมาณความเข้มข้นของไวรัสใน allantoic fluid สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

การเปรียบเทียบ NA activity ของ influenza virus แต่ละสายพันธุ์

การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity ของไวรัสแต่ละชนิด สามารถศึกษาได้จาก dose response curve ดังนี้

ตาราง 11 แสดงผลการศึกษา NA assay ของไวรัส H1N1

Virus dilution	O.D. at 549 nm			\bar{x}	SD
	1	2	3		
1:1	2.512	2.459	2.511	2.491	±0.028
1:2	2.434	2.464	2.433	2.455	±0.018
1:4	2.231	2.335	2.231	2.283	±0.052
1:8	1.572	1.619	1.572	1.592	±0.024
1:16	0.657	0.642	0.656	0.676	±0.047
1:32	0.152	0.178	0.151	0.165	±0.082
1:64	0.038	0.043	0.045	0.042	±0.004

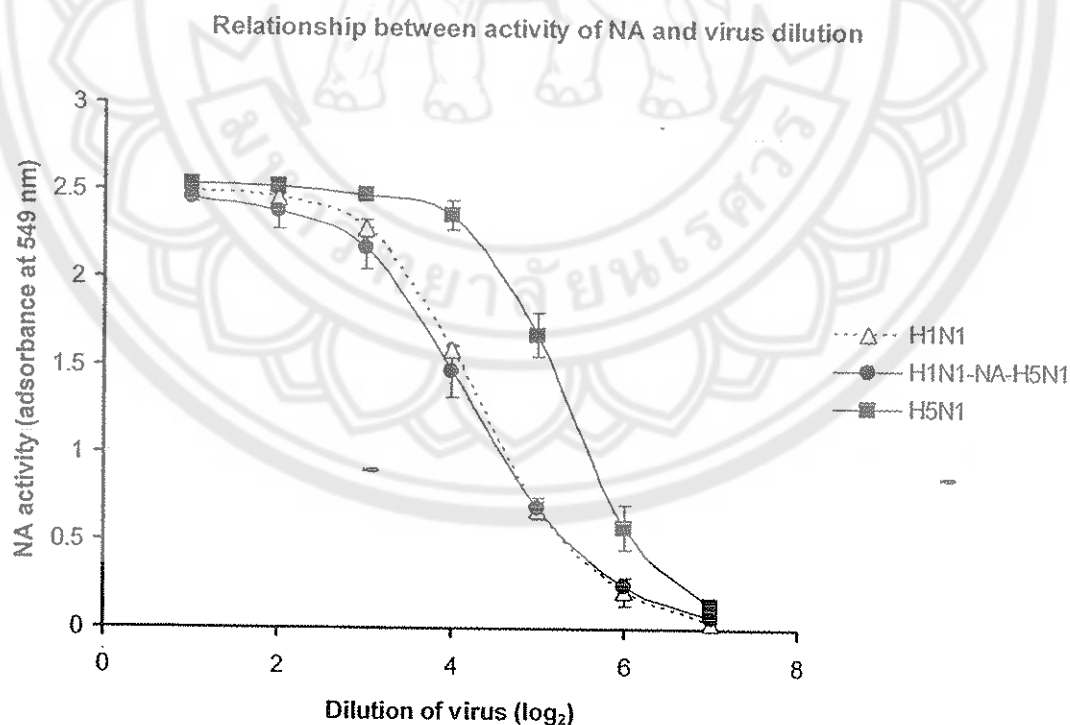
ตาราง 12 แสดงผลการศึกษา NA assay ของไวรัส H5N1

Virus dilution	O.D. at 549 nm			\bar{x}	SD
	1	2	3		
1:1	2.526	2.535	2.528	2.529	±0.004
1:2	2.504	2.515	2.538	2.519	±0.017
1:4	2.458	2.460	2.513	2.477	±0.031
1:8	2.348	2.287	2.452	2.362	±0.083
1:16	1.610	1.598	1.824	1.677	±0.126
1:32	0.480	0.532	0.720	0.577	±0.126
1:64	0.083	0.169	0.152	0.134	±0.045

ตาราง 13 แสดงผลการศึกษา NA assay ของไวรัส H1N1-NA-H5N1

Virus dilution	O.D. at 549 nm			\bar{x}	SD
	1	2	3		
1:1	2.462	2.428	2.476	2.455	±0.024
1:2	2.258	2.430	2.449	2.379	±0.104
1:4	2.048	2.183	2.282	2.171	±0.117
1:8	1.298	1.517	1.574	1.463	±0.145
1:16	0.624	0.681	0.740	0.681	±0.057
1:32	0.226	0.254	0.241	0.240	±0.014
1:64	0.059	0.064	0.063	0.062	±0.002

จากผลการศึกษาข้างต้นเมื่อนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity ที่วัดได้ในรูปของค่าการดูดกลืนแสงแสดงดังภาพ 35 และ 4.13

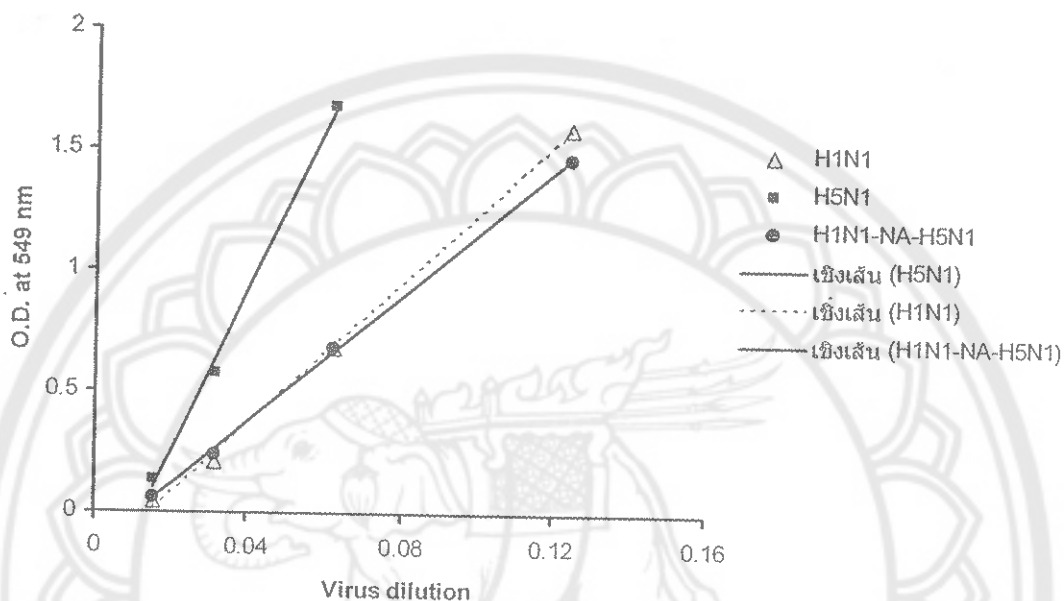


ภาพ 35 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity

การศึกษา NA activity ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ที่แสดง 1 Unit NA activity จากข้อมูลการทำ dose response curve ข้างต้น เมื่อนำค่า O.D. ในช่วงที่มีการเพิ่มขึ้นของ NA activity

อย่างชัดเจนมาหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity จะได้สมการเส้นตรงดังภาพ 36

Dose respond curve of NA activity



ภาพ 36 แสดงกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity

จากกราฟจะได้สมการเชิงเส้นของไวรัส H1N1, H5N1 และ H1N1-NA-H5N1 ดังนี้ $y=14.363x-0.2108$ ($R^2=0.9989$), $y=16.621x-0.4153$ ($R^2=0.9974$), และ $y=12.905x-0.1442$ ($R^2=0.9993$) ตามลำดับ และเมื่อกำหนดให้ค่า y หรือค่า O.D. เป็น 0.5 เพื่อเป็นตัวกำหนดปริมาณไวรัสเริ่มต้นที่ทำให้ NA activity มีค่า O.D. เป็น 0.5 โดยทำการเจือจางไวรัสและนำมาทดสอบ activity ของเอนไซม์อีกครั้งเพื่อยืนยันว่าความเจือจางของไวรัสที่กำหนดนั้นให้ค่า NA activity เป็น 0.5 จริง ซึ่งแสดงผลการทดสอบดังนี้

ตาราง 14 แสดงผลการศึกษา NA assay จากการกำหนดค่า O.D. เป็น 0.5 ของ
ไวรัส H1N1

Experiment	O.D. at 549 nm		\bar{x}	SD
	1	2		
1	0.349	0.396	0.372	±0.033
2	0.584	0.513	0.548	±0.050
3	0.459	0.537	0.498	±0.055

ตาราง 15 แสดงผลการศึกษา NA assay จากการกำหนดค่า O.D. เป็น 0.5 ของ
ไวรัส H5N1

Experiment	O.D. at 549 nm		\bar{x}	SD
	1	2		
1	0.530	0.553	0.542	±0.016
2	0.460	0.516	0.488	±0.039
3	0.447	0.407	0.427	±0.028

ตาราง 16 แสดงผลการศึกษา NA assay จากการกำหนดค่า O.D. เป็น 0.5 ของ
ไวรัส H1N1-NA-H5N1

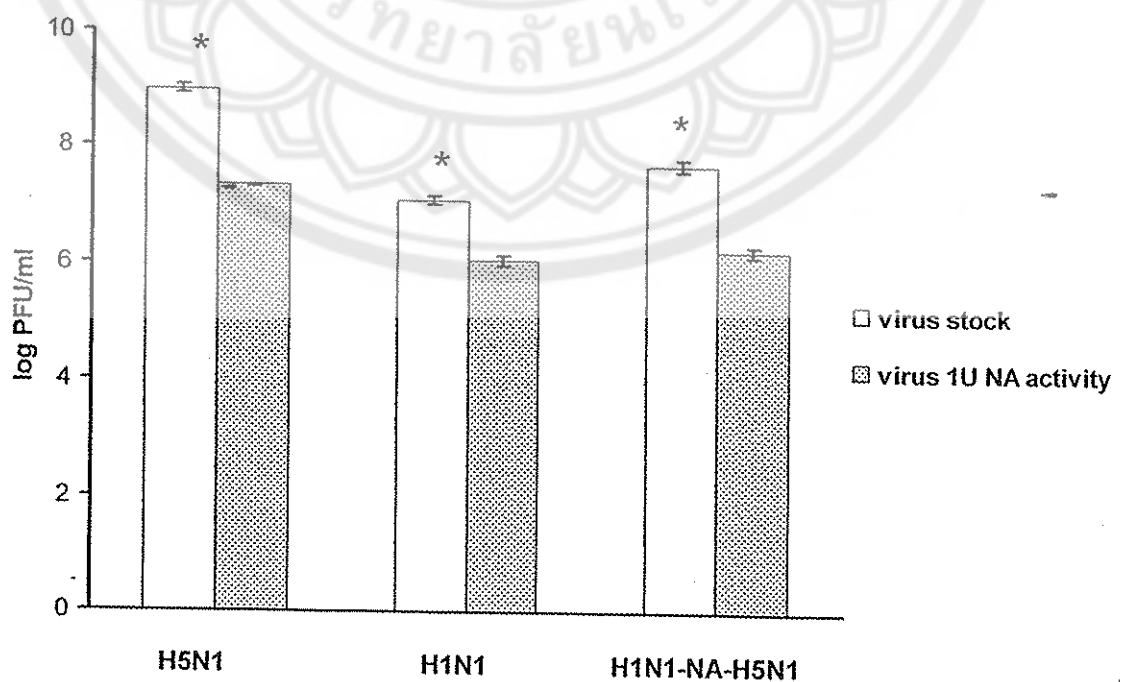
Experiment	O.D. at 549 nm		\bar{x}	SD
	1	2		
1	0.485	0.486	0.486	±0.000
2	0.435	0.432	0.434	±0.002
3	0.394	0.403	0.399	±0.006

การหาปริมาณไวรัสโดยการทำ plaque assay

การทำ plaque assay ได้ใช้ในการหาปริมาณไวรัสเริ่มต้นและปริมาณไวรัสที่ทำให้ NA activity มีค่า NA activity เป็น 1 Unit enzyme โดยไวรัส 1 ตัวอย่างจะทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาผลเฉลี่ย ผลการศึกษาแสดงดังตาราง 24

ตาราง 17 แสดงผลการทำ plaque assay ของปริมาณไวรัสเริ่มต้นและปริมาณไวรัสที่ทำให้ NA activity มีค่าเป็น 1 unit

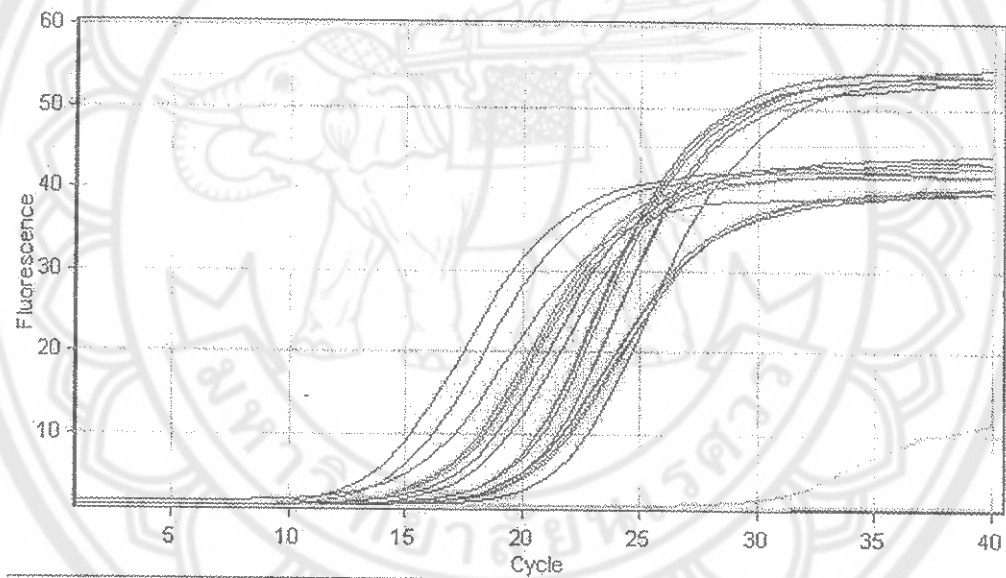
virus	Number of plaque			\bar{x}	SD	PFU/ml
	1	2	3			
H5N1-stock	14	13	10	12.33	±2.081	9.86×10^8
H5N1-1U NA	27	26	27	26.67	±0.577	2.13×10^7
H1N1-stock	13	18	15	15.33	±2.517	1.23×10^7
H1N1-1U NA	12	18	13	14.33	±3.215	1.15×10^6
H1N1-NA-H5N1-stock	6	5	8	6.33	±1.528	5.06×10^7
H1N1-NA-H5N1-1U NA	17	25	21	21	±4.000	1.68×10^6



