การผลิตและการประยุกต์ใช้เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

Production and Application of *Taq* DNA polymerase

วาสนา บัวทอง

Wasana Buathong

ว
หมู่ QP606.D46 ว56 2542 ส.2
Order Key 28825
Bib Key 177603
10 ก.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biochemistry

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและการประยุกต์ใช้เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส
ผู้เขียน นางวาสนา บัวทอง
สาขาวิชา ชีวเคมี

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อดิศร รัตนพันธ์)

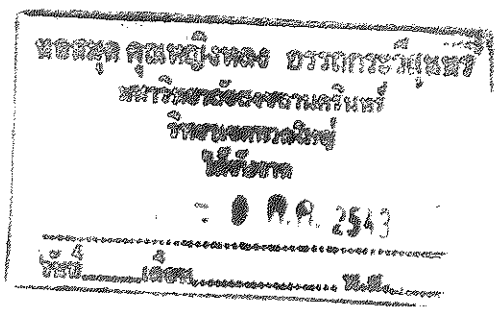
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.นพรัตน์ บำรุงรักษ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตและการประยุกต์ใช้เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส
ผู้เขียน	นางวาสนา บัวทอง
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2542

บทคัดย่อ

เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเป็นในการใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) แต่ปัจจุบันเอนไซม์นี้ยังมีราคาแพง เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการศึกษาวิจัยทางด้านชีวโมเลกุล จึงได้ผลิตเอนไซม์ และตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้ พบว่า จากการผลิตเอนไซม์ทั้งหมด 5 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยความว่องไว 4.42×10^6 ยูนิต จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 100 มิลลิลิตร เอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 9.0 และที่ความเข้มข้น 0.625 mM $MgCl_2$ เอนไซม์ที่ผลิตได้นี้ ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ในกุ้งและอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ในซีรั่มผู้ป่วย พบว่าเอนไซม์ที่แยกสกัดได้สามารถใช้ตรวจหาดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ได้ที่ปริมาณต่ำสุด 25 นาโนกรัม และสามารถตรวจหาอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ได้ที่ปริมาณต่ำสุด 137.5 นาโนกรัม



Thesis Title	Production and Application of *Taq* DNA polymerase
Author	Mrs. Wasana Buathong
Major Program	Biochemistry
Academic Year	1999

Abstract

Taq DNA polymerase is an enzyme essential in performing Polymerase Chain Reaction (PCR) which has recently become a basic technology in research and diagnostic laboratories. In order to reduce the cost of research work in Thailand, recombinant *Taq* DNA polymerase was locally produced, characterized and evaluated in comparison with the commercial *Taq* DNA polymerase sold by Promega, U.S.A. The average activity was 4.42×10^6 unit /100 ml of the bacterial culture. The optimum pH and magnesium concentration were 9.0 and 0.625 mM, respectively. The produced enzyme was proved to be applicable in performing PCR for detecting SEMBV and Dengue virus. The detectable amount of the DNA of the SEMBV and the RNA of the Dengue virus were 25 ng and 137.5 ng, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ได้ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีวเคมี และ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อดิศร รัตนพันธ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำแและตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณแพทย์หญิง สุวิณา รัตนชัยวงศ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ *Taq* DNA polymerase recombinant plasmid ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ ศุภมาศย์ และ คุณ รุ่งเรือง จารุมโนกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างในการทำการวิจัย

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่งที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกๆท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและอบรมสั่งสอน ขอขอบคุณเพื่อนๆในหน่วยคลังเลือดโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ที่ให้ความร่วมมือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วง ท้ายสุดนี้ขอขอบคุณสามีและลูกๆ คุณธีระพล บัวทอง, ด.ญ.รังสินี บัวทอง, ด.ช.ฐากูร บัวทอง และ ด.ช.สหศักดิ์ บัวทอง ที่เป็นกำลังใจอย่างมากให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

วาสนา บัวทอง

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ.....(3)
Abstract.....(4)
กิตติกรรมประกาศ.....(5)
สารบาญ.....(6)
รายการรูป.....(7)
รายการตาราง.....(11)
ตัวย่อและสัญลักษณ์.....(12)
1. บทนำ
บทนำต้นเรื่อง.....1
การตรวจเอกสาร.....2
วัตถุประสงค์.....28
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ
วัสดุ.....29
อุปกรณ์.....33
วิธีการ.....34
3. ผลการทดลอง.....54
4. วิจารณ์ผลการทดลอง.....87
5. สรุปผลการทดลอง.....93
เอกสารอ้างอิง.....95
ภาคผนวก.....103
ประวัติผู้เขียน.....107

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase	6
1.2	แสดงภาพอิเล็กตรอนไมโครกราฟของอนุภาคไวรัส SEMBV ในนิวเคลียส	10
1.3	ลักษณะของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ SEMBV จะปรากฏจุดขาวบริเวณเปลือกระยางค์และลำตัว	11
1.4	กุ้งที่ติดเชื้อไวรัส SEMBV จะมีลักษณะบวมพองของเซลล์ผิวใต้เปลือก (ลูกศรเข้มสีดำ) เปรียบเทียบกับเซลล์ปรกติ (ลูกศรเปิด)	11
1.5	อนุภาคไวรัสเรียงตัวแบบ icosahedral symmetry ซึ่งหมายถึงรูปสามเหลี่ยมด้านเท่า 20 รูป จึงเห็นแคปซิดมีรูปร่างเป็นลูกบาศก์มี 12 มุม	15
1.6	envelope virus หรือเยื่อหุ้มแคปซิด (capsid) ที่มียีโนมขดแน่นอยู่ตรงกลางของแคปซิดมีส่วนของ spike หรือ peplomer ยื่นออกไปโดยรอบ	16
1.7	ภาพ 3 มิติ ของ envelope virus	16
1.8	ยีโนมของไวรัสเด็งกี่ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอมียีนซึ่งกำหนดการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นโครงสร้างและโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้างหลายชนิดที่จะถูกสังเคราะห์ร่วมกันแต่จะถูกตัดแยกออกจากกันในภายหลัง	18
1.9	ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เรียกว่า Atryplymphocyte ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่	19
1.10	แผนภูมิแสดงการเกิดปฏิกิริยา Hemagglutination inhibition	21
1.11	การทดสอบหา IgM จำเพาะ โดยวิธี ELISA	23

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
1.12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Universal primer ที่ใช้สำหรับตรวจแยกชนิดของไวรัสเด็งกี่	27
3.1 แบบแผนของแถบโปรตีนที่ได้จากการทำ SDS-PAGE	63
3.2 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 โดยใช้ PCR buffer ที่ pH ต่าง ๆ	64
3.3 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10, PCR buffer pH 9 และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ต่าง ๆ กัน	65
3.4 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวก	66
3.5 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, U.S.A. ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	67
3.6 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วันและเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวก	68

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.7	แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 วันและเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวก	69
3.8	แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วันและเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวก	70
3.9	แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 และ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	71
3.10	แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10	72
3.11	แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นไวรัส SEMBV เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:1000	73
3.12	แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอของกุ้งที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัส SEMBV เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10	74

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.13	แสดงผลการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 2 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดเจือจาง 1:10 และเอนไซม์ MMLV-RT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆโดยวิธี RT-PCR	75
3.14	แสดงผลการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3, และ 4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 โดยวิธี RT-PCR	76
3.15	แสดงผลการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยวิธี RT-PCR วิเคราะห์บน 2% อะกาโรส เจล	77
3.16	แสดงผลการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยวิธี RT-PCR วิเคราะห์บน 10% โพลีอะคริลาไมด์ เจล	78
3.17	แสดงผลการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:20, 1:25, 1:30 และ 1:35	79
3.18	แสดงผลการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ที่สกัดจากซีรั่มผู้ป่วยโดยวิธี RT-PCR	80

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 แสดงการแปลผลของการตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี Hemagglutination inhibition (HI)	22
2.1 แสดงสารละลายในการเตรียมโพลี อะคริลาไมด์เจล	37
2.2 การเตรียมส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาของ พลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 ด้วยวิธี Polymerase Chian Reaction (PCR)	40
2.3 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR	41
2.4 การเตรียมส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ด้วยวิธี PCR	45
2.5 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR	46
2.6 การเตรียมส่วนผสมในการทำ Reverse Transcriptase (RT) ของอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่	49
2.7 การเตรียมส่วนผสมในการทำ PCR ของ cDNA ไวรัสเด็งกี่	50
2.8 แสดงสารละลายในการเตรียม 10% โพลีอะคริลาไมด์เจล	52
3.1 แสดงผลคุณสมบัติของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้	81
3.2 แสดงผล RT-PCR ของซีรั่มผู้ป่วยในการตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10	82
3.3 แสดงผล RT-PCR บวกของซีรั่มผู้ป่วยสัมพันธ์กับค่า IgM, HI titer และการมีไข้ก่อนมาตรวจ	86

ตัวย่อและสัญลักษณ์

Taq	=	*Thermus aquaticus*
PCR	=	Polymerase Chian Reaction
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
RNA	=	Ribonucleic acid
Pro	=	proline
SEMBV	=	Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus
DHF	=	Dengue hemorragic fever
DSS	=	Dengue shock syndrome
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
HI	=	Hemagglutination inhibition
CF	=	Complement fixation
PRNT	=	Plaque reduction neutralization
MMLV-RT	=	Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase
JE	=	Japanese encephalitis
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
DEPC	=	Diethylpyrocarbonate
DTT	=	Dithiothreitol
PMSF	=	Phenylmethylsulfonylfluoride
IPTG	=	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	N, N, N′, N′-Tetramethylenediamine
Tris	=	tris(hydroxymethyl)aminomethane
BSA	=	bovine serum albumin
Ag	=	antigen
Ab	=	antibody
kDa	=	kilodalton
bp	=	basepair
β	=	beta
Mr	=	apparent molecular weight
pH	=	-log hydrogen ion concentration
umol	=	micromol
ul	=	microlitre
ml	=	millilitre
mM	=	milimolar
mg	=	milligram
ng	=	nanogram
^{o}C	=	degree Celsius
OD	=	Optical Density
%	=	percent

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง เอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงซึ่งไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอนทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ และสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิสูง

ในปัจจุบันมีการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการทดสอบหลายชนิด เช่น การวินิจฉัยโรคไวรัสของพืช (Attathom *et al.*,1990), การตรวจหาเชื้อไวรัส Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) ที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (Takahashi *et al.*,1994), การตรวจหาเชื้อวัณโรค (Eisenach *et al.*, 1990), การตรวจหาเชื้อ HIV (Phair *et al.*,1992) และการตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่ (Dengue virus) ที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออก (Mirawati *et al.*,1997) เป็นต้น แต่เนื่องจากเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งใช้ในเทคนิค PCR ยังมีราคาแพงและต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ มีผลให้การทำเทคนิคดังกล่าว มีต้นทุนที่สูง ซึ่งไม่เหมาะกับการนำมาใช้ในงานวินิจฉัยประจำ ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษา วิธีการผลิตเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เพื่อจะได้เป็นการลดต้นทุนในการทำเทคนิค PCR และได้ศึกษาถึงวิธีการนำเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้ไปประยุกต์ใช้ในด้านการวิจัยและวินิจฉัยโรคในทางการเกษตร ได้แก่ โรคตัวแดงดวงขาว และในทางการแพทย์ ได้แก่ โรคไข้เลือดออก

1.2 บทตรวจเอกสาร

ในปัจจุบันเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในตัวอย่างทางด้านการแพทย์และทางเกษตรกรรม การเพิ่มปริมาณยีนในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ จากดีเอ็นเอแม่พิมพ์เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว โดยทำให้เกิดในหลอดทดลอง แบบซ้ำๆ กันหลายรอบ ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีปริมาณสูงกว่าเดิมหลายล้านเท่า (Mullis *et al.*, 1983) ได้มีรายงานการนำเทคนิคนี้มาใช้ครั้งแรกโดย Saiki และคณะ ในปี ค.ศ. 1985 เพื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนเฉพาะบริเวณใน เบต้า – โกลบินยีน (β - globin gene) จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเม็ดเลือดขาวของคนไข้ที่เป็นโรค Sickle cell anemia และคนปรกติโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งมีเอนไซม์ Klenow fragment ของ *E.coli* DNA polymerase I เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Saiki *et al.*, 1985)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสประกอบด้วย3ขั้นตอน คือ 1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ (double strand DNA) ของดีเอ็นเอต้นแบบ (template)แยกเป็นสายเดี่ยว (single strand)โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90°C - 95°C 2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 50°C - 55°C เพื่อให้ดีเอ็นเอ primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม (complementary base pair) เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 3. ขั้นตอน primer extension (synthesis) เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จาก 5′ ไปทาง 3′ โดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP, dCTP, dTTP และ dGTP เข้าต่อให้เป็นเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ ขั้นตอนนี้อาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่อุณหภูมิเหมาะสม

ในระยะแรกของการศึกษาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอนั้นจะใช้เอนไซม์ Klenow fragment ของ *E. coli* DNA polymerase I เอนไซม์นี้เป็นโมเลกุลเดี่ยวมีน้ำหนัก