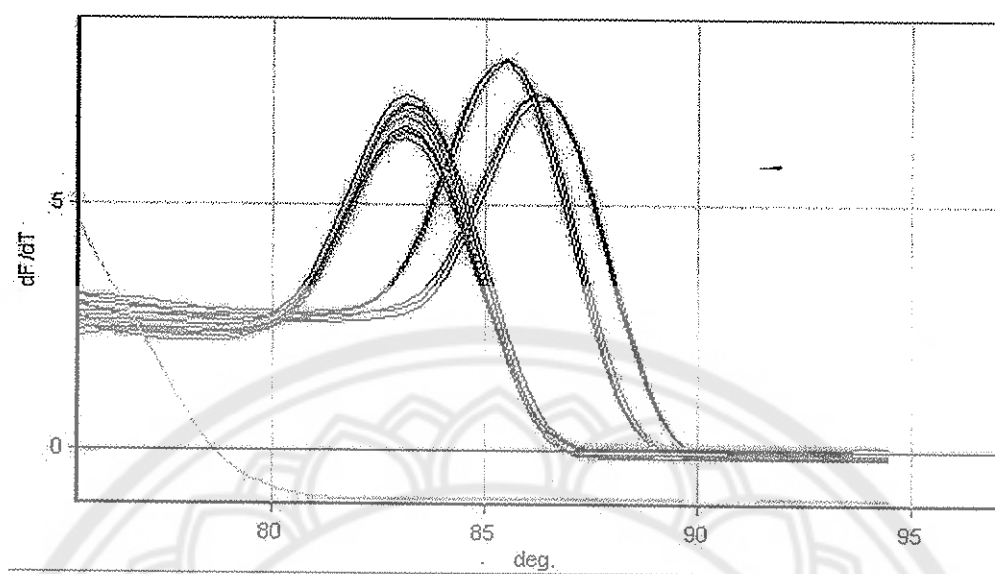
ภาพ 37 แสดงปริมาณไวรัสเริ่มต้นและปริมาณไวรัสที่ให้ค่า 1U NA activity
จากการทำ plaque assay

ผลการศึกษา one-step real-time PCR

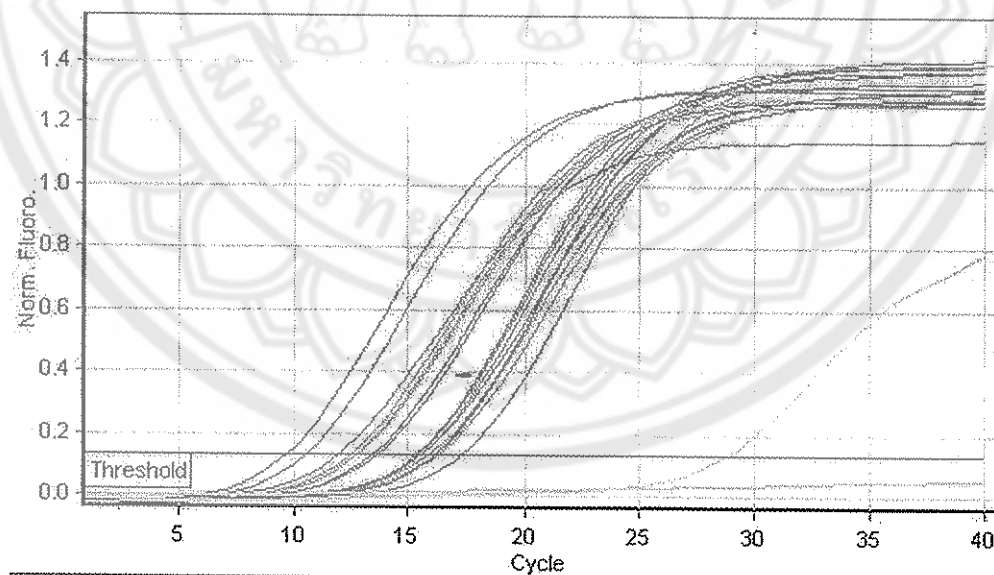
ในการศึกษาปริมาณเชื้อไวรัสด้วย one-step real-time PCR นั้นได้นำ diluted viral solution ทั้ง 3 ซ้ำ ที่ผ่านการทำ plaque assay มาสกัด RNA เพื่อใช้เป็น template แสดงผลการศึกษาดังภาพ 38



ภาพ 38 แสดง amplification curve ของ M gene influenza A virus-one-step
real-time PCR



ภาพ 39 แสดง raw data ของ denature threshold ของ M gene influenza A virus one-step real-time PCR



ภาพ 40 แสดงการตัด Threshold ที่ 0.1315 ของ M gene influenza A virus one-step real-time PCR

ตาราง 18 แสดงค่า Melting temperature และ Cycle Threshold (Ct)

Color	Name	Melting temperature			Ct
		Peak 1	Peak 2	Peak 3	
■	H5N1-stock -1	79.0	85.5	-	15.58
■	H5N1-stock -2	85.5	-	-	15.36
■	H5N1-stock -3	85.5	-	-	15.40
■	H5N1-NA 1 U-1	86.2	90.8	-	17.33
■	H5N1- NA 1 U-2	80.5	86.3	-	16.16
■	H5N1- NA 1 U-3	86.3	-	-	16.11
■	H1N1-stock -1	83.2	-	-	9.67
■	H1N1-stock -2	83.2	-	-	10.49
■	H1N1-stock -3	77.3	83.0	91.3	11.92

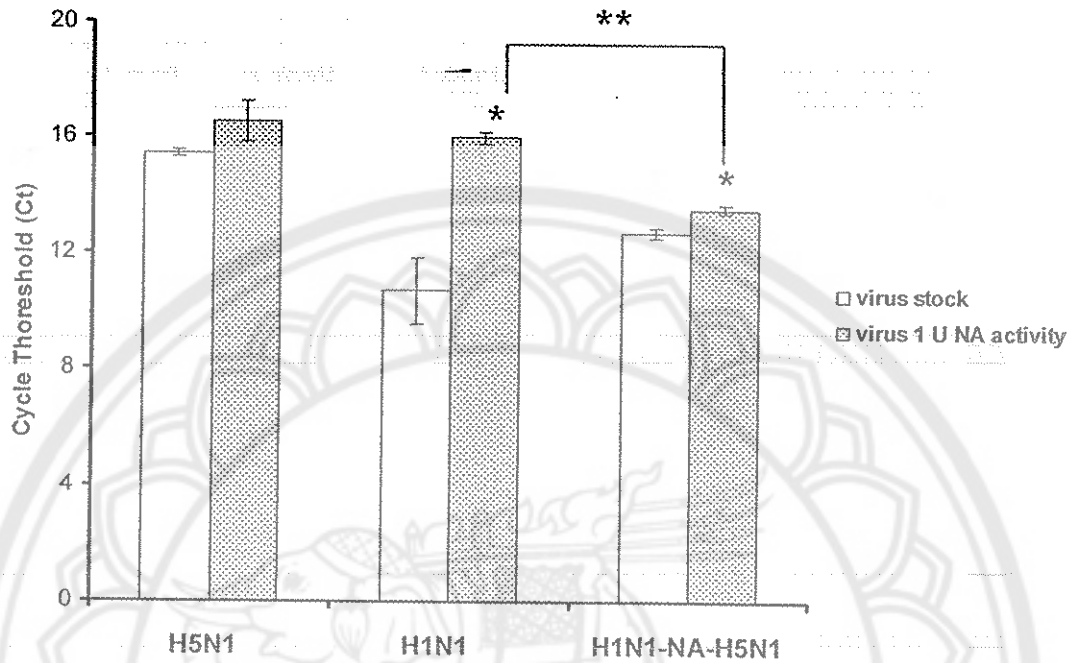
ตาราง 18 (ต่อ)

Color	Name	Melting temperature			Ct
		Peak 1	Peak 2	Peak 3	
■	H1N1- NA 1 U-1	83.2	-	-	15.86
■	H1N1- NA 1 U-2	83.2	-	-	16.25
■	H1N1- NA 1 U-3	83.2	-	-	15.89
■	H1N1-NA-H5N1-stock -1	83.2	88.8	91.5	12.80
■	H1N1-NA-H5N1-stock -2	83.2	-	-	12.74
■	H1N1-NA-H5N1-stock -3	83.2	-	-	12.48
■	H1N1-NA-H5N1- NA 1 U-1	83.2	-	-	13.63
■	H1N1-NA-H5N1- NA 1 U-2	76.5	83.3	88.8	13.44
■	H1N1-NA-H5N1- NA 1 U-3	77.0	83.2	88.5	15.56
■	control-H5-primer	-	-	-	28.79
■	control-H1-primer	81.2	88.2	-	-

ตาราง 19 แสดงค่า Ct จากการศึกษานาน one-step real-time PCR

virus	Cycle Threshold (Ct)			\bar{x}	SD
	1	2	3		
H5N1-stock	15.58	15.36	15.40	15.45	±0.117
H5N1- 1U NA	17.33	16.16	16.11	16.53	±0.690
H1N1-stock	9.67	10.49	11.92	10.69	±1.139
H1N1- 1U NA	15.86	16.25	15.89	16.00	±0.217
H1N1-NA-H5N1-stock	12.80	12.74	12.48	12.67	±0.170
H1N1-NA-H5N1- 1U NA	13.63	13.44	15.56*	13.54	±0.134

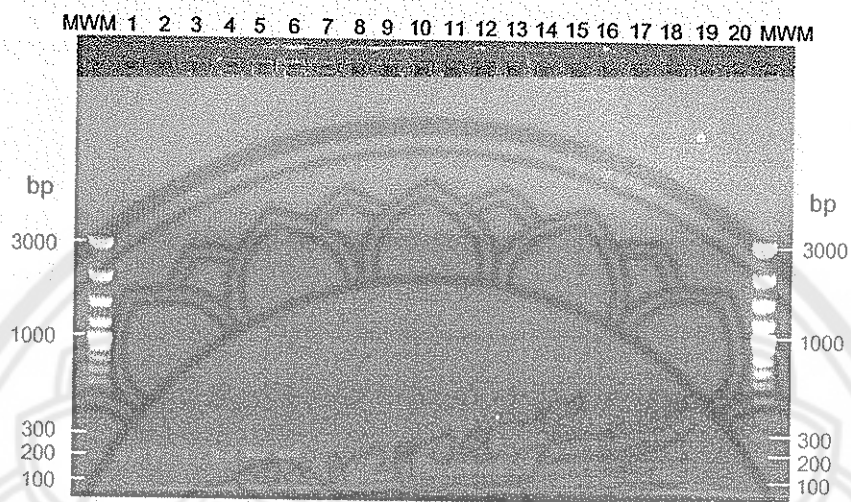
หมายเหตุ: * ไม่นำมาวิเคราะห์



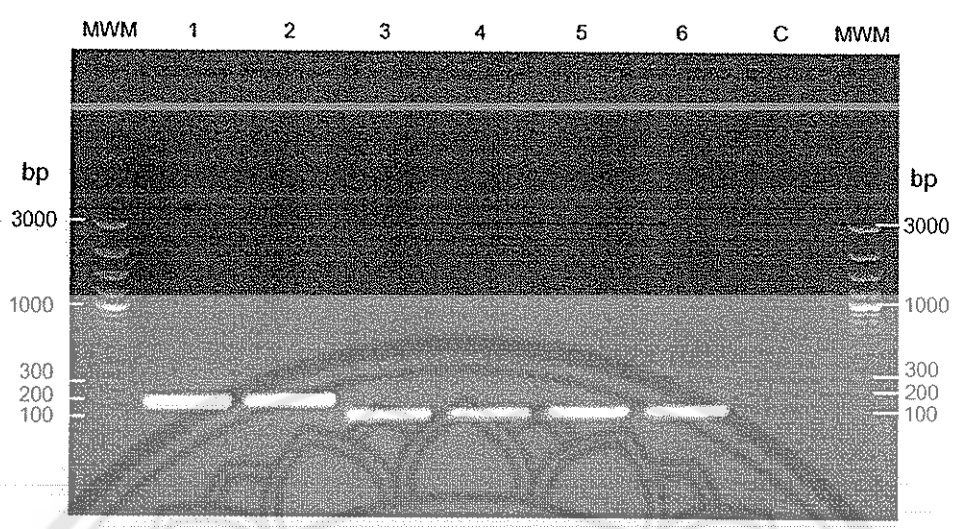
ภาพ 41 แสดงค่า Ct จากการทำ one-step real-time PCR ของไวรัสเริ่มต้นและไวรัสที่ให้ค่า 1U NA activity