โมเลกุล 103 กิโลดาลตัน เมื่อทำการย่อยโมเลกุลของเอนไซม์ DNA polymerase ที่แยกสกัดจาก *E. coli* ด้วยเอนไซม์ protease พบว่าสามารถตัดโมเลกุลของเอนไซม์ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกมีขนาด 36 กิโลดาลตัน เป็นส่วนที่มีบริเวณเร่งของปฏิกิริยา 5′-3′exonuclease ซึ่งเป็นการย่อยโมเลกุลดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ออกจากปลาย 5′ ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ ปฏิกิริยานี้ทำหน้าที่เป็นกลไกตรวจและซ่อมแซมบริเวณที่ผิดพลาด (error-correcting) ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่สร้างเสร็จแล้วและอาจมีการผิดพลาดขึ้นได้ ส่วนที่สองมีขนาด 67 กิโลดาลตันซึ่งมีบริเวณเร่งของปฏิกิริยา polymerase และ 3′- 5′exonuclease เรียกส่วนนี้ว่า Klenow fragment (Klenow *et al.*,1970) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย่อยโมเลกุลดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ออกจากปลาย 3′ อิสระของดีเอ็นเอสายเดี่ยวครั้งละ 1 โมเลกุล ในขณะที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่นั้น ปฏิกิริยานี้ทำหน้าที่ เป็นกลไกป้องกันมิให้เกิดการผ่าเหล่าเนื่องจากมีการนำโมเลกุลของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิดที่ไม่เป็นคู่สมกับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอแม่พิมพ์เข้าไปเชื่อมต่อในปฏิกิริยา polymerase กลไกนี้เรียกว่า Proofreading กล่าวคือ ถ้ามีการนำดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ชนิดที่ผิดคู่เข้าไปเชื่อมต่อกับสายดีเอ็นเอตรงปลาย 3′ อิสระ จะมีการแก้ไขโดยย่อยโมเลกุลดังกล่าวออกไปแล้วนำดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิดที่ถูกต้องเข้ามาเชื่อมต่อ ปฏิกิริยา 2 ประเภทนี้จะทำงานร่วมกันในระหว่างมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ เพื่อป้องกันการผิดพลาดอันเป็นสาเหตุทำให้เกิดการผ่าเหล่าได้ อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR โดยใช้เอนไซม์ Klenow fragment ที่พัฒนาในช่วงเริ่มต้นแม้ว่าจะมีข้อดีในด้านเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูง แต่การใช้เอนไซม์ Klenow fragment ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR นั้นไม่ทนต่อความร้อน (heat labile) ในทุกขั้นตอนของdenaturation ที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์นี้จะสูญเสียสภาพธรรมชาติ ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้จึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปในขั้นตอน primer extension ในทุกรอบของปฏิกิริยา PCR เป็นผลให้ส่วนผสมของปฏิกิริยามีปริมาตรเพิ่มขึ้น และยังสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากเอนไซม์ Klenow fragment มีราคาแพงและใช้ปริมาณมาก นอกจากนี้การเติมเอนไซม์ใหม่ในทุกรอบของปฏิกิริยา PCR เป็นอุปสรรคอย่างยิ่งต่อการทำให้เป็นวิธีอัตโนมัติ (automatic method) จากปัญหาและอุปสรรคของเทคนิค PCR ดังกล่าว ทำให้เกิด

การพัฒนาและปรับปรุงประสิทธิภาพของเอนไซม์ DNA polymerase เพื่อให้เอื้ออำนวยในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง Tindall และคณะ (1988), Lawyer (1989) ได้มีการปรับปรุงเทคนิค PCR ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยใช้การทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่แยกสกัดได้จากแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ในน้ำพุร้อน (*Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Taq* DNA polymerase)

1.2.1 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

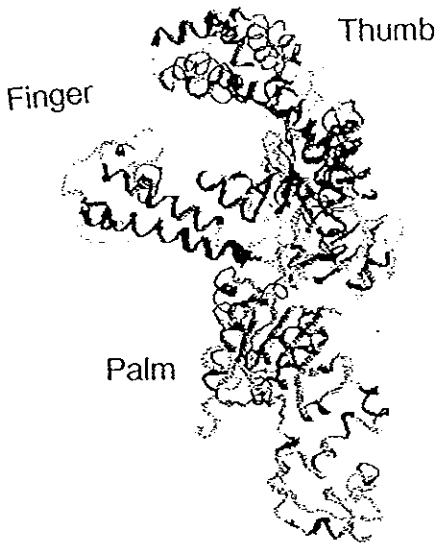
1.2.1.1 คุณสมบัติของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่แยกสกัดจาก Thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq*) ซึ่งแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนใน Yellowstone National Park โดย Brock และ Freeze (1976) เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน (Tindall *et al.*, 1988 ; Lawyer *et al.*, 1989) มีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอนทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ มีค่าความว่องไวจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 200,000 ยูนิต /มิลลิกรัมโปรตีน ไม่มีปฏิกิริยา $3'$- $5'$exonuclease จึงไม่มีคุณสมบัติ proofreading (Tindall *et al.*, 1988) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 75°C-80°C มีค่าคงที่ในการเร่งปฏิกิริยา 150 นิวคลีโอไทด์ /วินาที / เอนไซม์หนึ่งโมเลกุล อัตราเร่งสูงสุดในการนำนิวคลีโอไทด์เชื่อมต่อในสายดีเอ็นเอเท่ากับ 60 โมเลกุล/วินาที ที่อุณหภูมิ 70°C มีอัตราเร่งต่ำสุด 0.25 นิวคลีโอไทด์ /วินาที ที่อุณหภูมิ 25°C มี half life 130 นาที ที่อุณหภูมิ 92.5°C (Innis *et al.*, 1988) มีโอกาสเกิดความผิดพลาดในการนำดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่คู่สมกับโมเลกุลในแม่พิมพ์เข้าเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่กำลังสร้างเท่ากับ10^{-5} error/base และความผิดพลาดในการไม่นำดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์หนึ่งโมเลกุลเข้าไปเชื่อมต่ออันเป็นสาเหตุให้เกิดการผ่าเหล่าแบบอ่านรหัสคร่อม codon (frameshift mutation) เท่ากับ 10^{-6} error/base (Eckert *et al.*, 1990) สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในปฏิกิริยาที่มีแมกนิเซียมอิออน (Mg^{2+}) เป็น cofactor สารเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้คือ dimethyl sulfoxide (DMSO) และ Formamide ที่ความเข้มข้น

ของสารเหล่านี้ 20% มีอัตรายับยั้งเท่ากับ 89% และ 61% ตามลำดับ ส่วน Sodium dodecyl sulphate (SDS) ความเข้มข้นเพียง 0.01% (w/v) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 99.9% (Eckert *et al.*, 1990)

1.2.1.2 โครงสร้างพื้นฐานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มี 2499 base pairs (bp) และมีรหัสสำหรับกรดอะมิโนจำนวน 832 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 94 กิโลดาลตัน (Lawyer *et al* .,1989) ยีนของเอนไซม์ DNA polymerase ที่สกัดจาก *Thermus aquaticus (Taq)* นั้นคล้ายคลึงกับยีนของเอนไซม์ชนิดที่แยกสกัดจาก *E. coli* คือไม่มีส่วน intervening sequence หรือ intron และจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างเอนไซม์ที่แยกสกัดจาก *Thermus aquaticus (Taq)* และเอนไซม์ DNA polymerase I ที่แยกสกัดจาก *E. coli* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 38% (Soo *et al.*,1996) และจากพื้นฐานทางลำดับโครงสร้างปฐมภูมิ โครงสร้างทางผลึกและกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ถูกจัดให้อยู่ใน family เดียวกับ *E.coli* polymerase I เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มีโครงสร้างหลักเป็น alpha helix และ Parallel beta sheets ลักษณะห่อพับ (รูปที่1.1) โดยได้อธิบายลักษณะเป็นรูปมือ (hand) ที่ประกอบด้วย นิ้วมือ (finger), นิ้วหัวแม่มือ (thumb) และฝ่ามือ (palm) โดยในส่วนของนิ้วมือและนิ้วหัวแม่มือจะเป็นส่วนที่เกาะกับ dNTP เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มีกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นในการเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญ โดยเฉพาะประจุบวกของ Arg-659 และ Lys-663 มีการสัมผัสโดยตรงกับประจุลบของ dNTP (Soo *et al.*,1996)



รูปที่ 1.1 โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Soo *et al.*, 1996)

ความสามารถในการคงทนต่อความร้อนของ เอนไซม์ DNA polymerase ที่สกัดจาก *Thermus aquaticus* สามารถทนความร้อนได้มากกว่า เอนไซม์ DNA polymerase I ที่แยกสกัดจาก *E. coli* สาเหตุหนึ่งเนื่องมาจากมีการลดลงของการโค้งงอ (flexibility) ของโครงสร้างทุติยภูมิซึ่งทำให้มีการขดเป็นเกลียวแน่นยิ่งขึ้น แนวโน้มอีกอย่างหนึ่งซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุให้มีการคงทนต่อความร้อนก็คือการพบว่ามีจำนวน Proline (Pro) ในเอนไซม์ DNA polymerase ที่สกัดจาก *Thermus aquaticus (Taq)* 6% ในขณะที่พบจำนวน Prolineในเอนไซม์ DNA polymerase I ที่แยกสกัดจาก *E. colil* 4 % (Korolev *et al.*,1995) และจากการเปรียบเทียบจำนวน hydrogen bond พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิด มีจำนวนของ hydrogen bond มากคล้ายกัน และจากการที่ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มีขนาดเล็กกว่า เอนไซม์ DNA polymerase I ที่แยกสกัดจาก *E. coli* ทำให้นำไปสู่การมีโครงสร้างที่แน่นกว่า และนอกจากนี้ ได้มีการพัฒนาเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ให้มีความสามารถในการทนความร้อน โดยการเชื่อมการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างปฐมภูมิ, ทุติยภูมิ และ ตติยภูมิ (Park *et al.*, 1993; Korolev *et al.*, 1995)

จากสาเหตุดังที่กล่าวมาทำให้เอนไซม์ DNA polymerase ที่สกัดจาก *Thermus aquaticus* มีความสามารถในการทนต่อการเปลี่ยนแปลง เช่น ความร้อนได้ และจากคุณสมบัติดังกล่าวนี้ทำให้นำมาใช้แทนเอนไซม์ klenow fragment เพื่อจะได้เอื้ออำนวยในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตรและทางการแพทย์

1.2.1.3 **การแยกสกัดเอนไซม์** *Taq* DNA polymerase

Lawyer และ คณะ (1989) สามารถโยกย้ายยีนของเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* นำเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ได้เป็นผลสำเร็จ ทำให้สามารถศึกษารายละเอียดในยีนของเอนไซม์นี้มากขึ้น เช่น การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้ง่ายขึ้นโดยการเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้รับการโยกย้ายยีนเข้าไปในเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วแยกสกัดออกจากเซลล์ ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์แล้วจึงนำมาใช้

Pluthero (1993) ได้ทำการแยกสกัดเอนไซม์ โดยใช้โคลนเดียวกับของ Lawyer และ คณะ (1989) ซึ่งในการแยกสกัดนี้ทำให้ง่ายยิ่งขึ้นโดยทำในขั้นตอนเดียว ซึ่งไม่ต้องผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์โดย วิธีโครมาโตกราฟฟี และได้ค่าความว่องไว (enzyme activity) ของเอนไซม์สูงเช่นเดียวกับของ Lawyer และ คณะ คือ 10^6 ยูนิต

Leelayuwat และคณะ (1997) ได้ทำการแยกสกัดเอนไซม์เช่นเดียวกับวิธีของ Pluthero (1993) ได้ค่าความว่องไวของเอนไซม์สูงถึง10^6 ยูนิตเช่นเดียวกัน แล้วได้นำเอนไซม์ที่แยกสกัดได้นี้ มาใช้ในการตรวจหาอัลลีน (allele) ของยีนเอชแอลเอ (HLA) ซึ่งพบว่าได้ผลดี

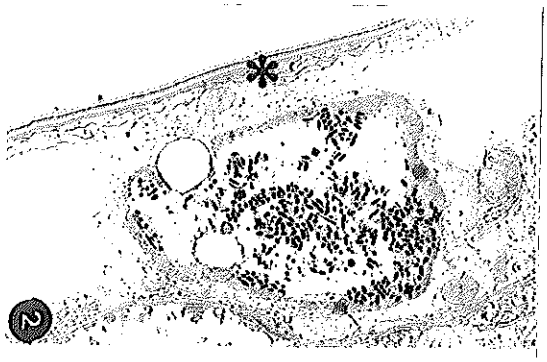
1.2.1.4 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

1.2.1.4.1 การประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรโดยใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

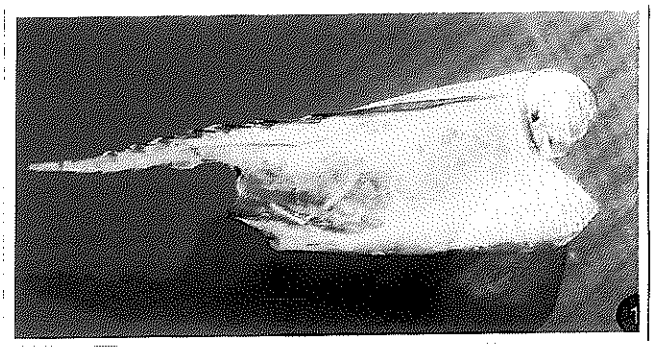
กุ้งกุลาดำ (*Peneaus monodon*) เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าเศรฐกิจสามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายพันล้านบาท นอกจากจะเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศแล้ว ยังเป็นสินค้าที่มีส่วนในการสร้างอุตสาหกรรมต่อเนื่อง ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตน้ำแข็งในต่างจังหวัด อุตสาหกรรมห้องเย็น อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับหีบห่อและการพิมพ์ เป็นต้น นอกจากนี้การค้ากุ้งยังมีส่วนช่วยในการเพิ่มพูนรายได้ให้แก่ ชาวประมงผู้เลี้ยงกุ้ง พ่อค้าแปรรูป ตลอดจนผู้ส่งออก เนื่องจากกุ้งเป็นสินค้าที่มีราคาดีจึงทำให้มีกำไรสูง

มีรายงานการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวอย่างรุนแรงในกุ้งกุลาดำ ในประเทศไทยเมื่อปลายปี พ.ศ. 2537 (Kasornchandra *et al.*,1995 ; Wongteerasupaya *et al.*,1995) โดยพบว่าโรคชนิดนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสชนิด non-occluded virus ชื่อ Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) (Wongteerasupaya *et al.*,1995) พบการติดเชื้อไวรัส SEMBV ในกุ้งหลายชนิดในหลายๆประเทศแถบเอเชีย (Nakano *et al.*,1994 ;Takahashi *et al.*,1994 ; Chou *et al.*,1995 ; Nash,1995 ; Kasornchandra and Boonyaratpalin,1995 ; Inouye *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 1997) นอกจากนี้เชื้อไวรัส SEMBVนอกจากจะมีการแพร่กระจายอยู่ในสัตว์น้ำจำพวกกุ้งแล้วยังสามารถแพร่กระจายในปูและอาร์โทปอด (arthopod) อื่นอีกหลายชนิดและสามารถเป็นพาหะหรือตัวนำเชื้อติดต่อสู่กุ้งกุลาดำได้ ซึ่งสัมพันธ์กับรายงานของ Lo *et al.*, (1996) และ Lo *et al.*, (1997) เชื้อไวรัส SEMBV มีอนุภาคของไวรัสที่เจริญเต็มที่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20 นาโนเมตร และมีความยาวประมาณ 253 ถึง 297 นาโนเมตร ในขณะที่นิวคลีโอแคปซิด (nucle-ocapsid)ของไวรัสชนิดนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 85 นาโนเมตรและมีความยาวประมาณ 223 ถึง 249 นาโนเมตร (รูปที่ 1.2) (Kasornchandra *et al* .,1995) กุ้งที่เป็นโรคเมื่อดูลักษณะภายนอกจะปรากฏจุดขาวบริเวณเปลือกระยางค์และเปลือกลำ

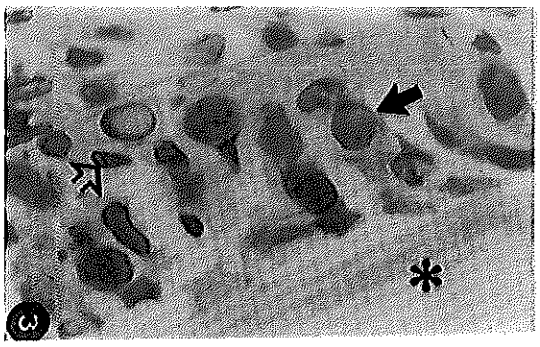
ตัว (รูปที่ 1.3) และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะมีลักษณะบวมพองของเซลล์ผิวใต้เปลือก ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะในการเข้าทำลายเซลล์ของไวรัสชนิดนี้ (รูปที่ 1.4) (Kasornchandra and Boonyaratpalin,1995 ; Wongteerasupaya *et al* .,1995) อย่างไรก็ตามการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาไม่สามารถแยกได้ชัดเจนไปว่าเป็นการติดเชื้อจากเชื้อไวรัส SEMBV เนื่องจากลักษณะการติดเชื้อจากเชื้อไวรัส SEMBV จะมีลักษณะคล้ายกับเชื้อ Yellow head virus (Wongteerasupaya *et al* .,1995) แต่ความรุนแรงมีมากกว่า ดังนั้นถ้าได้การวินิจฉัยที่แม่นยำและถูกต้องจะป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสนี้ได้ เพราะผู้เลี้ยงกุ้งจะมีการเอาลูกกุ้งมาตรวจหาเชื้อไวรัส SEMBV ก่อนจะนำไปเลี้ยงต่อไป เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่ระบาด จึงได้มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส SEMBV จากรายงานการศึกษาการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ที่เป็นสาเหตุของโรคที่ระบาดในกุ้งกุลาดำ ตามที่เคยรายงานไว้โดย Takahashi และคณะ (1994), Ruangsri และคณะ (1999) ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) 2 คู่ ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ 640 bp ซึ่งการตรวจด้วยวิธี PCR นี้สามารถลดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส SEMBV ได้เพราะว่าสามารถตรวจได้ผลอย่างถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว



รูปที่ 1.2 แสดงภาพอิเล็กตรอนไมโครกราฟของอนุภาคไวรัส SEMBV ในนิวเคลียสของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว (Ruangsri *et al.*, 1999)



รูปที่ 1.3 ลักษณะของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ SEMBV จะปรากฏจุดขาวบริเวณเปลือกระยางค์และลำตัว (Ruangsri *et al.*, 1999)



รูปที่ 1.4 กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส SEMBV จะมีลักษณะบวมพองของเซลล์ผิวใต้เปลือก (ลูกศรเข้มสีดำ) เปรียบเทียบกับเซลล์ปรกติ (ลูกศรเปิด) (Ruangsri *et al.*,1999)

1.2.1.4.2 การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์โดยการนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่ (Dengue virus) โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

ก. การระบาดและการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่

ไข้เลือดออก (hemorrhagic ferver)โดยทั่วไปจะหมายถึงโรคที่ผู้ป่วยมีไข้สูงและมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเลือดออกตามผิวหน้า และมีอาการทางระบบทางเดินอาหารได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ตับโต ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการทางสมอง (encephalopathy) และมีอาการทางไตร่วมด้วย (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)ในปัจจุบันพบว่าไข้เลือดออกมีสาเหตุเกิดจากไวรัสอย่างน้อย13 ชนิด อาการของโรคเหล่านี้อาจคล้ายคลึงกันแยกจากกันได้ยาก เชื้อต้นเหตุก่อโรคไข้เลือดออกที่สำคัญในประเทศไทยคือ ไวรัสเด็งกี่ ซึ่งถูกจัดอยู่ใน arbovirus group B ซึ่งเป็นสมาชิก genus Flavivirus Family Flaviviridae ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด (serotype) ได้แก่ ไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 (Mirawati *et al.*,1997) การวิจัยเมื่อประมาณ 20 ปีมาแล้วพบว่าไข้เลือดออกในประเทศไทยร้อยละ 85-90 เกิดจากไวรัสเด็งกี่ และร้อยละ 10-15 เกิดจาก Chikungunya virus ซึ่งมีอยู่เพียงชนิดเดียว แต่ในปัจจุบันไม่ค่อยพบไข้เลือดออกที่มีสาเหตุเกิดจาก Chikungunya virus ทั้ง Dengue และ Chikungunya virus เป็น arbovirus ซึ่งมียุงเป็นพาหะนำเชื้อ ไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิด สามารถทำให้เกิดโรคไข้เลือดออกได้ ในแต่ละปีจะพบชนิดใดชนิดหนึ่งมากกว่าชนิดอื่นๆ ในประ เทศไทยชนิดที่พบเป็นสาเหตุบ่อยที่สุดคือ ชนิดที่ 2 (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

เชื้อไวรัสเด็งกี่ติดต่อโดยมียุงลาย *Aedes aegypti* เป็นพาหะที่สำคัญ วงจรการระบาดเกิดขึ้นโดยที่ยุงไปดูดเลือดคนซึ่งกำลังอยู่ในระยะที่มีเชื้อไวรัสอยู่ในกระแสเลือด เรียกว่า ระยะ viremia เชื้อไวรัสจะเข้าสู่ทางเดินอาหารของแมลงทวีจำนวนในเนื้อเยื่อ เมื่อได้ปริมาณมากแล้วจึงมาอยู่ที่ต่อมน้ำลาย ระยะเวลาดูดเลือดที่มีเชื้อไวรัสเข้าไปจนสามารถปล่อยเชื้อออกจากต่อมน้ำลายได้อีกนี้ เรียกว่า เป็นระยะพักเชื้อภายนอก (extrinsic incubation) เมื่อแมลงมีเชื้อไปกัดคน ไวรัสจะเข้าไปเพิ่มจำนวนในโปรโมโนซัยท์ (promonocyte), โมโนซัยท์ (monocyte) และแมคโครฟาจ

(macrophage) ที่อยู่ในเลือดและอวัยวะต่างๆ และเกิดภาวะ viremia ตามมา โดยที่แมลงนั้นจะแพร่เชื้อไวรัสต่อไปได้ชั่วชีวิต โดยไม่ทำให้เกิดโรคกับแมลงนั้นๆ

การระบาดของไข้เลือดออกพบได้ในประเทศแถบเส้นศูนย์สูตร โดยเฉพาะประเทศในกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยไข้เลือดออกยังเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศจะมีการระบาดรุนแรงเป็นวงจรทุกๆ 3 ปีโดยแต่ละปีจะพบคนไข้เพิ่มขึ้นในช่วงหน้าฝน และคนไข้บางส่วนต้องได้รับการรักษาในโรงพยาบาล

ข. ลักษณะอาการทางคลินิก

การติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ อาจทำให้เกิดอาการดังนี้คือ

1. ติดเชื้อโดยไม่แสดงอาการ

2. เป็นไข้ที่มีลักษณะแยกจากโรคซึ่งเกิดจากสาเหตุอื่นได้ยาก (Undifferentiated febrile illness) ส่วนใหญ่พบในทารกและเด็กเล็ก

3. กลุ่มอาการของไข้เด็งกี่ (Classical dengue fever หรือ dengue fever syndrome) พบในเด็กโตและผู้ใหญ่ ผู้ป่วยจะมีไข้สูง ปวดศีรษะมาก ปวดกระบอกตา ปวดเมื่อยตามข้อและกล้ามเนื้อ มีผื่นที่ผิวหนัง ต่อมน้ำเหลืองโตทั่วไป และการทดสอบทูนิเก้ (tourniquet test) ให้ผลบวก ผู้ป่วยมีอัตราการตายต่ำผู้ที่หายจากโรคจะไม่มีอาการใดๆเหลืออยู่เลย Tourniquet test เป็นการทดสอบความเปราะของเส้นเลือดฝอย ทำได้โดยใช้เครื่องวัดความดันเลือดรัดต้นแขนแล้วเพิ่มความดันขึ้นไปจนถึงค่ากึ่งกลางระหว่าง diastolic และ systolic pressure นาน 5 นาที ถ้ามีจุดเลือดออก (petechiae) ปรากฏขึ้นที่หน้าแขนไม่ต่ำกว่า 20 จุด ในพื้นที่ผิวหนัง 1 ตารางนิ้วถือว่าการทดสอบให้ผลบวก การเพิ่มความดันในหลอดเลือดฝอย จะทำให้หลอดเลือดที่มีความเปราะแตกออก เลือดจึงรั่วออกนอกหลอดเลือด เห็นเป็นจุดเลือดออกที่ผิวหนัง แต่ถ้าเป็นหลอดเลือดปรกติจะทนความดันในขนาดนี้ได้โดยไม่แตก

4. ไข้เลือดออกเด็งกี่ (dengue hemorrhagic fever, DHF) และในผู้ป่วยบางราย อาจมีอาการช็อคร่วมด้วย (dengue shock syndrome, DSS)

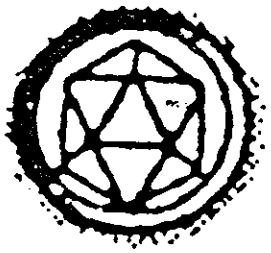
ความรุนแรงของ DHF/DSS จะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสรีรสภาพ คือ ผนังหลอดเลือดยอมให้สารน้ำซึมผ่านออกได้มากขึ้น ทำให้พลาสมารั่วออกนอกหลอดเลือดไปอยู่ตามช่องต่างๆ เช่นพบสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ช่อง