ภายหลังการทำ one-step real-time PCR พบว่าจากภาพ 38 ซึ่งแสดง amplification curve ของ M gene influenza A virus นั้น ในส่วนของ negative control H5-primer มี fluorescence signal เกิดขึ้นในช่วง cycle ที่ 30 เป็นต้นไป แต่สำหรับ negative control H1-primer นั้นไม่พบลักษณะดังกล่าวและเมื่อดูจากภาพ 39 ซึ่งแสดง raw data ของ denature threshold ของ M gene นั้นพบว่า negative control H5-primer เป็นลักษณะของ primer dimer และจากภาพเดียวกันพบว่ายีน M ไวรัส H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 นั้นมีค่า melting temperature (T_m) เป็น 83.2°C ส่วนยีน M ของไวรัส H5N1 เริ่มต้นนั้นมีค่า T_m เป็น 85.5°C ส่วนยีน M ของไวรัส H5N1 ที่แสดงค่า 1 unit NA activity นั้นมีค่า T_m เป็น 86.3°C ซึ่งมีความแตกต่างกัน และเมื่อนำ one-step real-time PCR product มาทำ gel electrophoresis พบว่ายีน M ของไวรัส H5N1 มีขนาด 189 bp ส่วนไวรัส H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 มีขนาด 101 bp ส่วน negative control ของ primer ทั้ง 2 ชนิดนั้นไม่มี product เกิดขึ้น (ภาพ 42) ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่า real time PCR product ที่ได้จากการศึกษานั้นเป็นการตรวจหายีน M ของไวรัสจริง จึงได้นำ RNA ที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์มาเพิ่มจำนวนยีนโดยวิธี one-

step real-time RT-PCR และนำมาตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมด้วยการ sequencing โดยเลือกสายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง (ภาพ 43)



ภาพ 42 แสดงผลการทำ gel electrophoresis จากการทำ one-step real-time PCR ของ influenza A virus: 0.8% agarose (Vivantis), 1X TAE buffer, 85 Volts เวลา 50 นาที, Molecular weight markers (MWM): GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas), lane 1 ถึง 3 คือ H5N1-stock, lane 4 ถึง 6 คือ H5N1-O.D. เป็น 0.5, lane 7 ถึง 9 คือ H1N1-stock, lane 10 ถึง 12 คือ H1N1- O.D. เป็น 0.5, lane 13 ถึง 15 คือ H1N1-NA-H5N1-stock, lane 16 ถึง 18 คือ H1N1-NA-H5N1- O.D. เป็น 0.5, lane 19 คือ control H5 primer และ lane 20 คือ control H5 primer



ภาพ 43 แสดงผลการทำ gel electrophoresis ของยีน M จากการทำ one-step RT-PCR ใน influenza A virus เพื่อการทำ sequencing: 0.8% agarose (Vivantis), 1X TAE buffer, 85 Volts เวลา 40 นาที, Molecular weight markers (MWM): GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas), lane 1 คือ H5N1-stock-1, lane 2 คือ H5N1-O.D. at 0.5-1, lane 3 คือ H1N1-stock-1, lane 4 คือ H1N1-O.D. at 0.5-1, lane 5 คือ H1N1-NA-H5N1-stock-1, lane 6 คือ H1N1-NA-H5N1-O.D. at 0.5-1 และ C คือ negative-control

จากผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไวรัสทุกสายพันธุ์ทั้งที่เป็นไวรัสเริ่มต้นและไวรัสที่แสดง 1 unit NA activity นั้นแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน M ที่ถูกต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงยกเว้นไวรัสเริ่มต้นของ H5N1 ที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปบางส่วนแต่ยังคงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน M ใน H5N1 ปกติ ดังนั้นในการที่มีการเปลี่ยนแปลงไปของนิวคลีโอไทด์จึงส่งผลทำให้ค่า Tm ที่แสดงในการทำ one-step real time RT-PCR นั้นมีค่าเปลี่ยนแปลงไปด้วย ผลการศึกษา sequencing แสดงดังต่อไปนี้

```

M1-H5N1-normal  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
M1-H5N1-stock   -----
                    50          60          70          80
M1-H5N1-normal  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
M1-H5N1-stock   ---.A..... .....A.....T
                    90          100         110         120
M1-H5N1-normal  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
M1-H5N1-stock   .....G.... .....A..... A..G..... ...G.T....
                    130         140         150         160
M1-H5N1-normal  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
M1-H5N1-stock   G.....A..A.....
                    170         180
M1-H5N1-normal  ....|....| ....|....| ....|....|
M1-H5N1-stock   -----
                    GACTCATCCT AACTCTAGTG CTGGTCTGA

```

ภาพ 44 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน M ของ H5N1 ปกติ (M1-H5N1-normal) เปรียบเทียบกับยีน M ของไวรัสเริ่มต้น (M1-H5N1-stock)

จากการหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque assay และ one-step real-time RT-PCR สรุปได้ดังต่อไปนี้

ตาราง 20 แสดงปริมาณไวรัส (PFU/ml) และค่า Ct จากการหาค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำ

Virus	PFU/ml	Ct
H5N1-stock	9.86x10 ⁸	15.45
H5N1- 1U NA	2.13x10 ⁷	16.14
H1N1-stock	1.23 x10 ⁷	10.69
H1N1- 1U NA	1.15 x10 ⁶	16.00
H1N1-NA-H5N1-stock	5.06 x10 ⁷	12.67
H1N1-NA-H5N1- 1U NA	1.68 x10 ⁶	13.54

การศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์นิวรามิनिเดส

การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity ที่เวลา 1 ชั่วโมง

การศึกษาความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวรามิनिเดสที่เวลา 1 ชั่วโมง ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์จาก dose response curve ได้ผลการศึกษาดังนี้

ตาราง 21 แสดงผลการศึกษา NA assay ของไวรัส H1N1

Virus dilution	O.D. at 549 nm			\bar{x}	SD
	1	2	3		
1:1	0.765	0.810	0.740	0.772	±0.035
1:2	0.677	0.580	0.670	0.642	±0.053
1:4	0.347	0.372	0.444	0.387	±0.050
1:8	0.162	0.201	0.218	0.194	±0.028
1:16	0.060	0.082	0.070	0.070	±0.011
1:32	0.033	0.027	0.041	0.033	±0.006
1:64	0.015	0.005	0.002	0.007	±0.006

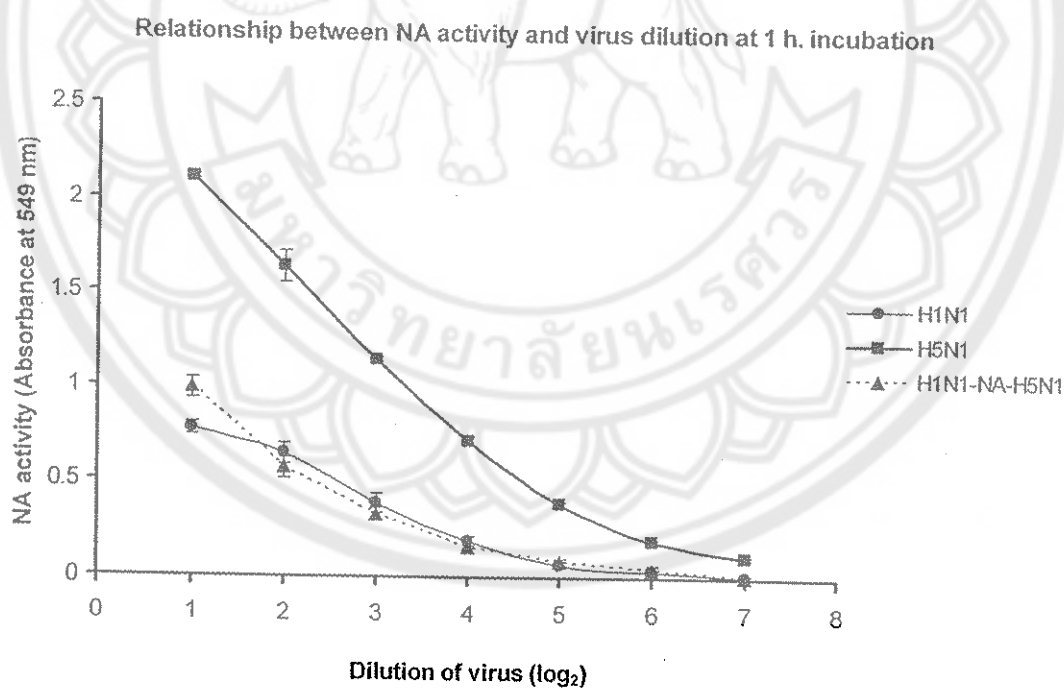
ตาราง 22 แสดงผลการศึกษา NA assay ของไวรัส H5N1

Virus dilution	O.D. at 549 nm			\bar{x}	SD
	1	2	3		
1:1	2.095	2.123	2.108	2.108	±0.013
1:2	1.598	1.578	1.737	1.637	±0.086
1:4	1.128	1.151	1.150	1.142	±0.013
1:8	0.709	0.686	0.741	0.712	±0.027
1:16	0.388	0.393	0.371	0.384	±0.011
1:32	0.201	0.199	0.178	0.192	±0.012
1:64	0.107	0.121	0.102	0.110	±0.009

ตาราง 23 แสดงผลการศึกษา NA assay ของไวรัส H1N1-NA-H5N1

Virus dilution	O.D. at 549 nm			\bar{x}	SD
	1	2	3		
1:1	1.043	0.984	0.932	0.986	±0.055
1:2	0.589	0.608	0.505	0.567	±0.054
1:4	0.337	0.353	0.293	0.328	±0.031
1:8	0.168	0.166	0.146	0.160	±0.012
1:16	0.089	0.094	0.063	0.082	±0.016
1:32	0.072	0.043	0.022	0.046	±0.025
1:64	0.020	0.009	0.004	0.011	±0.008

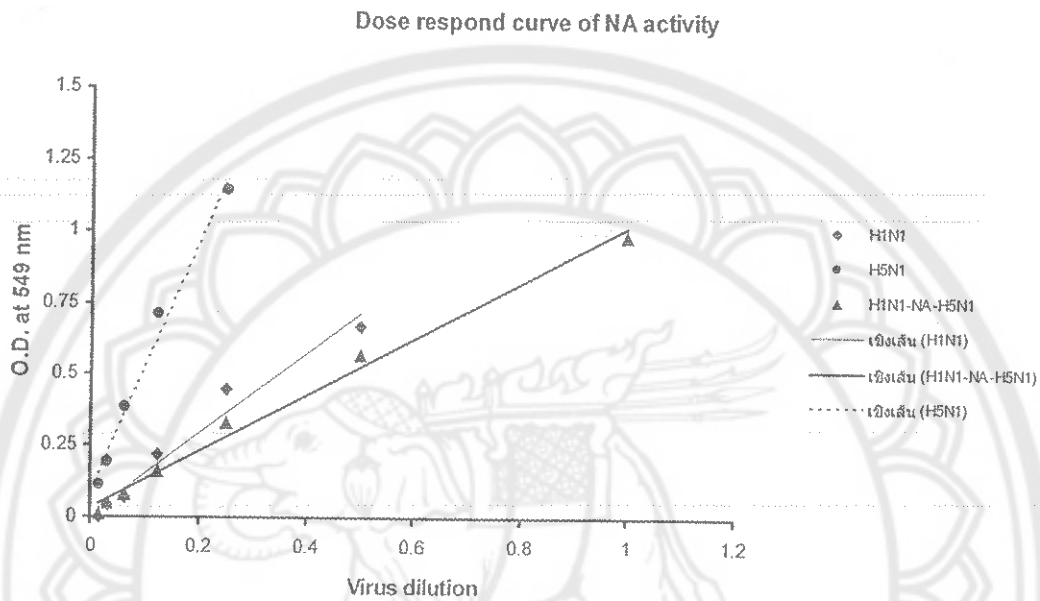
จากผลการศึกษาข้างต้นสามารถนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity ดังภาพ



ภาพ 45 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity

การศึกษา NA activity ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ที่แสดง 1 Unit NA activity

จากข้อมูลการทำ dose response curve ข้างต้น เมื่อนำค่า O.D. ที่ไม่เกิน 1.25 มาหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity จะได้สมการเส้นตรงดังภาพ



ภาพ 46 แสดงกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity

จากกราฟจะได้สมการเชิงเส้นของไวรัส H1N1, H5N1 และ H1N1-NA-H5N1 ดังนี้ $y = 1.4087x + 0.0095$ ($R^2 = 0.9673$), $y = 4.4118x + 0.0807$ ($R^2 = 0.9847$), และ $y = 0.987x + 0.0314$ ($R^2 = 0.9908$) ตามลำดับ และเมื่อกำหนดให้ค่า y หรือค่า O.D. เป็น 0.5 เพื่อเป็นตัวกำหนดปริมาณไวรัสเริ่มต้นที่ทำให้ NA activity มีค่า O.D. เป็น 0.5 หรือ 1 Unit NA activity โดยทำการเจือจางไวรัสและนำมาทดสอบ activity ของเอนไซม์อีกครั้งเพื่อยืนยันว่าความเจือจางของไวรัสที่กำหนดนั้นให้ค่า NA activity เป็น 0.5 จริง

จากนั้นเมื่อทราบปริมาณไวรัสที่ทำให้ NA activity เป็น 1 unit ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการทดสอบ NA assay โดยการใช้ความเข้มข้นของ substrate ที่แตกต่างกันในการทำปฏิกิริยาและกำหนดให้ไวรัสในแต่ละหลอดการทดลองมีปริมาณเท่ากัน ให้ผลการศึกษาดังนี้

ตาราง 24 ผลการศึกษา NA assay ของไวรัส H1N1

Fetuin (μ l)	O.D. at 549 nm			\bar{x}	SD
	1	2	3		
2.5	0.221	0.233	0.239	0.231	± 0.009
5.0	0.306	0.304	0.286	0.298	± 0.011
7.5	0.361	0.363	0.314	0.346	± 0.028
10	0.401	0.373	0.389	0.387	± 0.014
20	0.446	0.402	0.471	0.440	± 0.035
30	0.495	0.466	0.498	0.486	± 0.017
40	0.490	0.454	0.508	0.484	± 0.027
50	0.551	0.490	0.484	0.508	± 0.037