ท้อง และพบว่าค่าอัลบูมินในเลือดต่ำกว่าปรกติ เมื่อพลาสมารั่วออกจากหลอดเลือด จะทำให้เกิดภาวะเลือดข้น ค่าฮีมาโตคริตสูงขึ้น และถ้าสูญเสียพลาสมามากๆ ผู้ป่วยจะเกิดอาการช็อคและถึงแก่กรรม (Lanciotti *et al.*,1992) นอกจากนี้มีการเปลี่ยนแปลงในระบบการแข็งตัวของเลือด เนื่องมาจากหลอดเลือดเปราะและแตกง่าย จึงทำให้การทดสอบ tourniquet ได้ผลบวก มีเกร็ดเลือดต่ำ และหน้าที่ของเกร็ดเลือดบกพร่อง ปัจจัยที่ใช้สำหรับการแข็งตัวของเลือดถูกใช้ไป เกิดภาวะการแข็งตัวของเลือดแพร่กระจายในหลอดเลือด (disseminated intravascular clotting, DIC) มีการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ (complement) เกิดขึ้นโดยตรวจพบระดับของ C_3,C_4 และ factor B ลดต่ำลงอย่างมาก สาเหตุของภาวะเลือดออกนี้เกิดขึ้นได้จากความผิดปกติของหลอดเลือด เกร็ดเลือดต่ำและการแข็งตัวของเลือดเสียไปอาการเลือดออกใต้ผิวหนังมักเกิดจากเส้นเลือดฝอยเปราะและเกร็ดเลือดต่ำ ส่วนภาวะเลือดออกรุนแรงมักเกิดจาก DIC เป็นสำคัญ ความรุนแรงของไข้เลือดออกแบ่งออกได้เป็น 4 ระดับ ด้วยกันคือ Grade I มีไข้ร่วมกับอาการซึ่งไม่จำเพาะอื่นๆ ภาวะเลือดออกจะทราบได้ต่อเมื่อทำการทดสอบ tourniquet แล้วได้ผลบวก Grade II มีอาการเช่นเดียวกับ Grade I แต่พบภาวะเลือดออกได้ชัดเจนขึ้น เป็นจุดเลือดออกที่ผิวหนังหรือเลือดออกจากอวัยวะอื่น Grade III พบความล้มเหลวของระบบการไหลเวียน คือมีชีพจรเต้นเบาและเร็ว ความดันชีพจรแคบกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตรปรอท หรือความดันต่ำ มือเท้าเย็นผู้ป่วยมีอาการกระสับกระส่าย Grade IV ภาวะช็อครุนแรง วัดความดันเลือดและชีพจรไม่ได้

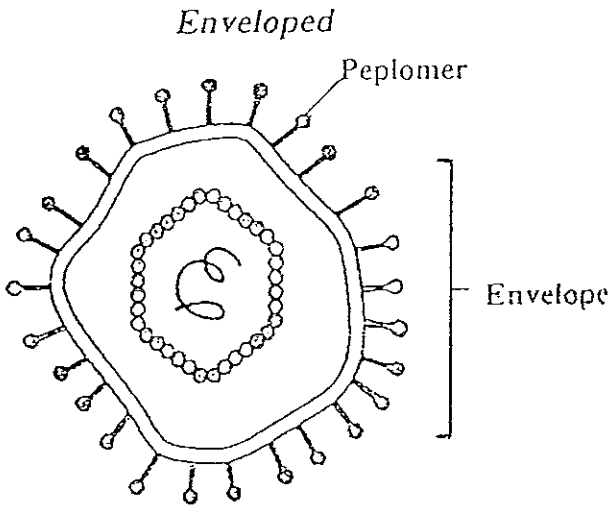
ค. โครงสร้างและยีโนมของไวรัสเด็งกี

ไวรัสเด็งกี่เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวและเป็นสายบวกความยาว 10.5-11.0 กิโลเบส มีขนาด 40-50 นาโนเมตร เป็น envelope virus (ไวรัสที่มีเยื่อหุ้มแคปซิดซึ่งแคปซิดเรียงตัวแบบ icosahedral) (Leland *et al.*,1996)(รูปที่1.5) envelope virus เป็นชั้นไขมัน 2 ชั้น (lipid bilayers) กำเนิดจาก membrane และอาจมีโปรตีนและไกลโคโปรตีนของไวรัสแทรกอยู่ใน membrane นั้น ซึ่งใน envelope virus จะมีโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ matrix protein ทำหน้าที่ในการประสานระหว่างนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) และ envelope ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะไม่มีคาร์โบไฮเดรต นอกจากนั้นยังมีไกลโคโปรตีนเป็น transmembrane protein ที่ฝังอยู่ใน membrane เป็นโปรตีนที่มี

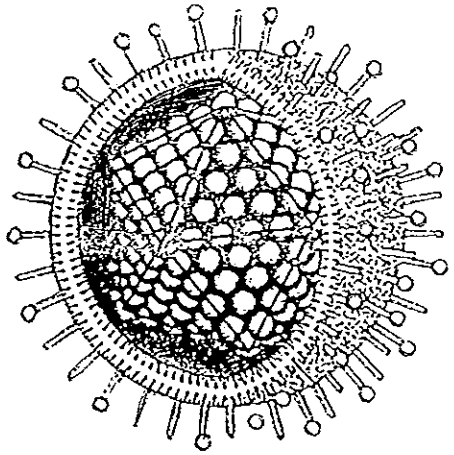
glycosylation และเป็นแอนติเจนสำคัญของไวรัส โดยทำหน้าที่เป็น spike หรือ peplomer ยื่นออกไปโดยรอบ envelope (รูปที่ 1.6 และ1.7) และจะทำหน้าที่เกี่ยวกับ membrane fusion เชื่อมเซลล์หลายเซลล์เข้าด้วยกัน ไวรัสเด็งกี่เป็นไวรัสที่มีสารฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin) เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึม การประกอบขึ้นเป็นอนุภาค (assembly) ภายใน vertebrate cell เกิดขึ้นที่ membrane ของ endoplasmic reticulum และออกจากเซลล์โดยการที่เซลล์แตกสลาย



รูปที่ 1.5 อนุภาคของไวรัสเรียงตัวแบบ icosahedral symmetry ซึ่งหมายถึงรูปสามเหลี่ยมด้านเท่า 20 รูป จึงเห็นแคปซิดมีรูปร่างเป็นลูกบาศก์มี 12 มุม (Leland *et al.*, 1996)

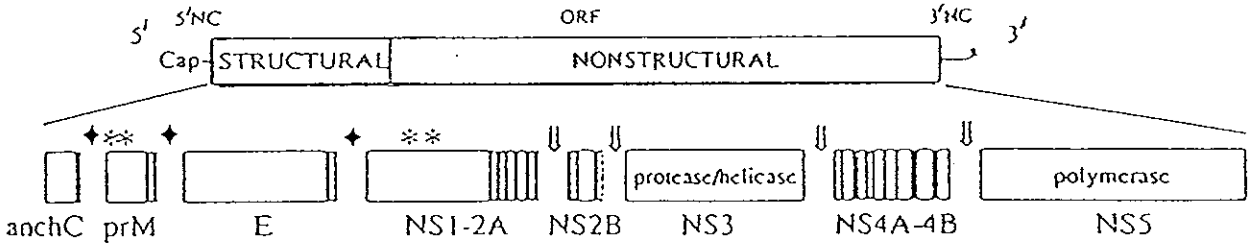


รูปที่ 1.6 envelope virus หรือเยื่อหุ้มแคปซิด (capsid) ที่มียีโนมขดแน่นอยู่ตรงกลาง ของแคปซิดมีส่วนของ spike หรือ peplomer ยื่นออกไปโดยรอบ (Leland *et al.*,1996)



รูปที่ 1.7 ภาพ 3 มิติของ envelope virus (Leland *et al.*,1996)

ยีโนมของไวรัสจะมี 5′capped แต่ไม่มี poly A tail ที่ปลายด้าน 3′ ทางด้านปลาย 5′ และ 3′ มีส่วนที่เป็น noncoding sequence ยีโนมของไวรัสทำหน้าที่เป็น mRNA โดยมี 1 open reading frame แปลรหัสออกมาเป็น polyprotein ขนาดใหญ่ ซึ่งจะถูกตัดออกเป็นโปรตีนชนิดต่างๆ ต่อไป (Jarumanokul,1996 ; Yenchitsomanus *et al.*,1997) (รูปที่ 1.8) ซึ่งโปรตีนที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ โปรตีนที่เป็นโครงสร้าง (Structural protein) และโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้าง (Nonstructural protein, NS) โดยโปรตีนที่เป็นโครงสร้างประกอบด้วยโปรตีนต่างๆ ดังนี้คือ Capsid (C) protein เป็นโปรตีนโครงสร้างของนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13.5 กิโลดาลตัน (kDa) มีคุณสมบัติเป็นเบส, M protein precursor (prM) เป็น glycoprotein precursor มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22 kDa เป็น glycosylated precursor ซึ่งจะถูกย่อยต่อไปเป็น M protein และ N–terminal pr segment, E protein เป็น major envelope protein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55 kDa เป็นส่วนประกอบของอนุภาคที่ทำหน้าที่หลายประการได้แก่ เกาะกับ receptor บนผิวเซลล์ ทำให้เกิด membrane fusion และมี hemagglutinin antibody ป้องกัน immune response ใน host ส่วนโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 48 kDa ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ติดเชื้อ มีหลายชนิด ได้แก่ NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b และ NS5 หน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ยังไม่ทราบชัดเจน



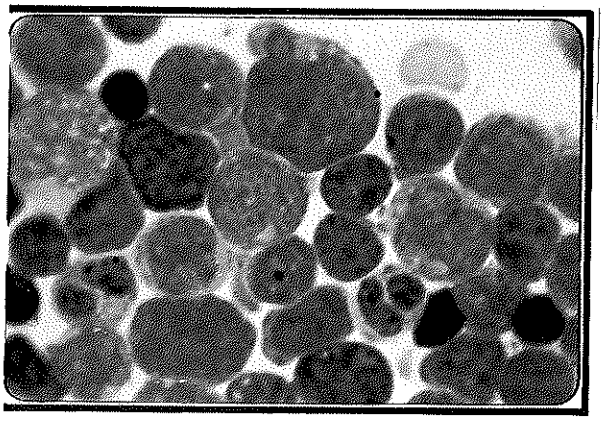
รูปที่ 1.8 ยีโนมของไวรัสเด็งกี่ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอมียีนซึ่งกำหนดการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นโครงสร้างและโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้างหลายชนิดที่จะถูกสังเคราะห์ร่วมกันแต่จะถูกตัดแยกออกจากกันในภายหลัง

(Yenchitsomanus *et al.*, 1996)

ง. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจทางโลหิตวิทยา

ในระยะเริ่มแรกของโรค ปริมาณของฮีโมโกลบิน และเม็ดแลือดแดงมักจะอยู่ในเกณฑ์ปรกติหรืออาจต่ำกว่าปรกติเล็กน้อย ในเวลาต่อมาจะตรวจพบว่าทั้งฮีโมโกลบิน และเม็ดแลือดแดงจะมีการเปลี่ยนแปลง กล่าวคือพอเข้าสู่ระยะที่มีการไหลเวียนล้มเหลวหรือระยะช็อค ระดับของ ฮีโมโกลบิน และเม็ดแลือดแดงจะเพิ่มสูงขึ้นมาก เนื่องมาจากส่วนที่เป็นของเหลวได้รั่วซึมออกไปจากหลอดเลือด ปริมาณของเม็ดเลือดขาวอาจจะอยู่ในเกณฑ์ปรกติ หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงก็ได้ เมื่อทำการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวพบว่าส่วนใหญ่จะเป็นลิมโฟซัยม์ (lymphocyte) ซึ่งจะเป็นชนิดที่เปลี่ยนรูป เรียกว่า Atryplymphocyte คือเซลล์จะโตขึ้นกว่าปรกติและมีแวคูโอล (vacuole) (รูปที่ 1.9) การเปลี่ยนแปลงนี้จะพบได้ในระยแรกๆ ของโรค เกร็ดเลือดจะมีปริมาณอยู่ในเกณฑ์ปรกติหรืออาจจะลดต่ำลง ปริมาณของเกร็ดเลือดจะลดต่ำลงได้สัดส่วนกับความรุนแรงของโรค เนื่องจากการสร้างเกร็ดเลือดโดยเซลล์ในไขกระดูกลดลงและเกร็ดเลือดที่อยู่ในกระแสไหลเวียนในผู้ป่วยไข้เลือดออกยังมีช่วงอายุสั้นกว่าปรกติอีกด้วย



รูปที่ 1.9 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เรียกว่า Atryplymphocyte ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ โดยเซลล์จะมีลักษณะโตกว่าปรกติ

(ประเสริฐ ทองเจริญ , 2530)

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

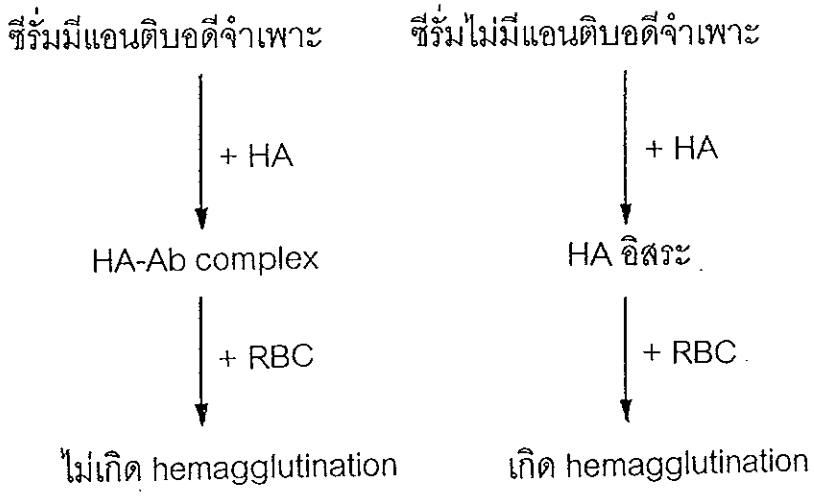
2. การตรวจโดยการแยกเชื้อ

เป็นวิธีที่ให้ผลจำเพาะที่สุด แต่เป็นวิธีที่ค่อนข้างทำได้ยาก ตัวย่างตรวจที่สามารถนำมาแยกเชื้อ คือ เลือด ซีรั่ม พลาสมา ชิ้นเนื้อจาก autopsy เช่น ตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น หรือจากตัวยุงที่เป็นพาหะ ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ เริ่มจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตรวจ (specimen preparation) จากตัวอย่างตรวจที่ได้ต้องนำมาบดเพื่อทำให้ได้สารละลาย แล้วนำไปทำการฉีด (inoculation) โดยอาจจะฉีดเข้าไปในช่องอกของยุงยักษ์ Toxoryhnchitis หรือฉีดเข้าสมองหนู (suckling mice) หรืออาจเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งจะใช้เซลล์ของยุง *Aedes albopictus* แล้วเก็บไว้นาน 10-14 วัน แล้วนำมาตรวจสอบ (detection) ซึ่งในกรณีฉีดเข้าช่องอกของยุงยักษ์จะนำมาตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธีอิมมูนเรืองแสง ถ้าในกรณีที่เลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงจะดูลักษณะการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ (Cytopathic effect,CPE) หรือในกรณีที่ฉีดเข้าสมองหนู จะทำการทดสอบหาแอนติบอดีหลังจากฉีดแล้ว 3-4 อาทิตย์ ซึ่งในระยะที่สามารถทดสอบโดยวิธีการแยกเชื้อได้ ต้องเป็นระยะที่มีเชื้อไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ซึ่งจะมีระยะสั้น เนื่องจากระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเร็วมากและจับไวรัสหมด

3. การตรวจหาแอนติบอดี (Antibody, Ab) ในซีรั่ม

การตรวจหาแอนติบอดีจะต้องเจาะเลือดอย่างน้อย 2 ครั้ง แล้วแยกเอาเฉพาะซีรั่มซึ่งเรียกซีรั่มทั้ง 2 ครั้งว่า ซีรั่มคู่ (pair serum) โดยครั้งแรกเจาะเมื่อเริ่มมีอาการของโรค เรียกเลือดครั้งนี้ว่า acute blood และครั้งที่ 2 เจาะห่างจากครั้งแรก 1-4 สัปดาห์ ซึ่งมักเป็นระยะที่ผู้ป่วยฟื้นจากโรคแล้ว เรียกเลือดครั้งนี้ว่า convalescent blood ในการทดสอบจะนำซีรั่มที่แยกจากเลือดที่เจาะทั้ง 2 ครั้ง มาทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเพื่อดูว่าแอนติบอดีไตเตอร์ (titer) ในเลือดครั้งที่ 2 จะต้องเพิ่มสูงขึ้นจากแอนติบอดีไตเตอร์ในเลือดครั้งแรกอย่างน้อย 4 เท่า (Henchal *et al.*,1991) วิธีที่นิยมใช้ในงานบริการผู้ป่วยคือ วิธี Hemagglutination inhibition test (HI) (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540) และวิธี Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) ตรวจหา IgM จำเพาะ (Henchal *et al.*,1991; White *et al.*,1994; Yenchitsomanus *et al.*,1996) Hemagglutination inhibition test (HI) เป็นวิธีที่ใช้ได้กับเชื้อไวรัสที่มีสาร

hemagglutinin อย่างเช่น เชื้อไวรัสเด็งกี่ เป็นต้น ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงห่านเกาะกลุ่ม ถ้าใส่แอนติเจน hemagglutinin ผสมกับเม็ดเลือดแดงห่าน เม็ดเลือดแดงจะเกิดการเกาะกลุ่ม เรียกปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มนี้ว่า hemagglutination แต่ถ้าผสมแอนติเจนกับซีรั่มที่จะทดสอบเสียก่อน แอนติบอดีในซีรั่มจะทำปฏิกิริยาจับแอนติเจนไว้ ดังนั้นเมื่อเติมเม็ดเลือดแดงห่านลงไป จึงไม่มีแอนติเจน hemagglutinin เหลือมาจับกับเม็ดเลือดแดงอีก เม็ดเลือดแดงจะไม่เกิดการเกาะกลุ่มเนื่องจากแอนติบอดีนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด hemagglutination จึงเรียกแอนติบอดีชนิดนี้ว่า hemagglutination inhibition test (รูปที่ 1.10) ถ้าเป็นการติดเชื้อครั้งแรกจะตรวจพบ HI Ab ประมาณวันที่ 5 ของโรค ถ้าเป็นการติดเชื้อครั้งที่สอง จะตรวจพบแอนติบอดีเกิดขึ้นในระดับสูงอย่างรวดเร็วระดับที่บ่งบอกว่าเพิ่งมีการติดเชื้อเป็นครั้งที่สอง คือ การมี HI antibody ไตเตอร์ ตั้งแต่ 2560 ขึ้นไป แต่ผลการตรวจหาแอนติบอดีจะบอกไม่ได้ว่ามีการติดเชื้อชนิดใด เพราะจะพบสูงทุกชนิด (ตารางที่ 1.1)

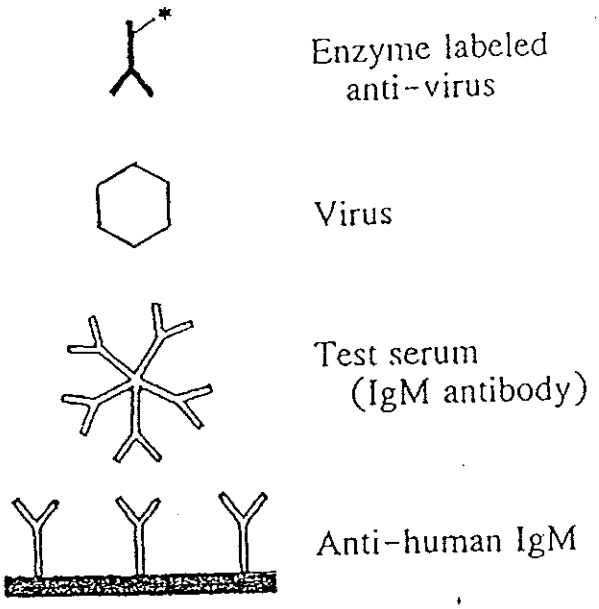


รูปที่ 1.10 แผนภูมิแสดงการเกิดปฏิกิริยา Hemagglutination Inhibition
(พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

ตารางที่ 1.1 แสดงการแปลผล ของการตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธี Hemagglutination Inhibition (HI) (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

HI Ab	เจาะเลือดห่างกัน (วัน)	HI Ab titer ในเลือดครั้งที่ 2	การแปลผล
เพิ่มขึ้น ≥ 4 เท่า	≥ 7วัน	≤ 1280	Primary infection
เพิ่มขึ้น ≥ 4 เท่า	ห่างกันเท่าไรก็ได้	≥ 2560	Secondary infection
เพิ่มขึ้น ≥ 4 เท่า	< 7วัน	≤ 1280	ติดเชื้อ flavivirus บอกไม่ได้ว่าเป็น Primaryหรือ Secondary infection
ระดับคงเดิม	ห่างกันเท่าไรก็ได้หรือมีซีรั่มเดียว	≥ 2560	สันนิษฐานว่าเป็น Secondary infection
ระดับคงเดิม	≥ 7วัน	≤ 1280	ไม่ใช่การติดเชื้อไวรัสเด็งกี่
ระดับคงเดิม	< 7วัน	≤ 1280	แปลผลไม่ได้
-	มีซีรั่มเดียว	≤ 1280	แปลผลไม่ได้

วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีในงานบริการผู้ป่วยอีกวิธีหนึ่ง คือ การตรวจ IgM จำเพาะโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อลดการรบกวนของ rheumatoid factor และ IgG จำเพาะ (Kuno *et al.*,1991 ; White *et al.*,1994) วิธีการนี้จะเคลือบผิวของหลุมในถาดพลาสติกด้วย anti-human IgM เสียก่อนแล้วจึงเติมซีรั่มทดสอบลงไป anti-human IgM จะเลือกจับเฉพาะ human IgM เอาไว้ อิมมูโนโกลบุลินชนิดอื่นจะถูกล้างออกไป แล้วจึงเติมแอนติเจน (Ag) จากนั้นจึงเติมแอนติบอดี (Ab) ที่จำเพาะกับไวรัสซึ่งปิดฉลากด้วยเอนไซม์ (anti-virus Ig-conjugated enzyme) (รูปที่ 1.11)



รูปที่ 1.11 การทดสอบหา IgM จำเพาะ โดยวิธี ELISA (White *et al.*,1994)

ความยุ่งยากของการตรวจหาแอนติบอดีคือไวรัสในกลุ่ม flaviviruses มีแอนติเจนคล้ายกันมาก ในประเทศไทยมักพบว่า convalescent serum ของผู้ป่วยไข้เลือดออกมีแอนติบอดีเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่าต่อไวรัสเด็งกี่มากกว่า 1 ชนิด นอกจากนี้ถ้าเจาะเลือดช้า HI Ab จะเพิ่มระดับรวดเร็วอาจไม่พบการเพิ่มระดับแอนติบอดีในซีรั่มคู่ แต่พบแอนติบอดีไตเตอร์ (titer) ระดับสูงในเลือดทั้ง 2 ครั้ง ถ้าแอนติบอดีไตเตอร์ใน convalescent serum สูงไม่เกินกว่า 1280 จะเป็นการติดเชื้อครั้งแรก แต่ถ้าไตเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 2560 จะเป็นการติดเชื้อครั้งที่ 2 เกณฑ์นี้ตั้งตามการศึกษาวิจัยซึ่งทำที่กรุงเทพฯ (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540) โดยห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายสหรัฐอเมริกา ข้อดีและข้อเสียของการตรวจวินิจฉัยไข้เลือดออกทางห้องปฏิบัติการ โดยวิธีการแยกเชื้อและการตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่มก็คือ การตรวจภูมิคุ้มกันต่อไวรัสสามารถจะกระทำได้ง่ายและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากนัก แต่ตรวจได้เมื่อมีการติดเชื้อในระยะหลังๆ ซึ่งพ้นช่วงระยะมีเชื้อไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ในขณะที่ร่างกายของผู้ป่วยกำลังสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อทำลายไวรัส จึงทำให้การวินิจฉัยโรคล่าช้าการรักษาโรคมักกระทำไปก่อนตามอาการและการตรวจวินิจฉัยในทางคลินิก นอกจากนี้ไม่สามารถตรวจหาการติดเชื้อที่อยู่ภาวะพักของเชื้อ (latent infection) ส่วนการแยกเชื้อไวรัสสามารถจะตรวจได้ในระยะแรกของการติดเชื้อ ขณะที่มีเชื้อไวรัสอยู่ในกระแสเลือดและให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำกว่า แต่วิธีการยุ่งยากซับซ้อนใช้เวลานาน ผู้ตรวจจะต้องมีความชำนาญพิเศษเสียค่าใช้จ่ายมากและมีความไวของการตรวจพบไวรัสต่ำ จากปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ดังกล่าวจึงได้มีการนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาไวรัสเด็งกี่

4. การตรวจโดยใช้เทคนิค PCR

PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่เนื่องจากไวรัสเด็งกี่มียีโนมเป็นอาร์เอ็นเอ ดังนั้นก็จะต้องเปลี่ยนรูปให้เป็นดีเอ็นเอเสียก่อนโดยปฏิกิริยา reverse transcription เอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ เอนไซม์ AMV reverse transcriptase จาก avian myoblastosis virus และ MMLV reverse transcriptase จาก moloney murine leukemia virus เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ อาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ (template) และเมื่อได้ดีเอ็นเอเกิดขึ้นแล้วจึงจะทำ PCR ต่อไป รวมเรียกเทคนิคนี้ว่า Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT–PCR)