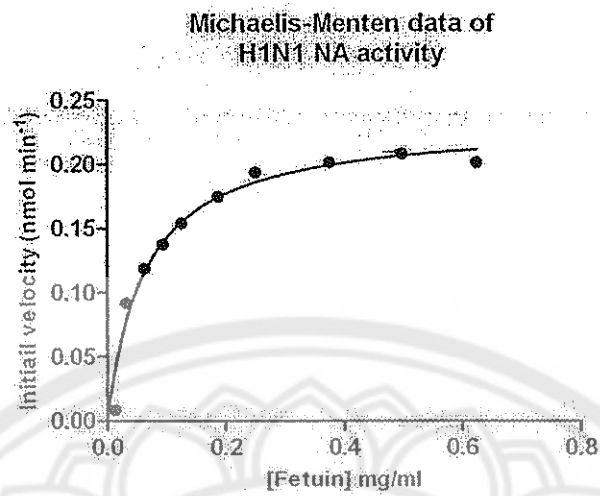
ตาราง 25 ผลการศึกษา NA assay ของไวรัส H5N1

Fetuin (μ l)	O.D. at 549 nm			\bar{x}	SD
	1	2	3		
2.5	0.203	0.233	0.249	0.228	± 0.023
5.0	0.286	0.331	0.332	0.316	± 0.026
7.5	0.331	0.377	0.379	0.362	± 0.027
10	0.376	0.443	0.447	0.422	± 0.039
20	0.419	0.466	0.489	0.458	± 0.035
30	0.443	0.494	0.525	0.487	± 0.041
40	0.452	0.503	0.536	0.497	± 0.042
50	0.428	0.488	0.515	0.477	± 0.044

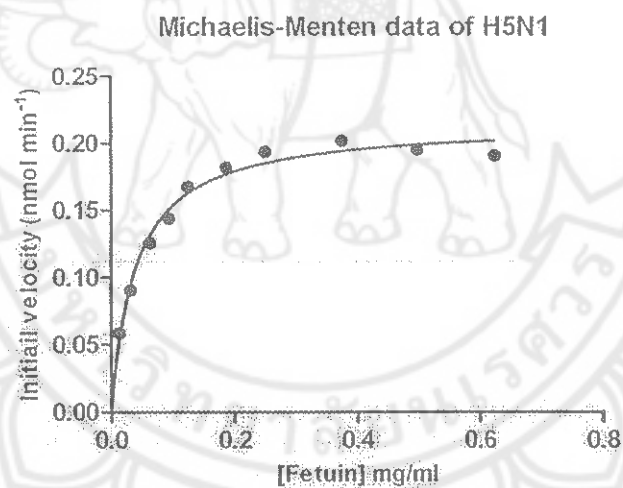
ตาราง 26 ผลการศึกษา NA assay ของไวรัส H1N1-NA-H5N1

Fetuin (μ l)	O.D. at 549 nm			\bar{x}	SD
	1	2	3		
2.5	0.191	0.201	0.207	0.120	± 0.007
5.0	0.251	0.279	0.274	0.268	± 0.014
7.5	0.301	0.307	0.321	0.310	± 0.010
10	0.358	0.356	0.368	0.360	± 0.006
20	0.401	0.411	0.419	0.410	± 0.009
30	0.428	0.438	0.500	0.455	± 0.039
40	0.493	0.529	0.545	0.522	± 0.026
50	0.567	0.533	0.542	0.547	± 0.017

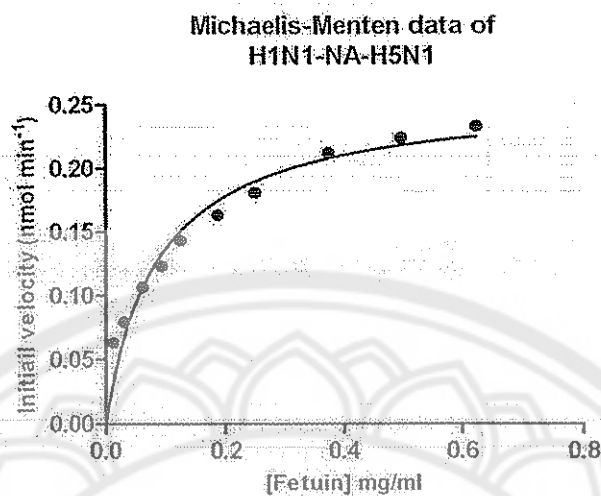
จากข้อมูลข้างต้นเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของ substrate แต่ละความเข้มข้นมาคำนวณหาปริมาณ N-acetylneuraminic acid ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาและหาอัตราเร็วเริ่มต้นหรือ initial velocity (V_i) แล้วนำมาศึกษาจลนศาสตร์แบบ Michaelis-Menten ซึ่งเป็นกราฟที่ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นหรือ substrate กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ ผลการศึกษาแสดงดังต่อไปนี้



ภาพ 47 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ fetuin กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์นิวรามินิเดสของ influenza virus สายพันธุ์ H1N1



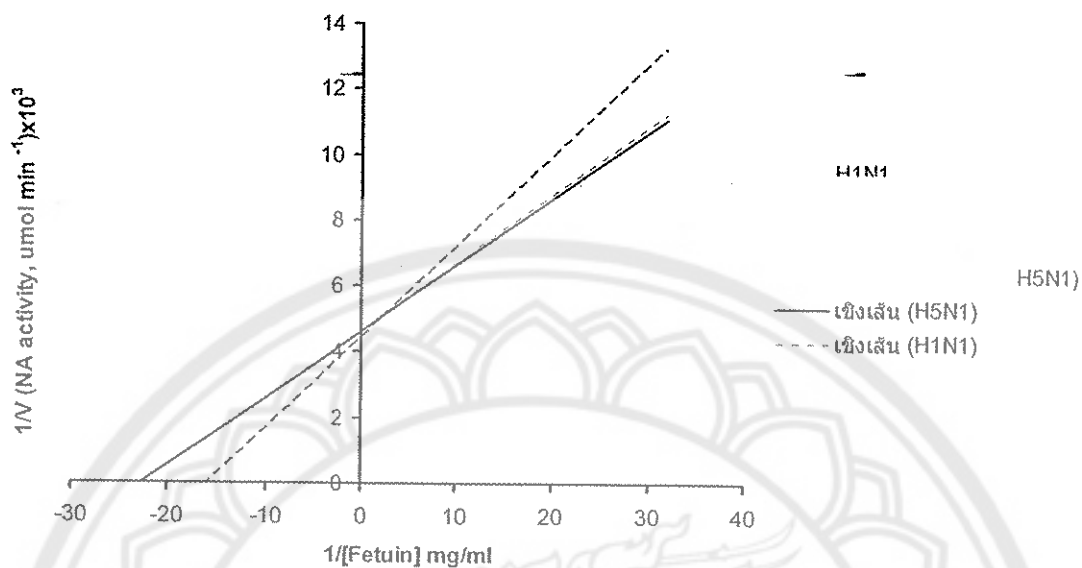
ภาพ 48 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ fetuin กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์นิวรามินิเดสของ influenza virus สายพันธุ์ H5N1



ภาพ 49 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ fetuin กับความเร็วเริ่มต้นของ
ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์นิวรามิनिเดสของ influenza virus สายพันธุ์
H1N1-NA-H5N1

นอกจากนั้นเมื่อนำข้อมูลมาเขียนกราฟเส้นตรงแบบ Lineweaver-Burk ซึ่งเป็นส่วนกลับ
ของความเข้มข้นของ substrate กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ สามารถหา
ค่าคงที่ Michaelis constant (K_m) และความเร็วสูงสุดของการเกิดปฏิกิริยาหรือ maximum
velocity (V_{max}) ได้จากกราฟเส้นตรงซึ่งให้ผลการศึกษาดังนี้

Lineweaver Burk plot of NA activity



ภาพ 50 แสดง Lineweaver-Burk ของ influenza virus แต่ละสายพันธุ์

จากกราฟข้างต้นสามารถหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นของไวรัสสายพันธุ์ H1N1, H5N1 และ H1N1-NA-H5N1 ได้ดังนี้ $y=0.2062x+4.654$ ($R^2=0.9774$), $y=0.2029x+4.5749$ ($R^2=0.9888$) และ $y=0.2758x+4.3929$ ($R^2=0.9629$) ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ได้ผลดังนี้

ตาราง 27 แสดงค่า K_m และ V_{max} ของ influenza virus แต่ละสายพันธุ์

Virus	K_m ($\mu\text{g/ml}$)	V_{max} (nmol min^{-1})
H1N1	44.306	0.215
H5N1	44.351	0.219
H1N1-NA-H5N1	62.783	0.228

บทสรุป

การสร้าง reverse genetic virus สายพันธุ์ H1N1-NA-H5N1

จากการศึกษาเมื่อนำตัวอย่างไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 (A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1)) มาทำการศึกษาคุณลักษณะและขนาดของสารพันธุกรรมทั้ง 8 เส้น โดยการนำตัวอย่างไวรัสจาก allantoic fluid มาสกัด RNA เพื่อใช้เป็น template ในการทำ RT-PCR โดยใช้ Uni 12 universal primers ซึ่งเป็น primer ที่ใช้สำหรับการเปลี่ยนสารพันธุกรรมจาก RNA เป็น cDNA ของยีนแต่ละเส้น โดยขบวนการ reverse transcription ทำการเพิ่มจำนวนยีนทั้ง 8 เส้นโดยใช้ specific primers ที่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้เต็มความยาวทั้งเส้น โดยยีนแต่ละเส้นที่ผ่านการเพิ่มจำนวนได้นั้นจะมีตำแหน่ง restriction site ของเอนไซม์ตัดเฉพาะ *BsaI* (Ba) สำหรับยีน NP และ *BsmBI* (Bm) สำหรับยีนที่เหลือเพิ่มออกมาที่บริเวณปลาย 5' และปลาย 3' เพื่อให้สำหรับการโคลนเข้าสู่ vector ในการศึกษานี้ได้ออกแบบ primer ที่จำเพาะสำหรับยีน PB2, NP และ NA ต่างจากที่เคยมีรายงานของ E. Hoffmann และคณะ [68] นั่นคือการเปลี่ยนจาก Ba-PB2 primer เป็น Bm-PB2 primer และเปลี่ยนจาก Ba-NA primer เป็น Bm-NA primer เนื่องจากพบว่าใน pHW2000 vector ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้มีตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับ *BsaI* restriction enzyme เพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น และจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NP พบว่ามีตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับ *BsmBI* restriction enzyme จำนวน 2 ตำแหน่งภายในชิ้นส่วนของยีน ดังนั้นจึงต้องทำการออกแบบ primer ที่เปลี่ยนจาก Bm-NP primer เป็น Ba-NP primer แต่ยังคงใช้ *BsmBI* ในการตัด pHW2000 vector เช่นเดิมในการโคลนยีนดังกล่าว เนื่องจากลักษณะของปลายที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะยังคงสามารถเชื่อมต่อกันได้กับยีน NP ที่ถูกตัดด้วย *BsaI* และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยการทำ PCR จากภาพ 23 จะพบขนาดยีนทั้ง 8 เส้นของ H5N1 influenza virus ได้แก่ PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, และ NS มีขนาดประมาณ 2341, 2341, 2233, 1778, 1565, 1413, 1027 และ 890 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ เมื่ออ้างอิงจากขนาดของ H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) ซึ่งใช้เป็น positive control ในการศึกษา สำหรับยีน HA เมื่อผ่านขบวนการ PCR แล้ว product ที่ได้จะมี 2 ขนาดที่ต่างกันคือ ขนาดประมาณ 1.8 kb ของยีน HA และประมาณ 0.9 kb ของยีน NS เนื่องจาก reverse primer ของ HA gene มีลักษณะที่เหมือนกับ reverse primer ของ NS gene ดังนั้นในขบวนการ PCR จึงต้องมีส่วนของ NS gene ซึ่งเป็นส่วนของ non-specific product เกิดมาด้วย [68]

และเนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ต้องการสร้างไวรัสชนิดใหม่ขึ้นในห้องปฏิบัติการจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ ไวรัส influenza A สายพันธุ์ H1N1 ที่ได้รับยีน NA จากไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 (A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1)) หรือ H1N1-NA-H5N1 โดยวิธีการ eight-plasmids DNA transfection ดังนั้นจึงได้ทำการเพิ่มปริมาณยีน NA ของไวรัส H5N1 ที่มีขนาดประมาณ 1413 bp โดยใช้ Bm-NA-1/Bm-NA-1413R primer ลักษณะของ PCR product ที่ได้แสดงดังภาพ 24 ซึ่งพบว่ามี non-specific เกิดขึ้นจึงตัดเจลบริเวณที่มี PCR product ของยีน NA มาทำให้บริสุทธิ์ ผ่านกระบวนการ digestion โดยใช้ *Bsm*BI restriction enzyme และ ligation โคลนเข้าสู่ pHW2000 vector โดย electroporation หลังการ spread ลงบน LB agar plate ที่มี 100 µg/ml ampicillin แล้วคัดเลือกจำนวน 5 โคลนถ่ายเชื้อลงใน LB broth ที่มี 100 µg/ml ampicillin เช่นเดียวกัน นำมาสกัดพลาสมิดทำการตรวจสอบโคลนด้วยการทำ PCR จากภาพ 25 พบว่า PCR product ทั้ง 5 โคลนมีขนาดประมาณ 1400 bp ซึ่งเท่ากับขนาดยีน NA ของ H1N1 โคลนของ Mr. Erich Hoffmann ที่ใช้เป็น positive control ดังนั้นจึงกล่าวได้จากการทดลอง สามารถโคลนยีน NA ของไวรัสสายพันธุ์ H5N1 เข้าสู่ pHW2000 vector ได้จริง จากนั้นเมื่อเลือก โคลนที่ 2 มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวพบว่าการเชื่อมต่อกันระหว่างยีนกับพลาสมิด ได้อย่างถูกต้อง และพบว่า NA มีขนาด 1399 นิวคลีโอไทด์ประกอบด้วย 449 amino acid กล่าวได้ว่าในการศึกษาครั้งนี้สามารถสร้าง recombinant plasmid ที่มียีน NA ของไวรัส A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) เพื่อใช้สำหรับสร้าง reverse genetic virus ต่อไป