จากการศึกษาทบทวนเอกสารรายงานเรื่องการพัฒนาและใช้วิธี PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยไข้เลือดออก พบว่า การตรวจสารพันธุกรรมของไวรัสเด็งกี่ โดยวิธี RT–PCR สามารถจะกระทำได้และมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคในบางระยะของการติดเชื้อ (Deubel *et al* .,1998 ; Henchal *et al* .,1991) มีข้อดีในแง่ของความจำเพาะ ความไวของการตรวจ และความเชื่อถือได้สูง จึงอาจจะมีประโยชน์ในการนำมาใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยไข้เลือดออกทางห้องปฏิบัติการทดแทนการแยกเชื้อไวรัสจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย (Laille *et al*.,1991 ; Morita *et al*., 1991) เมื่อเปรียบเทียบวิธี RT–PCR กับวิธีการแยกเชื้อไวรัสด้วยการเพาะเลี้ยงในเซลล์และการฉีดเข้ายุงแล้ว ทั้งสามวิธีมีความไวของการตรวจใกล้เคียงกัน แต่วิธี PCR ทำได้รวดเร็วกว่า และมีความยุ่งยากซับซ้อนน้อยกว่า อย่างไรก็ตามระยะของการติดเชื้อที่จะตรวจได้ด้วยวิธี RT-PCR คือระยะของการมีไวรัสอยู่ในกระแสเลือด (viremia) เช่นเดียวกับการตรวจโดยการแยกเชื้อไวรัส ซึ่งหากพ้นระยะนี้ไปแล้วทั้งวิธี PCR และการแยกเชื้อไวรัสจะใช้ไม่ได้ผลเหมือน ๆ กัน (Yenchitsomanus *et al*.,1997) การตรวจสารพันธุกรรมของไวรัสเด็งกี่ในแต่ละรายงานจะมีความแตกต่างกันในรายละเอียดต่างๆ เช่นบริเวณของยีนที่เลือกเพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาออกแบบ primer ความยาวของผลผลิต PCR อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนของ PCR และวิธีการตรวจสอบผลผลิตจาก PCR โดยเฉพาะการพยายามเพิ่มความไวของการตรวจด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การทำ hybridization ด้วย probe ที่จำเพาะ (Henchal *et al*., 1991) หรือการทำ nested PCR (Lanciotti *et*

al.,1992) หรือใช้ชุด primer ที่มีความหลากหลาย (multiple primer sets) (Eldadah *et al.*,1991 ; Laille *et al.*,1991 ; Morita *et al.*,1991 ; Pao *et al.*,1992) Mirawati และคณะ (1997) ได้เลือกบริเวณของยีนเพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาออกแบบ primer โดยใช้ universal primer (รูปที่1.12) ซึ่งใช้ primer เพียง 3 primer ซึ่งจำนวน primer ที่ใช้นี้จะน้อยกว่าจากที่เคยมีรายงานมา และจาก primer นี้สามารถตรวจแยกชนิดของไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิดในซีรั่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ในระยะที่มีเชื้อไวรัสในกระแสเลือด โดยทำการทดสอบในขั้นตอนเดียวใช้เวลาทำการทดสอบเร็วกว่าจากที่เคยมีรายงานมา ซึ่งจากรายงานนี้การแยกสกัดอาร์เอ็นเอใช้วิธีซิลิกาซึ่งจะแตกต่างจากรายงานฉบับอื่นที่ใช้ฟีนอลซึ่งเป็นสารที่มีอันตราย การทดสอบมีค่าความไว และความจำเพาะสูง จากข้อดีและข้อได้เปรียบของรายงานฉบับนี้ จึงได้นำมาเป็นแบบในการตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่ในซีรั่มผู้ป่วยซึ่งเป็นซีรั่มที่ได้ส่งตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่วิธี hemagglutination inhibition (HI) และการตรวจหา IgM จำเพาะ วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งการทดสอบจะใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่จากตัวอย่างผู้ป่วยโดยวิธี RT-PCR การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำ PCR มาใช้ในการวินิจฉัยไวรัสเด็งกี่ในเลือดผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นไข้เลือดออก

Sense primers

ALD-1	5′- AAA CCG TGC TGC CTG TAG - 3′
ALD-1b	5′- AAA CTG TGC AGC CTG TAG - 3′

	10,406	10,423
DEN-1	5′- AAA CCG TGC TGC CTG TAG	- 3′
DEN-2	5′- --- -T- --- A-- --- ---	- 3′
DEN-3	5′- --- --- --- --- --- ---	- 3′
DEN-4	5′- --- --- --- --- --- ---	- 3′

Antisense primers

ALD-2	5′- TCT CTC CCA GCG TCA ATA - 3′

	10,634	10,617
DEN-1	5′- TCT CTC CCA GCG TCA ATA	- 3′
DEN-2	5′- --- T-- --- --- --- ---	- 3′
DEN-3	5′- --- --- --- --- --- ---	- 3′
DEN-4	5′- --- T-- --- --- --- ---	- 3′

รูปที่ 1.12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer ที่ใช้สำหรับตรวจแยกชนิดของไวรัสเด็งกี่ (Mirawati *et al.*, 1997)

วัตถุประสงค์

1. สกัดเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส, ตรวจสอบความสามารถ และหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่แยกสกัดได้เพื่อใช้สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction, PCR
2. นำเอนไซม์ที่มีสภาวะเหมาะสมไปประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรโดยการตรวจหาเชื้อไวรัส Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) ที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ โดยใช้เทคนิค PCR
3. นำเอนไซม์ที่มีสภาวะเหมาะสมไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่ (Dengue virus) ที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออกโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chian Reaction (RT-PCR)

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Acetic acid	Merck
Acrylamide	Merck
Ammonium sulfate	Flerka
Bisacrylamide (N,N methylenediacrylamide)	Merck
Bovine serum albumin	Sigma
Calcium chloride	BDH
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck
Glucose	Fluka
Glycerol	Merck
Isoamyl alcohol	Merck
Isopropanol	Merck
Magnesium chloride	Merck
Methanol	Merck
Phenol reagent	Merck
Potassium chloride	Fluka
Sodium acetate	Analytical
Sodium chloride	Analytical
Sodium dodecyl sulfate	Analytical
Tris (hydroxy methyl) aminomethane	Merck
Triton x - 100	Sigma
Tween 20	Sigma
Yeast extract	Difco

2.1.1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Sigma
Ampicillin	Sigma
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
100 bp DNA ladder	Promega
Ethidium bromide	Sigma
Guanidine isothiocyanate	Sigma
Igepal CA–630	Sigma
Isopropyl-1-thio-β-D– galactopyranoside (IPTG)	Sigma
MMLV – reverse transcriptase	Promega
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Sigma
Ribonuclease A	Sigma
Siliga dioxide	Sigma
Taq DNA polymerase	Promega

2.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้คือ *E. coli* (Top1OF ′)มีลักษณะ Genotype : F′ (*pro* AB, *lacI*^{q}, *lacZ*△M15, Tn10 (Tet^{R}) *mcr*A, △ (mrr-hsdRMS-*mcr*BC), ϕ 80lacZ△M15, △*lac*X74, *deo*R, *rec*A1, ara△139, △(ara-leu) 7697, ga*lK*, rpsL (Str^{R}), end A1, *nup*Gλ ซื้อจากบริษัท Invitrogen, The Netherlands

Taq DNA polymerase recombinant plasmid ได้รับความอนุเคราะห์จากแพทย์หญิงสุวิณา รัตนชัยวงศ์ ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.1.2.2 ไวรัส

เชื้อไวรัสเด็งกี่ชนิดที่1, 3 และ 4 เป็นสายพันธ์ Hawaii, สายพันธ์ CH53489 strain และสายพันธ์ 814669 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อนันต์ นิสาลักษณ์ สถาบันวิจัยการแพทย์ทหารกรุงเทพ (Armed Forces Research Institute of medical Sciences, Bangkok, Thailand) เชื้อไวรัสเด็งกี่ ชนิดที่ 2 สายพันธ์ New Guinea ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณรุ่งเรือง จารุมโนกุล หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

2.1.3 อณูชีวโมเลกุล (Molecular molecule)

2.1.3.1 พลาสมิดเวคเตอร์

pPIC3.5

2.1.3.2 Oligonucleotide primer สำหรับใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5

5′-AOX1 primer (5′-GACTGGTTCCAATTGACAGC-3′)

3′-AOX1 primer (5′-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3′)

2.1.3.3 Oligonucleotide primer **สำหรับใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอไวรัส** SEMBV

P1 primer (5′-GACAGAGATATGCACGCCAA -3′)

P4 primer (5′-ACCAGTGTTTCGTCATGGAG -3′)

2.1.3.4 Oligonucleotide primer **สำหรับใช้สังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่**

ALD – 1 primer (5′-AAACCGTGCTGCCTGTAG -3′)

ALD – 1b primer (5′-AAACAGTGCTGCCTGTAG -3′)

ALD – 2 primer (5′- TCTCTCCCAGCGTCAATA -3′)

2.1.4 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งกุลาดำที่มีเชื้อไวรัส Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.กิจการ ศุภมาตย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ซีรั่มผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยาโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

2.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต รุ่น Ultraspec III (Pharmacia)

เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction (Hybrid)

เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis(Advance)

เครื่อง UV light transilluminator (UVP)

กล้องถ่ายรูป Polaroid (Fotodyn)

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น Junior 2000 C (Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorius)

เครื่องวัดพีเอช รุ่น 109 (Action)

เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น Z 382 K (TLG)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Gelman)

ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow (Nerair)

ตู้บ่มเชื้อ 37°C (Heraeus)

ตู้เย็นแช่แข็ง -70°C (REVCO)

หม้อนึ่งความดัน รุ่น HA – 300 M II (Founday)

เครื่องเขย่าความเร็วต่ำรุ่น PR-12 (Taitec)

เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline)

2.3 วิธีการ

2.3.1 การแยกสกัดเอนไซม์*Taq* DNA polymeraseจากเชื้อแบคทีเรีย *E.*coli ที่มี*Taq* DNA polymerase recombinant plasmid (Pluthero, 1993)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.* coli ที่มี *Taq* DNA polymerase ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria Bertani) ชนิดแข็ง ที่ประกอบด้วย Ampicillin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ตลอดคืน หลังจากนั้นนำ 1 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว 5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย Ampicillin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ตลอดคืน แล้วนำ 500 ไมโครลิตร ของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวดังกล่าว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 1 ลิตร ที่ประกอบด้วย Ampicillin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.8 จากนั้นเติม Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 125 มิลลิลิตร/ลิตร แล้วให้เชื้อเจริญต่อไปอีก 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C นำไปปั่นแยกเพื่อแยกเอาตะกอน ที่ความเร็ว 12,000 x g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ละลายตะกอนด้วย บัฟเฟอร์ A (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM Dextrose, 1 mM EDTA) 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย บัฟเฟอร์ A 50 มิลลิลิตร ที่มี 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Lysozyme แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เติม ไลซีสบัฟเฟอร์ (Lysis buffer, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM KCl , 1 mM EDTA , 1 mM PMS, 0.5% Nonidet P40) 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 75°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 x g อุณหภูมิ 4° C นาน 10 นาที แยกเอาส่วนใส แล้วเติม 30 กรัม แอมโมเนียมซัมเฟต/100 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ พร้อมกับเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 x g อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที ละลายตะกอนด้วย บัฟเฟอร์ A 20 มิลลิลิตร แล้วทำการไดอะไลซีส

(dialysis) 2 ครั้ง ๆ ละ 12 ชั่วโมง ใน storage buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 50% Glycerol)ที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากไดอะไลซีสแล้ว เอนไซม์ที่สกัดได้ถูกเจือจาง ในอัตราส่วน 1:1 ด้วย storage buffer และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70° C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3.2 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (Birnboim และ Doly, 1979)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* (Top 10 F´) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว 5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย Ampicillin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 37°C นาน 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่ความเร็ว 3000 x g นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาละลายใน 100 ไมโครลิตร ของสารละลาย I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0,10 mM EDTA) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเติม 200 ไมโครลิตร ของสารละลาย II (0.2 N NaOH, 1% SDS) ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งนาน 5 นาที เติม 150 ไมโครลิตรของสารละลาย III (5 M Potassium acetate 60 มิลลิลิตร glacial acetic acid 11.8 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 28.5 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 15 นาที ดูดเอาส่วนใสใส่ในหลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนใสที่ได้ นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 15 นาที เก็บส่วนตะกอน และล้างด้วย 70% แอลกอฮอล์ 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 5 นาที ทำตะกอนที่ได้ให้แห้ง แล้วละลายตะกอนในน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร เติมสารละลาย RNase ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.3.3 **การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลิอิก** (Sambrook *et al.*, 1989)

สารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2 นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:500 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ คำนวณปริมาณดีเอ็นเอโดยนำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ไปคูณกับความเข้มของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่า OD_{260}= 1 หมายถึง มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร) คุณภาพของกรดนิวคลิอิกที่สามารถหาได้โดยการหาอัตราส่วนของค่า A 260/A 280 ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่บริสุทธิ์

2.3.4 **การตรวจหาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์***Taq* DNA polymerase **ที่แยกสกัดได้ตามวิธี** Lowry *et al.*, 1951

เติมเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม Reagent A (Alkaline copper tartate Solution บริษัท BIO-RAD, U.S.A.) ลงไป 60 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Reagent B (Folin Reagent บริษัท BIO-RAD, U.S.A.) ลงไป 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง เป็น blank คำนวณค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

2.3.5 การทดสอบหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ โดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis, SDS–PAGE) ตามวิธี ของ Laemmli (1970)

2.3.5.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล

โพลีอะคริลาไมด์เจล ที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (Stacking gel) และเจลส่วนล่าง (separating gel) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจล ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงสารละลายในการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล

ส่วนประกอบ	Stacking gel 5% (5 มิลลิลิตร)	Separating gel 8% (3 มิลลิลิตร)
30%Acrylamide-0.8%bisacrylamide	0.8 มิลลิลิตร	0.8 มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl , pH 6.8	1.25 มิลลิลิตร	_
1.5 M Tris-HCl , pH 8.8	_	0.7 มิลลิลิตร
10% SDS	50 ไมโครลิตร	30 ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	50 ไมโครลิตร	30 ไมโครลิตร
TEMED	5 ไมโครลิตร	3 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	2.80 มิลลิลิตร	1.50 มิลลิลิตร