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน NA ของ H5N1 มาศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน NA ของ H1N1 gi|126599290|gb|EF467823.1| Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34(H1N1)) พบว่ามี identities เป็น 0.7973164 และเมื่อนำลำดับ amino acid ของทั้ง H1N1 ที่ประกอบด้วย 454 amino acid และ H5N1 ที่ประกอบด้วย 449 amino acid มาทำการศึกษาเปรียบเทียบพบว่ามีค่า identities และ similarities เป็น 0.8370044

นอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 8 เส้นของ H5N1 influenza virus เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของเชื้อไวรัสที่นำมาทดลองโดยได้ทำการโคลนเข้าสู่ vector เช่นเดียวกับยีน NA และนำพลาสมิดที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำได้โดยนำพลาสมิดที่สกัดได้ และมีผล PCR positives มาทำ DNA cycle sequencing reaction และทำการวิเคราะห์ลำดับโดย เครื่องอัตโนมัติ Genetic analyzer 310 (ABI) กล่าวคือภายหลังจากผ่านการทำ cycle sequencing reaction ขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดที่แตกต่างกันจะมีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงซึ่ง

สามารถวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยเครื่อง genetic analyzer และมีการประมวลผลออกมาในรูปแบบของ electropherogram แสดงเป็นลำดับของนิวคลีโอไทด์และทำการวิเคราะห์ลำดับได้โดยใช้โปรแกรม sequencing analysis (ABI) และโปรแกรม BioEdit เพื่อประกอบนิวคลีโอไทด์ให้สมบูรณ์ จากการศึกษาพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PB1, PB2, PA, HA, NP, M และ NS มีขนาด 2341, 2341, 2233, 1779, 1566, 1027 และ 875 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ

เมื่อตรวจสอบ recombinant plasmid ที่มียีน NA ของไวรัสสายพันธุ์ H5N1 ว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องแล้วจึงได้ทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดทั้งยีน NA ของ H5N1 และยีนทั้ง 8 เส้นของ H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) สำหรับใช้ในการทำ transfection ความเข้มข้นของพลาสมิดแสดงดังตาราง 6 ภายหลังจากการทำ transfection พบลักษณะที่เปลี่ยนแปลงบนเซลล์ 293H และ MDCK ดังภาพ 31 ถึง 34 โดยการเปลี่ยนแปลงบนเซลล์ 293H นั้นมองเห็นลักษณะของ cytopathogenic effect หรือ CPE ไม่ค่อยชัดเจนมากนักเมื่อเทียบกับเซลล์ MDCK ที่มีลักษณะหดกลมและลอยอยู่มากมายในอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากเซลล์ถูก infected ด้วยไวรัสที่ประกอบเป็นอนุภาคสมบูรณ์จาก expression plasmid ทั้ง 8 plasmid ซึ่งมี viral cDNA ของแต่ละยีนแทรกอยู่ (inserted) ระหว่าง polymerase I promoter และ polymerase II promoter โดยมีการวางตัวในทิศทางกลับกัน หลังจากมีการ transfection เข้าสู่นิวเคลียสของ eukaryotic cells เป็นเหตุทำให้ RNA polymerase I และ RNA polymerase II ที่อยู่ภายในเซลล์มีการถอดรหัสสารพันธุกรรมหรือ transcript ยีนของไวรัสทั้ง 8 เส้น ซึ่งถ้าถูก transcript ด้วย RNA polymerase I จะได้เป็น negative-sense vRNA ในอีกด้านหนึ่งถ้าถูก transcript ด้วย RNA polymerase II นั่นคือเป็นการสังเคราะห์ positive-sense mRNA ของไวรัส มีการ splicing เติม cap ในบริเวณปลาย 5' และเติม poly (A) บริเวณปลาย 3' เกิดขึ้นเป็นโปรตีนทั้ง 10 ชนิดของไวรัส หลังจากมีการสังเคราะห์ viral polymerase complex proteins ซึ่งประกอบด้วย PB1, PB2, PA และ nucleoproteins แล้วจะทำให้กระบวนการ viral replication cycle เริ่มขึ้น เกิดการประกอบกันเป็นอนุภาคไวรัสได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ทางตรงคืออนุภาคไวรัสที่ได้นั้นมาจาก RNA polymerase II transcription และ translation เป็นโปรตีนไวรัสและรวมตัวกับ vRNA ที่ได้จาก RNA polymerase I transcription ส่วนทางอ้อมคืออนุภาคไวรัสที่ได้นั้นมาจาก RNA polymerase I transcription และกระบวนการ viral replication ที่ได้รับผลมาจาก cellular transcription และ translation ของ host cell สังเคราะห์ได้เป็น vRNPs และ structural proteins ประกอบกันเป็นอนุภาคไวรัสที่สามารถ infected ได้ [67] จึงพบลักษณะของ CPE ที่เกิดขึ้นบนเซลล์ หลังจากให้นำ supernatant ของ MDCK cell มาฉีดเพิ่มจำนวนไวรัสในไข่ไก่ฟักและนำ allantoic fluid มาทดสอบ HA test ได้ผล

การศึกษาดังตาราง 7 ซึ่งพบว่ามี hemagglutination เกิดขึ้นทั้งตัวอย่างของ reverse genetic virus และ positive control หรือ H1N1 virus ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่ามีไวรัสเกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการ เมื่อนำตัวอย่าง allantoic fluid นั้นมาสกัด RNA เพื่อการทำ RT-PCR และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก PCR product ของยีน NA อีกครั้ง พบว่าเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน NA ของไวรัส H5N1 ที่ทำการศึกษาก่อนหน้านี้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการทดลองสามารถสร้างไวรัส H1N1 ที่มี ยีน NA เป็นของไวรัส H5N1 (H1N1-NA-H5N1) ในห้องปฏิบัติการได้จริง

หลังจากได้ไวรัสตามที่ต้องการแล้วเพื่อให้ไวรัสมีปริมาณมากพอสำหรับการศึกษารับ ต่อไปจึงได้ทำการเพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟักและเก็บส่วนของ allantoic fluid มาทดสอบ HA test ซึ่ง ทำได้ง่ายและมักใช้เป็นวิธีแรกในการตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่และยังสามารถบอกปริมาณของ ไวรัสเป็น HA unit โดยการทำให้ end point titration ได้เป็นค่า HA titer ของไวรัสแต่ละชนิด จากผล การศึกษาพบว่าไวรัส H5N1, H1N1 และ reverse genetic virus มีค่า HA titer เป็น 64 HA titer, 1024 HA titer และ 512 HA titer ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกถึงความเข้มข้นของไวรัสใน viral solution ที่จะนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ในการตรวจหาคุณสมบัติความแรงในการติดเชื้อของไวรัสจากการคำนวณ EID_{50} โดยวิธี Reed and Muench mathematical technique พบว่าไวรัส H5N1, H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 มีค่า infectivity titer ของ viral suspension ปริมาตร 1 ml เป็น $10^{9.52}$, $10^{8.625}$ และ $10^{8.16}$ EID_{50}/ml ตามลำดับ แสดงว่าไวรัสสายพันธุ์ H5N1. นั้นมีความแรงในการติดเชื้อมากที่สุดส่วนไวรัส H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 นั้นมีความสามารถในการติดเชื้อได้ใกล้เคียงกันเมื่อศึกษาในไข่ไก่ฟัก

การเปรียบเทียบ NA activity ของ influenza A virus แต่ละสายพันธุ์

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเจือจางของเชื้อไวรัสแบบ serial two-fold dilution กับ NA activity ในลักษณะของค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 549 nm ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ในลักษณะของ dose response curve พบว่า NA activity ที่สามารถวัดได้จาก-NA assay โดย TBA method ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก ในการศึกษาครั้งนี้พบค่า O.D. ที่วัดได้มากที่สุดประมาณ 2.5 และน้อยที่สุดประมาณ 0.03 ส่วนความเจือจางของไวรัสน้อยที่สุดที่สามารถ ตรวจสอบได้ด้วยวิธีดังกล่าวคือ 1:64 และเมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างความเจือจางของไวรัสแบบ logarithm กับค่าการดูดกลืนแสงพบว่ากราฟมีลักษณะเป็น sigmoid curve (ภาพ 35) นั่นคือ NA activity จะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณของเชื้อไวรัสและเมื่อปริมาณของเชื้อไวรัสมีความเข้มข้นมากถึง ระดับหนึ่งจะทำให้ NA activity มีความคงที่ ซึ่งไวรัส H5N1 พบว่า NA activity เริ่มมีความคงที่ที่ความ เจือจางของไวรัสเป็น 1:1, 1:2 และ 1:4 หรือ $1\log_2$, $2\log_2$ และ $3\log_2$ ตามลำดับ แต่สำหรับเชื้อไวรัส

H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 พบว่า NA activity เริ่มมีความคงที่ที่ความเจือจางของไวรัสเป็น 1:1 และ 1:2 หรือ $1\log_2$ และ $2\log_2$ ตามลำดับ และเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าค่า O.D. ที่ตรวจวัดได้จากเครื่องวัดการดูดกลืน (DU 730 Life Science UVVis Spectrophotometer, Beckman Coulter) นั้นไม่แสดงค่าความผิดพลาดเนื่องจากค่า O.D. ที่มากกว่า 1 จึงได้ทำการตรวจวัดค่า O.D. ในตัวอย่างเดิม โดยการเจือจาง NA assay product ในสารละลาย warrenoff reagent แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งพบว่าค่า O.D. ที่ได้ไม่แตกต่างกับก่อนการทำเจือจาง แสดงว่า NA activity ที่สามารถตรวจวัดได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นค่าที่บ่งบอกถึง NA activity จริง และจากภาพ 35 ที่แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อไวรัสกับ NA activity อธิบายได้ว่าการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะต้องมีการรวมตัวกันของเอนไซม์กับสารตั้งต้นและอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของโมเลกุลทั้งสอง คือ ถ้ามีสารตั้งต้นพอเพียง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นสองเท่าจะทำให้อัตราเร็วเพิ่มขึ้นไปเป็น 2 เท่าด้วย แต่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อไปเรื่อยๆ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเป็นแนวระนาบเพราะสารตั้งต้นเริ่มหมดไป ทำให้เป็นตัวจำกัดการเกิดปฏิกิริยาได้ อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับการชนกันของโมเลกุล ซึ่งจะชนกันมากขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์หรือสารเริ่มต้นมากขึ้น จากนั้นเมื่อเลือกเฉพาะค่าการดูดกลืนแสงในช่วงที่มีการเพิ่มขึ้นของค่า NA activity อย่างต่อเนื่องมาเขียนกราฟอีกครั้งพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเจือจางของไวรัสกับ NA activity มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง นั่นคือ NA activity จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเชื้อไวรัส ซึ่งจากภาพ 36 จะได้สมการเชิงเส้นของไวรัส H1N1, H5N1 และ H1N1-NA-H5N1 เป็นดังนี้ $y=14.363x-0.2108$ ($R^2=0.9989$), $y=16.621x-0.4153$ ($R^2=0.9974$), และ $y=12.905x-0.1442$ ($R^2=0.9993$) ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้าของ Webster และคณะ ที่ทำการศึกษา neuraminidase ของ influenza virus [86] และการศึกษาของ Oladele และคณะ ซึ่งเป็นการศึกษา neuraminidase activity ของเชื้อไวรัส Newcastle disease virus Kudu 133 [85] ด้วยการทำ NA assay วิธีเดียวกันนี้ และจากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นนี้เอง ทำให้สามารถทราบความเจือจางของไวรัสที่ทำให้ NA activity เป็น 1 unit enzyme จากค่าจำกัดความขององค์การอนามัยโลกว่า 1 Unit NA activity คือ ความเจือจางของไวรัสที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 549 nm มีค่าเป็น 0.5 ภายใต้ standard conditions โดยการกำหนดให้ค่า y ซึ่งแสดงค่า O.D. เป็น 0.5 จากนั่นแทนค่าในสมการเชิงเส้นจะทำให้ทราบปริมาณไวรัสเริ่มต้นที่ทำให้ NA activity มีค่าเป็น 1 unit และเพื่อเป็นการยืนยันว่าสมการเส้นตรงที่ได้จากการทดลองนั้นให้ผลการศึกษาที่แม่นยำจึงได้ทำการเจือจางเชื้อไวรัสและนำมาทดสอบ activity ของเอนไซม์อีกครั้ง โดยให้ผลการทดสอบดังตาราง 14 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลของการวัดค่า O.D. เป็น 0.5 (± 0.1) จริง

หลังจากที่ทราบความเจือจางของไวรัสที่แสดงค่า NA activity เป็น 1 unit enzyme แล้ว จึงนำมาหาปริมาณไวรัสที่แน่นอนโดยการทำ plaque assay ใน cell monolayer primary chicken embryo fibroblast cell (PCF) จากผลการทดลองดังตาราง 15 พบว่าเชื้อไวรัส H5N1, H1H1 และ H1N1-NA-H5N1 ที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีปริมาณไวรัสเริ่มต้นเป็น 9.86×10^8 , 1.23×10^7 และ 5.06×10^7 PFU/ml ตามลำดับ ส่วนปริมาณไวรัสที่ให้ NA activity เป็น 1 unit enzyme ของเชื้อไวรัส H5N1, H1H1 และ H1N1-NA-H5N1 เป็น 2.13×10^7 PFU/ml, 1.15×10^6 PFU/ml และ 1.68×10^6 PFU/ml ตามลำดับ ซึ่งพบว่าหลังทำการเจือจางเชื้อไวรัสให้เป็น 1 unit NA activity มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของเชื้อไวรัสทั้ง 3 สายพันธุ์ที่แสดง 1 unit NA activity พบว่าไวรัสสายพันธุ์ H5N1 มีปริมาณมากกว่าไวรัส H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนเชื้อไวรัส H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าระดับการทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดสในไวรัสสายพันธุ์ H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 สูงกว่าในไวรัสสายพันธุ์ H5N1

ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการตรวจหาปริมาณไวรัสที่แน่นอน จึงได้นำไวรัสที่ผ่านการทำ plaque assay แล้วมาทำการศึกษาด้วยวิธี one-step real-time RT-PCR เพื่อตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อไวรัสใน diluted viral solution ที่รวมทั้ง infected particle และ non-infected particle โดยแสดงผลในรูปของค่า Cycle Threshold หรือค่า Ct ซึ่งต่างจากการนับปริมาณไวรัสด้วยการทำ plaque assay ที่บ่งบอกเฉพาะปริมาณไวรัสที่เป็น infected particle เท่านั้น การทำ one-step real-time RT-PCR จัดว่ามีความแม่นยำมากกว่าวิธี plaque assay [87] จากผลการทดลองตาราง 19 แสดงให้เห็นว่าค่า Ct นั้นเพิ่มขึ้นเป็นไปตามความเจือจางของไวรัสที่ลดลง และบ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อไวรัส H1N1 ต้องการปริมาณไวรัสน้อยกว่า H1N1-NA-H5N1 ที่ NA activity เป็น 1 unit แต่สำหรับเชื้อไวรัส H5N1 นั้นไม่สามารถนำค่า Ct มาศึกษาเปรียบเทียบกับไวรัสอีก 2 สายพันธุ์ที่เหลือได้ เนื่องจากในการทำ one-step real-time RT-PCR มีการใช้ primer ที่ต่างกับกับไวรัส H1N1 ดังนั้นจากผลการศึกษาก็กล่าวได้ว่าระดับการทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดสในไวรัสสายพันธุ์ H1N1 และ H1N1-NA-H5N1 มากกว่าไวรัส H5N1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยอ้างอิงจากผลการทำ plaque assay และจากการทำ one-step real-time PCR พบว่าไวรัส H1N1 มีระดับการทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดสสูงกว่าไวรัส H1N1-NA-H5N1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากผลการศึกษาพบว่าตรงข้ามกับสมมติฐานที่ได้ตั้งไว้ก่อนหน้านี้ที่ว่า neuraminidase activity ของไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 น่าจะสูงกว่าสายพันธุ์ H1N1 ซึ่งอาจสรุปได้ว่าระดับความรุนแรงของการก่อโรคของสายพันธุ์ H5N1 ที่มากกว่า H1N1 นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับระดับ NA activity โดยปัจจัยหลักอาจเนื่องมาจากสาเหตุอื่นร่วมกัน ทั้งที่ทราบเป็นที่แน่นอนแล้วเช่นการปรากฏของ polybasic amino acid ที่ cleavage site ของโปรตีน HA [38], [39], [42] และอิทธิพลของยีนอื่นๆ ที่กำลังศึกษา เช่น การเปลี่ยนจาก glutamic acid เป็น lysine ในกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 627 ของยีน PB2 [43] รวมถึงอิทธิพลของยีน NS ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไวรัสสายพันธุ์ H5N1 มีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มมากขึ้นด้วย [44], [45]

การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์นิวรามินิเดสใน influenza A virus

ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์นิวรามินิเดสของ influenza A virus ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยให้เอนไซม์นิวรามินิเดสของไวรัสทำปฏิกิริยากับ substrate ที่จำเพาะในเวลา 1 ชั่วโมง เนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าวนั้นพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์กับสารตั้งต้นอย่างชัดเจนและรวดเร็ว โดยทำการศึกษาค่าคงที่ Michaelis-Menten constant (K_m) และความเร็วสูงสุดของการเกิดปฏิกิริยาหรือ maximum velocity (V_{max}) ซึ่งค่า K_m คือ ค่าความเข้มข้นของสารเริ่มต้นที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด ดังนั้นค่า K_m จึงสามารถบ่งบอกถึงความเร็วในการรวมตัวของเอนไซม์และสารเริ่มต้นได้ ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ทำโดยการเติม substrate ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเจือจางของเชื้อไวรัสแบบ serial two-fold dilution กับ NA activity ในลักษณะของค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 549 nm จาก dose response curve พบว่า NA activity มีค่า O.D. ที่วัดได้มากที่สุดประมาณ 2.1 ได้แก่ NA activity ของไวรัส H5N1 ส่วนค่า O.D. น้อยที่สุดประมาณ 0.002 ได้แก่ NA activity ของไวรัส H1N1 และความเจือจางน้อยที่สุดของไวรัสที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีดังกล่าวคือ 1:64 และเมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างความเจือจางของไวรัสแบบ logarithm กับค่าการดูดกลืนแสง พบว่ากราฟมีลักษณะดังภาพ 45 จากนั้นเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาเขียนกราฟระหว่างความเจือจางของไวรัสกับ NA activity อีกครั้งพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเจือจางของไวรัสกับ NA activity มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง นั่นคือ NA activity จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเชื้อไวรัส ซึ่งจากภาพ 46 จะได้สมการเชิงเส้นของไวรัส H1N1, H5N1 และ H1N1-NA-H5N1 ดังนี้ $y=1.4087x+0.0095$ ($R^2=0.9673$), $y=4.4118x+0.0807$ ($R^2=0.9847$), และ $y=0.987x+0.0314$ ($R^2=0.9908$) ตามลำดับ และจากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นนี้เองทำให้สามารถทราบความเจือจางของไวรัสที่ทำให้ NA activity เป็น 1 unit enzyme โดยการกำหนดให้ค่า y หรือค่า O.D. เป็น

0.5 จากนั้นแทนค่าในสมการเชิงเส้นจะทำให้ทราบปริมาณไวรัสเริ่มต้นที่ทำให้ NA activity มีค่าเป็น 1 unit จากนั้นได้กำหนดให้ไวรัสทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณเท่ากัน แล้วจึงทำ NA assay โดยการใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน จากข้อมูลข้างต้นเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของ substrate แต่ละความเข้มข้นมาคำนวณหาปริมาณ N-acetylneuraminic acid ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาและคำนวณอัตราเร็วเริ่มต้นหรือ initial velocity (V_i) นำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นกับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ ซึ่งเป็นการศึกษาจลนศาสตร์แบบ Michaelis-Menten อธิบายได้ว่าการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะต้องมีการรวมตัวกันของเอนไซม์กับสารตั้งต้นและอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของโมเลกุลทั้งสอง และถ้าให้เอนไซม์เป็นตัวคงที่และเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นขึ้นเรื่อยๆ นั้น พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของสารเริ่มต้น ระยะที่ 2 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มลดลงเนื่องจากปริมาณของเอนไซม์เริ่มเป็นตัวจำกัด และระยะที่ 3 อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะถึงจุดอิ่มตัว ดังผลการทดลองของไวรัสทั้ง 3 สายพันธุ์ จากภาพ 35 ถึง 36 ในทางกลับกันเมื่อนำข้อมูลเดียวกันนี้มาเขียนกราฟเส้นตรงแบบ Lineweaver-Burk ซึ่งเป็นส่วนกลับความเข้มข้นของ substrate กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ สามารถหาค่า K_m และ V_{max} ได้จากกราฟเส้นตรง (ภาพ 50) จากการศึกษาพบว่าสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นของไวรัสสายพันธุ์ H1N1, H5N1 และ H1N1-NA-H5N1 เป็นดังนี้ $y=0.2062x+4.654$ ($R^2=0.9774$), $y=0.2029x+4.5749$ ($R^2=0.9888$) และ $y=0.2758x+4.3929$ ($R^2=0.9629$) ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} มีค่าแสดงดังตาราง 23 จากผลการศึกษาพบว่าไวรัส H1N1, H5N1 และ H1N1-NA-H5N1 มีอัตราเร็วสูงสุดของการทำปฏิกิริยาเป็น 0.215, 0.219 และ 0.228 nmol min^{-1} ตามลำดับ ส่วนค่า K_m เป็น 44.306, 44.351 และ 62.783 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นั่นคือไวรัส H1N1-NA-H5N1 มีค่า K_m มากกว่าไวรัส H1N1 และ H5N1 ซึ่งมีค่า K_m เท่ากัน จากที่ได้กล่าวก่อนหน้านี้อีกว่าค่า K_m คือ ค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุดซึ่งสามารถบ่งบอกถึงความเร็วในการรวมตัวของเอนไซม์กับสารตั้งต้นได้ ดังนั้นเอนไซม์ที่แสดงค่า K_m ต่ำจึงจัดว่าสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ดีกว่าเอนไซม์ที่แสดงค่า K_m สูง

จากผลการศึกษาเมื่อนำลำดับ amino acid ในยีน NA ของไวรัส influenza A สายพันธุ์ H5N1 (A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1)) ที่แยกได้จากเปิดในช่วงที่มีการระบาดของไวรัสไข้หวัดนกในเขตจังหวัดพิษณุโลก มาศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับ amino acid ในยีน NA ของไวรัส A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) ซึ่งเป็นไวรัสที่มีการระบาดในช่วงปี ค.ศ. 1996-2004 ในฮ่องกง ประเทศจีน พบว่า NA ของไวรัส (A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-

0001/2007 (H5N1)) มีการขาดหายไป (deletion) ของกรดอะมิโนจำนวน 20 amino acid ในตำแหน่งที่ 49-68 ซึ่งเป็นบริเวณส่วนของ NA stalk region ทำให้มีการสูญเสียบริเวณตำแหน่งของ N-linked glycosylation site จำนวน 4 ตำแหน่ง ส่งผลให้ไวรัส H5N1 มีส่วนของ NA stalk region มีลักษณะสั้นกว่าเมื่อเทียบกับไวรัส influenza A สายพันธุ์ H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) จึงทำให้การแสดงออกของ NA activity ในไวรัส H5N1 น้อยกว่าไวรัส H1N1 เนื่องจากมีรายงานพบว่า NA stalk ที่สั้นลงจะทำให้เอนไซม์นิวรามิनिเดสมีความสามารถในการย่อย fetuin substrate ที่มีขนาดใหญ่ได้ช้าลง (reduced rate) รวมถึงจากการศึกษา activity ด้วยวิธี virus elution assay พบว่าไวรัสที่มี NA stalk สั้น ต้องการเวลา elutes ไวรัสออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงน้อยกว่าไวรัสที่มี NA stalk ยาว [88] อาจเนื่องจาก NA สามารถยื่นเข้าไปถึงตัวรับได้ยากขึ้นเมื่ออยู่บนผิวไวรัสที่มี HA อยู่ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Matrosovich และคณะ [89] ที่พบว่าการหายไปของ amino acid residue ในยีน NA จะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดสในการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสลูกหลานออกจากเซลล์ได้น้อยลง และจากการศึกษาของ Castrucci และ Kawaoka [51] พบว่าความยาวของ NA stalk มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของ virus replication ในไข่ไก่ฟัก นั่นคือไวรัสที่มี NA stalk ยาวกว่าจะมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่ดีกว่า ซึ่งไวรัส A/duck/Phitsanulok/NAH6-5-0001/2007 (H5N1) ที่แยกได้จากประเทศไทยมีคุณสมบัติเหมือนกับที่มีรายงานก่อนหน้านี้ ดังนั้น reverse genetic virus จึงน่าจะเป็นต้นแบบ (model) ในการศึกษา NA activity ที่เหมาะสมมากกว่าวิธี virus elution assay เนื่องจากวิธีดังกล่าวเป็นการดูความสามารถของ NA ในการ elute ไวรัสออกจากผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงที่จับกันด้วย HA ของไวรัส ดังนั้นองค์ประกอบที่เกิดจากยีนอื่นๆของไวรัสจึงอาจจะส่งผลต่อระดับการทำงานของ NA activity ด้วย และเมื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนของไวรัส H5N1 พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ N-linked glycosylation site 1 ตำแหน่งบน HA ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าการที่ยีน NA มีการ deletion ของกรดอะมิโนขนาด 20 amino acid บริเวณก้านของโมเลกุล ทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดสลดลงและการลดลงของการทำงานของเอนไซม์นี้เองเป็นการปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงของ HA ซึ่งมี N-linked glycosylation site ที่เพิ่มขึ้น 1 ตำแหน่ง นอกจากนี้การขาดหายไปของกรดอะมิโน 20 ตัว ในส่วนของโมเลกุล neuraminidase ที่ตำแหน่ง stalk region ยังเชื่อว่าจะทำให้เกิดการคงอยู่ของ virion บนเยื่อหุ้มเซลล์ [46], [89], [90]

ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าไวรัส H5N1 นั้นมีระดับการทำงานของ NA activity ต่ำกว่าไวรัส H1N1-NA-H5N1 ซึ่งไวรัสทั้งสองสายพันธุ์นี้มี NA ที่เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่า NA ของไวรัส H5N1 มีการแสดงออกบนอนุภาคไวรัส H1N1 มากกว่าตัวมันเอง เป็นไปได้ว่าจำนวนของ NA

spike บน A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) มีจำนวนน้อยกว่าไวรัส H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้



OUTPUT ที่ได้จากโครงการ

1. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 1 เรื่อง คือ

COMPARISON OF NEURAMINIDASE ACTIVITY OF INFLUENZA A VIRUS SUBTYPE
H5N1 AND H1N1 USING REVERSE GENETICS VIRUS

Anchalee Rawangkhan, Donruedee Sanguansersri, Narutchala Suwannakhon,

Sutatip Pongcharoen, Purintra Pensuwan, Chanpen Chamnanpood,

Pornchai Chamnanpood and Phanchana Sanguansersri

SOUTHEAST ASIAN J TROP MED PUBLIC HEALTH

Vol 41 No. 3 May 2010

2. ได้ผลิตนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา 1 คน คือ น.ส. อัญชลี ระวังการ ได้สำเร็จการศึกษาในระดับ
ปริญญาโท วท.บ. (จุลชีววิทยา) จากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีการศึกษา 2553



THE SOUTHEAST ASIAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND PUBLIC HEALTH