2.3.5.2 การทำอิเล็กโทรฟอริซิส

ในการเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานโดยการผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับ บัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris – HCl pH 6.8, 40 % glycerol, 8 mM EDTA, 4% SDS (Sodium dodecyl sulfate) 4% β - mercaptoethanol และ 0.4% bromophenolblue ให้ได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้น 0.05 และ1.0 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร โดยก่อนทำอิเล็กโทรฟอรีซิส นำสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน ไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง จากนั้น นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ Laemmli running pH 8.3 (0.025 M Tris – HCl, 0.192 M glycine,1%SDS, pH 8.3) เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 0.5 เซนติเมตร ปิดกระแสไฟแล้วนำเจลไปย้อมสีด้วยสี Coomassie brilliant blue R 250 แช่เจลในสารละลาย 0.02% Coomassie brilliant blue R250, 50 % methanol, 7.5% acetic acid นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละ ลาย 50% methanol, 7.5% acetic acid นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วยสารละลาย 5% methanol, 7.5% acetic acid จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

2.3.6 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

2.3.6.1 หาค่า pH ที่เหมาะสมของ PCR buffer (10 x buffer) ในการทำปฏิกิริยา PCR

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ในข้อ 2.3.1 นำมาเจือจางด้วย storage buffer 1:10 แล้วเตรียม PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris – HCl , 0.1% Triton X-100, 1.0 mM $MgCl_2$) ปรับ pH ให้ได้ค่าต่าง ๆ ดังนี้ คือ 8.0, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0, 9.2 และ 9.4 แล้วนำเอนไซม์ที่เจือจาง 1:10, PCR buffer ที่เตรียมและปรับให้มีค่า pH ต่าง ๆ 25 mM $MgCl_2$ (Promega,U.S.A.) ไปทดสอบกับพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2 ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยทำการทดสอบเทียบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิต/ไมโครลิตร, PCR buffer pH 9, 25mM $MgCl_2$ (Promega , U.S.A.) ด้วยวิธี PCR โดยใช้ 5′ AOX1 primer กับ 3′ AOX1 primer ซึ่งปฏิกิริยาการทดสอบ แสดงในตารางที่ 2.2 และสภาวะที่ทำปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 2.3

2.3.6.2 การตรวจผลผลิต PCR

โดยใช้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละช่องของ 1.5% agarose gel ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสใน 1 x TAE บัฟเฟอร์ เปิดกระแสไฟคงที่ 100 โวลต์ จนกระทั่งสี bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดกระแสไฟแล้วนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นนำไปส่องดูด้วยแสง ultra-violet บริเวณที่มีดีเอ็นเอจะปรากฏเป็นแถบเรืองแสง และบันทึกผลโดยการถ่ายรูป

ตารางที่ 2.2 การเตรียม ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาของพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	Control ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 (200นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	1	1
10 x buffer pH 8.0, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0, 9.2, 9.4	1	-
10 x buffer (Promega, USA)	-	1
25 mM $MgCl_2$	0.25	0.25
10 mM dNTP	0.25	0.25
5′AOX1 primer (0.1นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	0.25	0.25
3′AOX1 primer (0.1นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	0.25	0.25
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	6	6.75
เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ (เจือจาง)	1	-
เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (promega, USA)	-	0.25
ปริมาตรรวม	10	10

ตารางที่ 2.3 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hot start	94° C	2 นาที	1
2. Denaturation	94° C	1 นาที	25
3. Annealing	55° C	1 นาที	25
4. Extension	72° C	1 นาที	25
5. Final Extension	72° C	7 นาที	1

2.3.6.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgCl_2$ ในการทำปฏิกิริยา PCR

จากการทดสอบตามข้อ 2.3.6.1 จะได้ PCR buffer ที่มีค่า pH ที่เหมาะสมเมื่อทดสอบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10 จากนั้นเตรียม 25 mM $MgCl_2$ แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี PCR โดยการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา PCR ดังนี้คือ 0.625, 1.25, 1.87, 2.5 และ 3.125 mM $MgCl_2$ ซึ่งใช้ปริมาตรของ 25 mM $MgCl_2$ ดังนี้คือ 0.25, 0.5, 0.75,1.0 และ 1.25 ไมโครลิตรตามลำดับ โดยทำการทดสอบเทียบกับ 0.25 ไมโครลิตร ของ 25 mM $MgCl_2$ (Promega, U.S.A.) ปฏิกิริยาการทดสอบแสดงในตารางที่ 2.2 และสภาวะที่ทำปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 2.3 วิเคราะห์ดีเอ็นเอจาก PCR product ที่ได้โดยนำไปแยกบน 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide บันทึกผลโดยการถ่ายรูปเช่นเดียวกับข้อ 2.3.6.2

2.3.7 การหาความว่องไวของเอนไซม์*Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้โดยวิธีการเปรียบเทียบกับความว่องไวของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากบริษัท Promega, U.S.A. ด้วยวิธี PCR

ทำการแยกสกัดเอนไซม์เพิ่มอีก 4 ครั้ง โดยทำวิธีเดียวกับข้อ 2.3.1 แล้วนำเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ทั้งหมด มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 2.3.4 จากนั้นนำเอนไซม์ทั้งหมด 5 ครั้ง มาเจือจางด้วย storage buffer ดังต่อไปนี้ คือ 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1000 และ 1:1200 แล้วนำเอนไซม์ที่เจือจางแล้วนี้, PCR buffer ที่มี pH เหมาะสมจากการทดสอบตามวิธีข้อ 2.3.6 และ $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมไปทดสอบกับพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 ที่สกัดได้จากข้อ 2.3.2 ซึ่งทำให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาการทดสอบดังข้อ 2.3.6.3 ในขณะเดียวกันทำการเปรียบเทียบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, U.S.A. เพื่อหาความว่องไวของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ โดยทำการเจือจางเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, U.S.A. ให้มีความเข้มข้นดังนี้คือ 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.125 ยูนิต/ไมโครลิตร แล้วนำเอนไซม์ที่เจือจางแล้วนี้ไปทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวมาข้างต้นโดยใช้ PCR buffer และ 25 mM $MgCl_2$ ของบริษัท Promega, U.S.A.

2.3.8 การทดสอบหาสภาพความคงทนของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ด้วยวิธี PCR

จากเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้งหมด 5 ครั้งดูดแบ่งใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ 5 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมง และ 7, 15, 30 วัน จากนั้นนำมาเจือจางด้วย storage buffer ที่เจือจางที่สุดที่สามารถเร่งปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของแต่ละเอนไซม์ที่ทดสอบได้จากข้อ 2.3.7 แล้วนำเอนไซม์ทั้งหมดที่เจือจางแล้วนี้ไปทดสอบกับพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 ที่ทำให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

โดยทำการทดสอบเทียบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCRบวกโดยที่ไม่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องด้วยวิธี PCR โดยใช้ 5′ AOX 1 primer กับ 3′ AOX 1 primer, 25 mM $MgCl_2$ ความเข้มข้นที่เหมาะสม (ผลจากการทดสอบดังข้อ 2.3.6.3) และ PCR buffer ที่มี pH ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบตามวิธีข้อ 2.3.6

2.3.9 การนำเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้มาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรโดยนำมาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำไปตรวจหาเชื้อไวรัส Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) DNA ที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

นำดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากกุ้งกุลาดำที่ถูกฉีดเชื้อไวรัส SEMBV เข้าไป ซึ่งนำมาทำเป็น positive control มาหาปริมาณความเข้มข้นโดยวิธี spectrophotometry และเจือจาง positive control ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัม /ไมโครลิตร แล้วนำมาทดสอบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10, PCR buffer ที่มี pH ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบตามวิธีข้อ 2.3.6 และ 25 mM $MgCl_2$ ที่ปริมาตร 0.5, 0.75 และ 1.0 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยา PCR ดังนี้คือ 0.5, 0.75 และ 1.0 mM โดยทำการทดสอบเทียบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase, PCR buffer และ 25 mM $MgCl_2$ ของบริษัท Promega, U.S.A. ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer P1 กับ primer P4 ความเข้มข้น ชนิดละ 1 ไมโครโมล/ไมโครลิตร ปฏิกิริยาการทดสอบแสดงในตารางที่ 2.4 และสภาวะที่ทำปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 2.5 วิเคราะห์ดีเอ็นเอจาก PCR product ที่ได้ โดยนำไปตรวจสอบด้วยการแยกบน 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide บันทึกผลโดยการถ่ายรูป จากการทดสอบนี้จะได้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม

ทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุด และตัวอย่างของดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งกุลาดำที่สงสัยว่าจะติดเชื้อไวรัส SEMBV ที่สามารถทดสอบโดยใช้ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ครั้งที่ 4 โดยทำการเจือจาง positive control ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้คือ 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25, 10 และ 5 นาโนกรัม / ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ปริมาณของดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ดังนี้คือ 2500, 2250, 2000, 1750, 1500, 1250, 1000, 750, 500, 250, 125, 62.5, 25 และ 12.5 นาโนกรัม นำ positive control ที่เจือจางแล้วนี้และดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำทั้งหมด 5 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10 และ 1:1000 ซึ่งทดสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer P1 กับ primer P4, $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและ PCR buffer ที่มี pH ที่เหมาะสมแล้ว ปฏิกิริยาการทดสอบแสดงในตารางที่ 2.4 และสภาวะที่ทำปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 2.5 วิเคราะห์ดีเอ็นเอจาก PCR product ที่ได้โดยนำไปตรวจสอบด้วยการแยกบน 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide บันทึกผลโดยการถ่ายรูป

ตารางที่ 2.4 การเตรียมส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ด้วยวิธี PCR

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอไวรัส SEMBV	2.5
10 x buffer	2.5
25 mM $MgCl_2$	0.75
10 mM dNTP	0.5
Primer P1 (1ไมโครโมล/ไมโครลิตร)	1.25
Primer P4 (1ไมโครโมล/ไมโครลิตร)	1.25
Taq DNA polymerase (ที่เจือจาง)	1
น้ำกลั่นที่ sterile	15.25
ปริมาตรรวม	25

ตารางที่ 2.5 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hot start	95°C	1 นาที	1
2. Denaturation	95°C	30 วินาที	29
3. Annealing	57°C	30 วินาที	29
4. Extension	72°C	1 นาที	29
5. Final Extension	72°C	10 นาที	1

2.3.10 การนำเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้มาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่ ที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออก ด้วยวิธี Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2.3.10.1 การเตรียมซิลิกาเพื่อสกัดอาร์เอ็นเอ ตามวิธีของ Boom *et al*., 1990

ชั่งซิลิกา (Sio_2) 60 กรัม แล้วเติม deionized water ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในกระบอกแก้วตวงสูง 27.5 เซนติเมตร กว้าง 5 เซนติเมตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตกตะกอน แล้วดูดเอาส่วนใสออก ปริมาตร 430 มิลลิลิตร เติม deionized water ลงไปให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง จากนั้น ดูดเอา

ส่วนใสออกปริมาตร 440 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริค (32%น้ำหนัก/ปริมาตร) 600 ไมโครลิตร ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 2 จากนั้นล้างด้วย deionized water โดยการเติมลงไปให้ได้ปริมาตร ประมาณ 400 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสออกประมาณ 340 มิลลิลิตร เก็บซิลิกาที่เตรียมเสร็จแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยเก็บในที่มืดได้อย่างน้อย 6 เดือน

2.3.10.2 **การเตรียมอาร์เอ็นเอโดยวิธีซิลิกา ดัดแปลงจาก** Boom et *al*., 1990

ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ใช้เลี้ยงไวรัสเด็งกี่ ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อและ RNase เติม 180 ไมโครลิตร Lysing buffer (4M guanidine isothiocyanate, 40mM Tris-HCl pH 6.7, 17 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100) และเติม 8 ไมโครลิตร ซิลิกาที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.10.1 ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g 15 วินาที ล้างตะ กอนซิลิกาด้วย 200 ไมโครลิตร washing buffer (50% ethanol, 10 mM Tris – HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) และปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g 15 วินาที โดยล้างตะกอนซิลิกาด้วย washing buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งสุดท้าย Rinse ด้วย 100 ไมโครลิตรน้ำปราศจากเชื้อที่ทำให้สะอาดด้วย DEPC (Diethyl pyrocarbonate) นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g 15 วินาที ละลายตะกอนด้วย 15 ไมโครลิตร น้ำปราศจากเชื้อที่ทำให้สะอาดด้วย DEPC แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 56° C นาน 7 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 2 นาที ดูดเอาส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20° C เพื่อทำการทดสอบต่อไป

2.3.10.3 **การวัดปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ** (Sambrook et *al.*,1989)

สารละลายอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.10.2 นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:500 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ คำนวณปริมาณอาร์เอ็นเอโดยนำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ไปคูณกับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่า OD_{260} = 1 หมายถึง มีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) คุณภาพของกรดนิวคลิอิกที่สามารถหาได้ โดยการหาอัตราส่วนของค่า A260/A280 ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าได้สายอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์

2.3.10.4 **การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาไวรัสเด็งกี่ด้วยวิธี** RT-PCR