Volume 41

Number 3

May 2010

CONTENTS

	Page
Optimization for high-level expression in <i>Pichia pastoris</i> and purification of truncated and full length recombinant SAG2 of <i>Toxoplasma gondii</i> for diagnostic use	507
..... YL Lau, I Ithoi, MY Fong	
Short report. Vitamin K injection in spontaneous bleeding and coagulopathy in severe malaria: pros and cons	514
..... P Wilairatana, S Krudsood, N Tangpukdee	
Three day albendazole therapy in patients with a solitary cysticercus granuloma: a randomized double blind placebo controlled study	517
..... RN Chaurasia, RK Garg, A Agarwal, N Kohli, R Verma, MK Singh, R Shukla	
Ectoparasitic fauna of birds, and volant and non-volant small mammals captured at Srinakarin Dam, Kanchanaburi, Thailand	526
..... T Changbunjong, C Jirapattharasate, R Buddhirongawatr, K Chewajon, P Charoenyongyoo, S Suwanapakdee, S Waengsothorn, K Triwitayakorn, K Chaichoun, P Ratanakorn	
Breeding patterns of <i>Aedes stegomyia albopictus</i> in periurban areas of Calicut, Kerala, India	536
..... BB Rao, B George	
Bionomic status of <i>Anopheles epiroticus</i> Linton & Harbach, a coastal malaria vector, in Rayong Province, Thailand	541
..... S Sumruayphol, C Apiwathnasorn, N Komalamisra, J Ruangsittichai, Y Samung, P Chavalitsheewinkoon-Petmitr	
The life cycle and effectiveness of insecticides against the bed bugs of Thailand	548
..... S Suwannayod, Y Chanbang, S Buranapanichpan	
Escalated regimen of hepatitis B vaccine in childhood hematological malignancies while on chemotherapy	555
..... N Ghosh, MA Mannan, F Monjur, F Rizwan, AFM Salim	
* Comparison of neuraminidase activity of influenza A virus subtype H5N1 and H1N1 using reverse genetics virus	562
..... A Rawangkhan, D Sanguansermisri, N Suwannakhon, S Pongcharoen, P Pensuwan, C Chamnanpood, P Chamnanpood, P Sanguansermisri	
Case report. Delayed progression and inefficient transmission of HIV-2	570
..... B Kashyap, H Gautam, S Chadha, P Bhalla	
Modeling the incidence of tuberculosis in southern Thailand	574
..... N Kongchouy, S Kakchapati, C Choonpradub	
Patterns of drug resistance and RFLP analysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains isolated from recurrent tuberculosis patients in Sri Lanka	583
..... DN Magana-Arachchi, AJ Perera, V Senaratne, NV Chandrasekaran	
Multiplex PCR for detection of clarithromycin resistance and simultaneous species identification of <i>Mycobacterium avium</i> complex	590
..... S Iamsawat, S Surawut, T Prammananan, A Leelaporn, J Jearanaisilavong	
Case report. Endotracheal tuberculosis with obstruction	602
..... Y Uçar, ZÇ Sözener, D Karnak	

Case report. Coexistence of breast cancer metastases and tuberculosis in axillary lymph nodes – a rare association and review of the literature	NS Salemis, A Razou	608
Detection of outer membrane porin protein, an imipenem influx channel, in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinical isolates	P Naenna, P Noisumdaeng, P Pongpech, C Tribuddharat	614
High prevalence of <i>bla</i> _{oxz-23} in oligoclonal carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> from Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand	B Thapa, C Tribuddharat, S Srifuengfung, C Dhiraputra	625
Research not. Comparison of Vi serology and nested PCR in diagnosis of chronic typhoid carriers in two different study populations in typhoid endemic area of India	G Nath, P Maurya, AK Gulati, TB Singh, R Srivastava, K Kumar, SK Tripathi	636
Is <i>Penicillium citrinum</i> implicated in sago hemolytic disease?	L Atagazli, AR Greenhill, W Melrose, AG Pue, JM Warner	641
A diphtheria outbreak in Assam, India	L Saikia, R Nath, NJ Saikia, G Choudhury, M Sarkar	647
Research note. Identification of IgE-binding proteins of raw and cooked extracts of <i>Loligo edulis</i> (white squid)	ZHM Yadzir, R Misnan, N Abdullah, F Bakhtiar, M Arip, S Murad	653
Development of a questionnaire for assessing factors predicting blood donation among university students: A pilot study	M Jalalian, L Latiff, STS Hassan, P Hanachi, M Othman	660
Impact on access to medicines from TRIPS-Plus: a case study of Thai-US FTA	N Kessomboon, J Limpananont, V Kulsomboon, U Maleewong, A Eksaengri, P Paothong	667
Microbial counts and particulate matter levels in roadside air samples under skytrain stations, Bangkok, Thailand	P Luksamijarulkul, P Kongtip	678
Knowledge and views regarding condom use among female garment factory workers in Cambodia	G Webber, N Edwards, C Amaratunga, ID Graham, V Keane, S Ros	685
Awareness and practice of post abortion care services among health care professionals in southeastern Nigeria	JIB Adinma, L Ikeako, ED Adinma, CO Ezeama, JO Ugboaja	696
Antenatal care among ethnic populations in Luang Namtha Province, Lao PDR	O Phathamvong, M Ali, S Souksavat, K Chounramany, C Kuroiwa	705
Early childhood caries and related factors in Vientiane, Lao PDR	S Senesombath, S Nakornchai, P Banditsing, D Lexomboon	717
Association between an unhealthy lifestyle and other factors with hypertension among hill tribe populations of Mae Fah Luang District, Chiang Rai Province, Thailand ...	Y Duangtep, K Narksawat, R Chongsuwat, P Rojanavipart	726
Factors associated with alcohol consumption among male high school students in central Thailand	W Chaveepojnkamjorn, N Pichainarong	735
A pilot use of team-based learning in graduate public health education	M Van der Putten, N Vichit-Vadakan	743
Erratum		754

COMPARISON OF NEURAMINIDASE ACTIVITY OF INFLUENZA A VIRUS SUBTYPE H5N1 AND H1N1 USING REVERSE GENETICS VIRUS

Anchalee Rawangkhan¹, Donruedee Sanguansermisri¹, Narutchala Suwannakhon¹, Sutatip Pongcharoen², Purinthra Pensuwan³, Chanpen Chamnanpood^{1,3}, Pornchai Chamnanpood³ and Phanchana Sanguansermisri¹

¹Faculty of Medical Sciences, ²Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok;
³Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand

Abstract. Neuraminidase (NA) is an envelope surface glycoprotein of influenza A viruses. It cleaves α -(2,3) or α -(2,6) glycosidic linkage between a terminal sialic acid residue of the host cell receptor and hemagglutinin of the viral envelope, thus releasing viral progeny from the infected cell. In this study, a reassortant virus (H1N1-NA-H5N1) containing the NA gene from A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) virus and seven remaining genetic segments from A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) was constructed using reverse genetic technique. NA activity of H1N1-NA-H5N1 virus was lower than that of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), and NA activity of A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 study (H5N1) was the lowest among them ($p < 0.05$). To our knowledge, this is the first comparative study of NA activity of H1N1 and H5N1 virus using reverse genetic technique. It also indicates that the NA gene may be expressed at a higher level in the H1N1 infected cell than the H5N1 infected cell.

Key words: influenza A virus, H5N1, H1N1, neuraminidase, reverse genetic technique

INTRODUCTION

Neuraminidase (NA) of influenza A viruses is a class II glycoprotein containing four regions, which are box-like catalytic head, a centrally attached stalk, hydrophobic transmembrane-spanning region, and a cytoplasmic tail of six amino acids (Palese and Shaw, 2007). NA functions as a homotetramer to promote the

release of progeny virions from an infected cell, resulting in the accumulation of large aggregates of progeny virions on the cell surface. NA hydrolyses α -(2, 3) or α -(2, 6) glycosidic linkage between a terminal sialic acid residue and its adjacent carbohydrate moiety on the host cell receptor. On the other hand, the sialic acids are also the target receptors for the viral hemagglutinin (HA), the major surface glycoprotein on the viral particle surface and NA destroys these HA receptors (Palese and Shaw, 2007).

NA is important also for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium by removing the decoy

Correspondence: Phanchana Sanguansermisri, Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

Tel. 66 (0) 89 708 8384; Fax: 66 (0) 55 96 4770
E-mail: phanchana@hotmail.com

receptors on mucins, cilia, and cellular glycocalyx (Matrosovich *et al.*, 2004). In addition, NA is thought to promote virus entry, and thereby enhances infection efficiency (Ohuchi *et al.*, 2006). A report (Huang *et al.*, 2008) indicated that NA alone among viral proteins limits influenza A virus superinfection. Many studies have documented that influenza virus particles with low NA enzymatic activity cannot be efficiently released from infected cells (Matrosovich *et al.*, 1999). Since the formation of aggregates results directly from HA binding to sialic acid receptors on cellular and viral surfaces, a balance of competent HA and NA activities appears critical (Mitnaul *et al.*, 2000). There should be enough HA activity to ensure virus binding and enough NA activity to ensure the release of progeny virus (Palese *et al.*, 1974; Liu *et al.*, 1995; Mitnaul *et al.*, 1996). NA activity of influenza A virus correlates with the length of NA stalk region, those with shorter stalk show reduced activity (Els *et al.*, 1985; Luo *et al.*, 1993). In embryonated eggs, length of the NA stalk correlating with the efficiency of virus replication, the longer the stalk the more efficient the replication, indicating that the length of NA stalk affects the host range of influenza A viruses (Castrucci and Kawaoka, 1993; Wang *et al.*, 2006).

Although the highly pathogenic avian influenza A virus subtype H5N1, which contains the same NA subtype (N1) with the human influenza A virus subtype H1N1, has been well studied regarding NA characteristics and biological significance, less is known about NA activity on the viral envelope. Moreover, NA activity assay which minimizes the effect of the seven genes components, has not yet been reported. In this study, we compared NA activity of influenza A virus subtype H5N1 (avian virus) with the H1N1 (human vi-

rus) in order to better understand the level of NA activity expression in difference virus species. Applying a reverse genetic system, we generated a reassortant virus, H1N1-NA-H5N1 strain, containing the NA gene from avian virus (H5N1) and all of seven gene segments from the influenza virus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1).

MATERIALS AND METHODS

Viruses and cells

Influenza virus A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) was obtained from the Northern Veterinary Research and Development Center, Phitsanulok, Thailand. Virus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) and the reassortant virus H1N1-NA-H5N1 were constructed for this study. Viruses were propagated in chicken embryonated eggs to make viral working stocks. 293H human embryonic kidney cells and Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) were maintained in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum in a 5% CO₂ incubator. Primary chicken embryo fibroblast cells (PCF) were maintained under the same condition.

Construction of NA gene recombinant plasmid

RNA of influenza virus A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) from infected allantoic fluid. RNA was transcribed into cDNA using Impromt II Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) with Uni12 primer as described previously (Hoffmann *et al.*, 2001). NA gene was amplified using Perpetual Opti Taq DNA polymerase (Vivantis) with Bm-NA-1 (5'-TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGAGT-3') and Bm-NA-1413R (5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAAGGAG TTTTTT-3') primers containing

restriction site for the enzyme *BsmB I*. The amplification program was initiated at 94°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 1 minute, 56°C for 40 seconds, and 72°C for 2 minutes, with a final step of 72°C for 10 minutes. Following gel-electrophoresis, PCR products were excised from the agarose gel and purified using GF-1 gel DNA Recovery kit (Vivantis) according to the manufacturer's instructions. Following digestion with *BsmB I* (New England Biolabs), the PCR fragments were cloned into the reverse genetic RNA-transcription pHW2000 vector using T4 DNA ligase (Fermentus) and transfected into *E. coli* strain Top10 competent cells using electroporation. Transformants were plated on LB plates with appropriate antibiotics and incubated at 37°C overnight. Individual colonies were screened using PCR to confirm insertion of the ligated gene segment. Then, plasmids were extracted using GeneJET Plasmid Miniprep kit (Fermentas), and DNA sequences of the NA inserts were determined using BigDye Terminator Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems) in an ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Generation of viruses using reverse genetic technique

For generation of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus, the eight plasmids containing the cDNAs of the virus were kindly provided by Dr Robert G Webster. For the H1N1-NA-H5N1 reassortant virus, plasmid vector containing the NA segment was constructed as described in the previous section, and the seven genetic segments came from A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Both viruses were generated using plasmid-based reverse genetic system (Hoffmann *et al*, 2000) with some modification. In brief, 80 µl aliquot of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was added to Opti-MEM (Invitrogen) in 250

µl of total volume and incubated at room temperature for 5 minutes. Each plasmid was diluted to 4 µg in 250 µl of OPTi-MEM transfection media. The diluted plasmid and diluted lipofectamine were mixed and incubated at room temperature for 20 minutes. Then, the DNA-transfection mixture was added 293H cells (1.0x10⁶ cells per well) in 6-well plate. After 8 hours incubation, the transfection medium was removed and replaced with 1 ml of OPTi-MEM fresh medium. Cells were incubated for an additional 48 hours and 2 µg/ml of TPCK-treated trypsin (Invitrogen) were added. After 72 hours of incubation, 100 µl aliquots of the culture medium were harvested and centrifuged for 5 minutes at 4,862g (MiniSpin Plus, Eppendorf®). Then, 0.5 ml of supernatant were inoculated to 1.0x10⁶ MDCK cells and incubated at 37°C for 1 hour. MEM medium containing 1 µg/ml of TPCK-treated trypsin was added and incubated for 72 hours. The cell culture was centrifuged at 4,862g for 5 minutes and 0.1 ml aliquot of supernatant was injected into chicken embryonated egg. After incubating for 3-4 days, allantoic fluid was harvested and tested with a hemagglutination assay. The full genome of reassortant virus was sequenced to confirm the presence of parental virus.

All studies were performed in a secure biosafety level 3 (BSL-3) laboratory, Northern Veterinary Research and Development Center, Phitsanulok, Thailand.

Quantification of virus growth yield and infectivity in chicken embryonated eggs

Hemagglutination assay was used for quantification of viruses growth yield in chicken embryonated eggs according to the OIE Manual (2008). In brief, 25 µl serial two-fold dilutions of virus in phosphate-buffered saline (PBS) were mixed with 1% chicken red blood cells. After 30

minute incubation at room temperature, HA titer was estimated from the highest virus dilution that caused complete hemagglutination. The infectivity titer was expressed as 50% egg infectious dose (EID₅₀). Titers were determined by serial 10-fold dilution of the virus stock in PBS from 10⁻¹ to 10⁻¹⁰, and then titration of virus in eggs was carried out by the method of Reed and Muench (Grimes, 2002).

Preparation of formalin-inactivated viruses

Formalin-inactivated viruses were prepared for NA assay. The allantoic fluids of viruses were inactivated by the addition of 0.01% formalin (v/v) and kept at 4°C for 18 hours. Inactivation was confirmed by chicken embryonated egg inoculation.

NA assay

NA assay followed the WHO manual on animal influenza diagnostic and surveillance with standard thiobarbituric acid (TBA) method (Webster *et al*, 2002) with some modification. In brief, serial 2-fold dilutions of 10 µl viruses mixed with 10 µl of PBS and 20 µl of fetuin (Sigma) substrate and incubated at 37°C for 18 hours. Both samples and control were conducted in duplicates and each experiment was repeated three times. Then, 20 µl of periodate reagent were added and allowed to stand at room temperature for 20 minutes. Two hundred µl aliquot of arsenite reagent was added and the tube was shaken until the yellow-brown color disappeared. Thereafter, 500 µl of thiobarbituric acid reagent was added to each tube, the mixture vigorously shaken and incubated in boiling water for 15 minutes. After cooling in ice bath for 5 minutes, 600 µl of Warrenoff reagent were added and solution vigorously shaken. The mixture was centrifuged at 4,767g (MIKRO 20, Hettich) for 5 minutes,

and optical density (OD) of supernatant measured at 549 nm (DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Beckman Coulter). The definition of 1 unit NA activity was the dilution of virus that gave an OD₅₄₉ of 0.50. Each virus strain was diluted to 1 unit NA and the amount of the virus measured using plaque assay and one-step real time RT-PCR.

Plaque assay

The presence of infectious virus particles in the diluted viral solution was determined by plaque assay using chicken primary embryonic fibroblast cells (3x10⁶ cell/well) in 6-well tissue culture plates. Virus samples were diluted in cold-MEM as 10-fold serial dilution. Experiments were conducted in triplicate.

One-step real time RT-PCR

RNA template for one-step real time RT-PCR was extracted from the plaque assay virus solution. Primers for H1N1 were as described previously (Spackman *et al*, 2002). The H5N1 primers were MI-H5-F (5'-CTATCACCAACCCACTAATCAGAC-3') and MI-H5-R (5'-TCAGACCA GCACTAGAGTTAGG-3'). The expected size of the amplicon for H1N1 and H5N1 was 101 bp and 189 bp, respectively, and the T_m was 83.2°C and 86.3°C, respectively. SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) was used with a 25 µl reaction mixture under the following conditions: 12.5 µl of 2X Reaction Mix (1X), 0.25 µl of 10 µM each primer, 0.5 µl of SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix (includes RNase OUT™), 1 µl of RNA template and DEPC-treated water. Reaction was carried out in a Rotor-Gene 6000 real-time rotary analyzer (Corbett Life Science, Australia). The thermal cycle program was 10 minutes at 50°C (RT) followed by 5 minutes at 95°C, and 40 amplification cycles of 95°C for 15

seconds, 54°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds. Lastly, a dissociation curve was obtained from 75-95°C (1°C increment per 5 seconds).

Kinetic analysis of influenza A virus NA

Fetuin substrate (0.03125, 0.0625, 0.09375, 0.125, 0.1875, 0.25, 0.375, 0.5 and 0.625 mg/ml) was hydrolyzed with 1 unit of NA at 25°C and linear rate measured for 60 minutes. Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) of the enzyme were determined by graphical extrapolation of Lineweaver-Burk plot.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using paired simple *t*-test with SPSS version 15.0 evaluation program. All the data were expressed as mean \pm standard deviation, and value of $p < 0.05$ is considered significant.

RESULTS

Generation of H1N1-NA-H5N1 reassortant virus and A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

The generation of H1N1-NA-H5N1 reassortant virus and A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) were confirmed by RT-PCR followed by nucleotide sequencing. The genome of both viruses were different only in the NA genetic segment. The NA genetic segment of H1N1-NA-H5N1 contained all the characteristic of A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) especially the 20-amino acid deletion in the NA stalk (position 49-68) which not present in A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus (data not show). All virus strains grew well in chicken embryonated eggs, with A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) showing higher growth rate than the others (data not show). The HA titer from pooled allantoic fluid of H5N1, H1N1 and H1N1-NA-H5N1 virus was

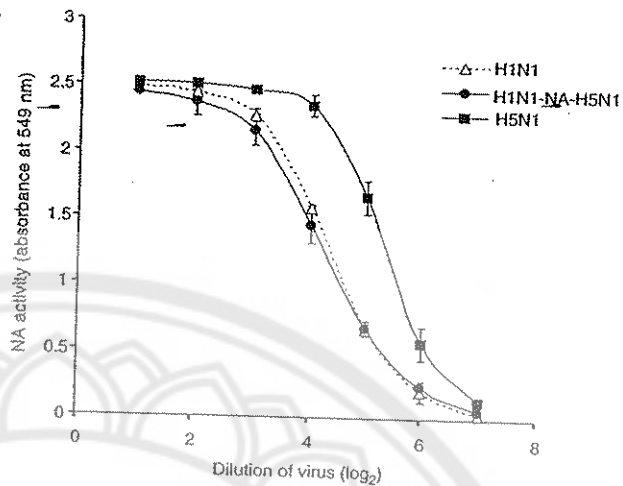


Fig 1-Relationship between NA activity and virus dilution.

1:64, 1:1024 and 1:512, respectively. Infectivity titer (EID_{50}/ml) of H5N1, H1N1 and H1N1-NA-H5N1 virus was $10^{9.5}$, $10^{8.6}$ and $10^{8.2}$, respectively.

Comparison of NA activity

The results of serial two-fold dilutions of NA activity of the each virus strain showed that the least detectable dilution was 1:64. The maximum and minimum OD_{549} was 2.5 and 0.03 respectively. The plot of data of NA activity against the logarithm of the reciprocal of the virus dilution gave a reverse sigmoid shape (Fig 1). NA activity of 1:1 and 1:2 dilutions of H1N1 and H1N1-NA-H5N1 viruses remained unchanged, but that of H5N1 extended to 1:4 dilution. There were a linear relationship between NA activity (y) and dilution (x) of the virus at higher serial dilution with a linear algebraic equation for H5N1, H1N1 and H1N1-NA-H5N1 of $y=16.621x-0.4153$ ($R^2=0.9974$), $y=14.363x-0.2108$ ($R^2=0.9989$), and $y=12.905x-0.1442$ ($R^2=0.9993$), respectively.

The results of plaque assay and one-step real time RT-PCR of the influenza A

Table 1
Plaque assay (PFU/ml) and one-step real time RT-PCR (Ct) of influenza A viruses.

Virus strain	PFU/ml	Cycle threshold (Ct)
H5N1-stock	$10 \pm 2 \times 10^8$	15.4 ± 0.1
H5N1- 1 unit NA	$2 \pm 0.6 \times 10^7$	16.1 ± 0.7
H1N1-stock	$1 \pm 2 \times 10^7$	11 ± 1
H1N1- 1 unit NA	$1 \pm 3 \times 10^6$	16.0 ± 0.2
H1N1-NA-H5N1-stock	$5 \pm 1 \times 10^7$	12.7 ± 0.2
H1N1-NA-H5N1- 1 unit NA	$1 \pm 4 \times 10^6$	13.5 ± 0.1

Table 2
Kinetic parameters of influenza A viruses.

Virus	K_m ($\mu\text{g/ml}$)	V_{max} (nmol min^{-1})
H1N1	44.3	0.21
H5N1	44.3	0.22
H1N1-NA-H5N1	62.8	0.23

virus at 1 unit of NA activity are shown in Table 1. In the plaque assay, it required more viral particles of H5N1 to generate 1 unit of NA activity than for H1N1 and H1N1-NA-H5N1 virus ($p < 0.05$). There is no significant difference between H1N1 and H1N1-NA-H5N1 virus. In RT-PCR experiment, to generate 1 unit of NA activity, the quantity of H1N1 virus required was less than that for H1N1-NA-H5N1. Thus, NA activity of the H1N1-NA-H5N1 was lower than that of the H1N1, and NA activity of H5N1 was the lowest among the three.

Kinetic properties of NA

Using Lineweaver-Burk plot, K_m and V_{max} of NA of the 3 viruses are shown in Table 2. V_{max} values for NA of H1N1, H5N1 and H1N1-NA-H5N1 were the same, but K_m value of H1N1-NA-H5N1 was higher than that of H1N1 and H5N1.

DISCUSSION

In this study, we constructed H1N1-NA-H5N1 virus containing NA gene segment from A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) and the rest of its sequence came from A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Growth yield of the reassortant virus was lower than those of the unmodified A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). The deletion of NA stalk in the virion of the reassortant virus did not abolish its infection property.

We found a linear relationship between NA activity and virus dilution at higher serial dilutions. Similar results were obtained with influenza virus (Webster and Campbell, 1972). Comparison of NA activity with virus dilution showed that H1N1-NA-H5N1 was similar to H1N1, suggesting that the NA of A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) had lower NA activity than A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). This may be due to the fact that the NA stalk region of H5N1 is shorter than H1N1. In the previous studies, deletion in the stalk impairs the ability of the enzyme to release influenza virus from erythrocytes by virus elution assay (Els *et al*, 1985; Luo *et al*, 1993; Wang *et al*, 2006). The time needed for viruses that contain longer NA stalks to elute from erythrocytes

is less than those with the shorter NA stalks. We found that the same is true for deletion in the NA of H5N1 from Thailand. Thus, reverse genetic virus would be a better model for the study of NA activity because of the virus elution assay is a measurement of the ability of NA to elute virus bound on erythrocytes by hemagglutinin (HA). When using wild type viruses, there may be other gene components that affect NA activity. Moreover, other studies have shown that there is no apparent relationship between NA stalk length and enzyme activity when using the virus elution assay (Castrucci and Kawaoka, 1993).

Surprisingly, the H5N1 virus had lower NA activity than H1N1-NA-H5N1, even though both strains consisted of the same NA. This suggested that the NA gene of H5N1 is expressed in the H1N1 virus particle at a higher level than in the virus H5N1 itself ($p < 0.05$). It is therefore possible that the number of NA spikes on the envelope of the A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) is less than that of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Enzyme kinetic studies showed that K_m of NA in the reassortant virus was higher than the wild type viruses ($p < 0.05$), indicating that the binding property of the enzymes may be affected by other viral genetic factors.

In summary, this study showed that the NA activity of the reassortant virus was lower than the H1N1 virus, suggested that the deletion of NA stalk of the H5N1 from Thailand reduced the NA activity. For a new recombinant virus species, it suggested that it may be difficult to predict the viral phenotype based on the overall genetic component alone. Further study on vice versa, eg construction of a new reassortant virus containing the NA gene from A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) and the

seven remaining genetic segments from A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) may increase our knowledge about the genetics of influenza viruses.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Robert G Webster, St Jude Children Research Hospital, Memphis, USA for providing pHW2000 expression vector and recombinant plasmid containing cDNA of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), and Northern Veterinary Research and Development Center at Phitsanulok for use of secure biosafety level 3 facility. This work was supported by Naresuan University and Agriculture Research Development Agency.

REFERENCES

- Castrucci MR, Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol* 1993; 67: 759-64.
- Els MC, Air GM, Murti KG, Webster RG, Laver WG. An 18-amino acid deletion in an influenza neuraminidase. *Virology* 1985; 142: 241-7.
- Grimes SE. A basic laboratory manual for the small-scale production and testing of I-2 Newcastle disease vaccine. Bangkok: FAO Regional Office for Asia and the Pacific (RAP), 2002.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6108-13.
- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 2001; 146: 2275-89.
- Huang IC, Li W, Sui J, Marasco W, Choe H, Farzan M. Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection. *J Virol* 2008; 82: 4834-43.

NA ACTIVITY OF H5N1 AND H1N1 INFLUENZA A VIRUSES

- Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* 1995; 69: 1099-106.
- Luo G, Chung J, Palese P. Alterations of the stalk of the influenza virus neuraminidase: deletions and insertions. *Virus Res* 1993; 29: 141-53.
- Matrosovich MN, Zhou N, Kawaoka Y, Webster RG. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 1999; 73: 1146-55.
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* 2004; 78: 12665-7.
- Mitnaul LJ, Castrucci MR, Murti KG, Kawaoka Y. The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication. *J Virol* 1996; 70: 873-9.
- Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, *et al.* Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol* 2000; 74: 6015-20.
- Ohuchi M, Asaoka N, Sakai T, Ohuchi R. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes Infect* 2006; 8: 1287-93.
- Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D, Griffin D, Lamp R, *et al.*, eds. *Field's virology*. Vol 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 1647-89.
- Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 1974; 61: 397-410.
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, *et al.* Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3256-60.
- Wang QZ, Long JX, Hu SL, Wu YT, Liu XF. [Biological significance of amino acids deletion in NA stalk of H5N1 avian influenza virus]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2006; 46: 542-6.
- Webster R, Cox N, Stöhr K. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva: World Health Organization, 2002.
- Webster RG, Campbell CH. An inhibition test for identifying the neuraminidase antigen on influenza viruses. *Avian Dis* 1972; 16: 1057-66.
- World Organization for Animal Health (OIE). Manual of diagnostic tests and vaccine for terrestrial animals. Paris: OIE, 2008.