ก. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ MMLV-RT

นำอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 2 ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.10.2 นำมาทำให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำมาใช้สังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยา ของเอนไซม์ MMLV-RT ที่ความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 5 ยูนิต/ไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2.6 โดยในการสังเคราะห์ใช้ 5′ALD2 primer ความเข้มข้น 25 พิโคโมล/ไมโครลิตร เป็น antisense primer จากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 30 นาที เพื่อให้มีการสังเคราะห์ cDNA ภายหลังการสังเคราะห์ cDNA จะทำปฏิกิริยา PCR ต่อเนื่องกันไปดังแสดงในตารางที่ 2.7 โดยมีการเติม 3′ - ALD 1 primer, 3′- ALD 1b primer และ 5′- ALD 2 primer ความเข้มข้น ชนิดละ 25 พิโคโมล/ไมโครลิตร ซึ่งทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 โดยใช้ PCR buffer pH ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบตามวิธีข้อ 2.3.6 และ 25 mM $MgCl_2$ ที่เตรียม สภาวะที่ทำปฏิกิริยามีดังนี้ 92°C 1 นาที, 53°C 1 นาที และ 72°C 1 นาที ทั้งหมด 10 รอบ 92°C 30 วินาที, 55°C 30 วินาที และ 72°C 30

วินาที ทั้งหมด 30 รอบ และ 72°C 5 นาที จากการทดสอบนี้จะได้ความเข้มข้นของเอนไซม์ MMLV-RT ที่เหมาะสม ตรวจผลผลิต PCR โดยใช้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละช่องของ 2% agarose gel ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสใน 1 x TAE บัฟเฟอร์ เปิดกระแสไฟคงที่ 100 โวลต์ จนกระทั่งสี bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล ประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดกระแสไฟแล้วนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide นำมาส่องด้วยแสง ultraviolet แล้วบันทึกผลโดยการถ่ายรูป

ตารางที่ 2.6 การเตรียมส่วนผสมในการทำ Reverse Transcriptase (RT)ของอาร์เอ็นเอไวัสเด็งกี่

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่	5.5
5 x RT buffer	2.0
0.2 mM dNTP	0.5
5′ ALD 2 primer (25 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.5
MMLV – RT (12.5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	1.0
น้ำกลั่น sterile ที่ treat ด้วย DEPC	0.5
รวมปริมาตร	10.0

นำส่วนผสมที่ได้นี้ ไปไว้ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 30 นาที หลังจากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆ ตามตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 การเตรียมส่วนผสมในการทำ PCR ของ cDNA ไวรัสเด็งกี่

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
cDNA	10
10 x buffer	1.5
25 mM $MgCl_2$	0.5
0.2 mM dNTP	0.5
5′- ALD 2 primer (25 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.5
3′- ALD 1 primer (25 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.5
3′- ALD1b primer (25 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.5
Taq DNA polymerase ที่สกัดได้ (เจือจาง)	1.0
น้ำกลั่น sterile ที่ treat ด้วย DEPC	10
รวมปริมาตร	25

ข. การทดสอบหาความเข้มข้นน้อยที่สุดของอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ที่สามารถทดสอบได้ด้วยวิธี RT-PCR

เจือจางอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิดให้มีความเข้มข้น 100, 50 และ 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ คือ 550, 275 และ 137.5 นาโนกรัม แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ MMLV-RT และ primer ที่เหมาะสม ที่ได้จากข้อ ก. และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10 โดยทำในสภาวะที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ ก. จากการทดสอบนี้จะได้อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิด ที่มีความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถให้ผล PCR บวก

ค. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์*Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้

นำอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดของแต่ละชนิดนี้ มาทดสอบด้วยปฏิกิริยา RT-PCR โดยเอนไซม์ MMLV-RT ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมและเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:20, 1:25, 1:30 และ1:35, PCR buffer pH ที่เหมาะสมและ 25 mM $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยทำในสภาวะที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ ก.

2.3.10.5 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่มีเอสดีเอส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ

โดยใช้ผลผลิต PCR ของไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละช่องของ 10% โพลีอะคริลาไมด์เจล ส่วนประกอบของเจลแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 แสดงสารละลายในการเตรียม 10% โพลีอะคริลาไมด์เจล

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (10 มิลลิลิตร)
30% Acrylamide – 0.8% bisacrylamide	3.3 มิลลิลิตร
10 x TBE	1.0 มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	150 ไมโครลิตร
TEMED	9 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	5.67 มิลลิลิตร

ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสใน 1 x TBE บัฟเฟอร์ เปิดกระแสไฟคงที่ 100 โวลต์ จนกระทั่งสี bromophenolblue เคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 0.5 เซนติเมตร ปิดกระแสไฟแล้วนำแผ่นเจลไปย้อม ethidium bromide นำมาส่องด้วยแสง ultraviolet แล้วบันทึกผลโดยการถ่ายรูป

2.3.11 การนำเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่มีสภาวะที่เหมาะสมมาตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่ในซีรั่มผู้ป่วย ด้วยวิธี RT–PCR

เลือกเก็บตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยจำนวน 90 ตัวอย่างที่สงสัยว่าจะมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ จากหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และค้นหาประวัติการเป็นไข้จากหน่วยเวชระเบียนโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และเก็บตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยที่เป็น Leptospirosis เพื่อนำมาทำเป็น negative control ตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยที่เลือกเก็บได้ นำมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนจะทำการทดสอบต่อไป จากนั้นนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ ตามวิธีข้อ 2.3.10.2 เพื่อทำปฏิกิริยา RT–PCR ด้วยเอนไซม์ MMLV–RT, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้, PCR buffer pH 9, $MgCl_2$ และ primer ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยทำการทดสอบตามตารางที่ 2.6 และ 2.7 ซึ่งทำในสภาวะที่ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ ก. ตรวจผลผลิต PCR ที่ได้โดยทำการตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis แล้วทำการย้อมด้วย ethidium bromide บันทึกผลโดยการถ่ายรูป

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การแยกสกัดเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มี *Taq* DNA polymerase recombinant และการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

จากการแยกสกัดเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ตามวิธีข้อ 2.3.1 โดยได้ทำการแยกสกัดเอนไซม์ทั้งหมด 5 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งของการแยกสกัดได้ปริมาณจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 100 มิลลิลิตร ดังนี้ คือ 580, 600, 550, 600 และ 570 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้ง มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีข้อ 2.3.4 ได้ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนจากการแยกสกัดเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase แต่ละครั้งดังนี้คือ 4.8, 4.5, 4.6, 6.6 และ 5.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และได้ค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein) ดังนี้คือ 2.78, 2.7, 2.53, 3.96 และ 3.13 มิลลิกรัม ตามลำดับ

3.2 การทดสอบหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้โดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แบบเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ถูกนำมาแยกในสารละลาย 5% stacking gel และ 8% separating gel โดยวิธี SDS-PAGE โดยนำมาแยกเทียบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท promega, U.S.A. จากการทดสอบพบว่า เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท promega ปรากฏแถบที่ชัดที่สุดที่ตำแหน่ง ประมาณ 94 กิโลดาลตัน ส่วนเอนไซม์ *Taq* DNA

polymerase ที่แยกสกัดได้ปรากฏแถบที่ชัดเจนที่สุดอยู่ที่ตำแหน่งประมาณ 94 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกัน (รูปที่ 3.1)

3.3 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ด้วยวิธี PCR

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งแรก นำมาเจือจางด้วย storage buffer 1:10 แล้วนำเอนไซม์ที่เจือจางแล้วนี้ ไปทดสอบกับดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2 ซึ่งได้ความเข้มข้น 2625 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากผลการทดสอบ โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ PCR buffer pH 8.0, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0, 9.2 และ 9.4 ที่เตรียมพบว่า PCR buffer pH 8.2 ถึง 9.4 ให้ผล PCR บวก มีขนาดของดีเอ็นเอ 260 bp เมื่อถูกทำให้เพิ่มจำนวนขึ้นโดยใช้ 5′AOX1 และ 3′AOX1 primer และดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เป็นแม่แบบ ซึ่ง ทดสอบกับ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10 และที่ PCR buffer pH 9 ให้ผล PCR บวกดีที่สุด ส่วน PCR buffer pH 8.0 ให้ผล PCR ลบ (รูปที่ 3.2) และจากการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และทดสอบด้วย เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10 และ PCR buffer pH 9 ด้วยวิธี PCR พบว่าที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 1.87, 2.5 และ 3.125 mM $MgCl_2$ สามารถให้ผล PCR บวกเช่นเดียวกับ $MgCl_2$ ของบริษัท Promega, U.S.A. แต่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.87 ถึง 3.125 mM $MgCl_2$ แถบเริ่มไม่คมชัด (รูปที่ 3.3) ดังนั้นจึงใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.625 mM ในการทดลองต่อไป

3.4 การหาความว่องไวของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้โดยวิธีการเปรียบเทียบกับความว่องไวของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากบริษัท Promerga, U.S.A. ด้วยวิธี PCR

จากเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ทั้งหมด 5 ครั้ง มาเจือจางด้วย storage buffer ตามวิธีข้อ 2.3.7 แล้วนำเอนไซม์ที่เจือจางแล้วนี้ไปทดสอบกับดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยใช้ PCR buffer pH 9 และ 0.25 ไมโครลิตร ของ 25 mM $MgCl_2$ ที่เตรียมซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.625 mM จากผลการทดสอบ โดยวิธี PCR พบว่าค่าเอนไซม์ที่เจือจางสุดท้ายที่สามารถให้ผล PCR บวก แต่ละครั้งมีค่าดังนี้ คือ 1:800, 1:600, 1:600, 1:1000 และ 1:800 ตามลำดับ (รูปที่ 3.4) และจากการเปรียบเทียบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, U.S.A. เพื่อหาความว่องไวของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ โดยทำการเจือจางเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega U.S.A. ให้มีความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.125 ยูนิต/ไมโครลิตร พบว่าความเข้มข้นสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวกคือที่ความเข้มข้น 1 ยูนิต/ไมโครลิตร (รูปที่3.5) จากผลการทดสอบที่ได้นี้จะใช้เปรียบเทียบค่าของ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ซึ่งได้ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ดังนี้ คือ 800, 600, 600, 1000 และ 800 ยูนิต/ไมโครลิตร และได้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้แต่ละครั้งดังนี้คือ 4.6×10^6, 3.6×10^6, 3.3×10^6, 6.0×10^6และ 4.5×10^6 ยูนิต ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1)

3.5 การทดสอบหาสภาพความคงทนของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ด้วยวิธี PCR

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ในแต่ละครั้งนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องตามวิธี ข้อ 2.3.8 แล้วจึงนำมาทำการเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวก ของเอนไซม์ที่แยกสกัดได้แต่ละครั้ง เพื่อไปทดสอบกับดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตรโดยทำการทดสอบเทียบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 ซึ่งเจือจาง 1:600 ที่ไม่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องตามวิธีข้อ 2.3.8 จากผลการทดสอบ พบว่า เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้แต่ละครั้งแล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมง และ 7, 15, 30 วัน สามารถให้ผล PCR บวก (7 วัน รูปที่ 3.6, 15 วัน รูปที่ 3.7 และ 30 วัน รูปที่ 3.8) ซึ่งในการทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วันให้ผล PCR บวกชัดเจนกว่าเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 และ 30 วัน

3.6 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ *Taq* DNA polymrase ที่แยกสกัดได้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) จากดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งที่ถูกฉีดเชื้อ SEMBV เข้าไปและดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้งด้วยวิธี PCR

ดีเอ็นเอที่เป็น positive control นำมาวัดหาปริมาณความเข้มข้นได้ 2928 นาโนกรัม/ไมโครลิตรแล้วนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อหาสภาวะความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgCl_2$ ด้วยวิธี PCR เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:10 ซึ่งให้ผล PCR บวกชัดเจนที่สุด และจากการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้นของ 0.5, 0.75 และ 1.0 mM $MgCl_2$ สามารถให้ผล PCR บวกได้ชัดเจนกว่าการทดสอบด้วย $MgCl_2$ ของบริษัท promega, U.S.A. (รูปที่ 3.9) จากนั้นนำ positive control มาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตามวิธีข้อ 2.3.9 แล้วนำมาทดสอบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่เจือจาง 1:10 และ 1:1000, PCR buffer pH 9 และ 25 mM$MgCl_2$ ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 0.75 mM ด้วยวิธี PCR จากการทดสอบพบว่า เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่เจือจาง 1:10 สามารถให้ผล PCR บวกกับ ดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ที่มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 25 นาโนกรัม (รูปที่ 3.10) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:1000 สามารถให้ผล PCR บวก กับดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ที่มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด ในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 2000 นาโนกรัม (รูปที่ 3.11) โดยดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ มีขนาด 640 bp และดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างกุ้งที่สงสัยว่าจะติดเชื้อทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ให้ผล PCR บวก 3 ตัวอย่าง และ PCR ลบ 2 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 (รูปที่ 3.12) ส่วนเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:1000 ให้ผล PCR ลบ กับดีเอ็นเอตัวอย่างกุ้งทั้ง 5 ตัวอย่าง

3.7 การทำ Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่

3.7.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ MMLV-RT

อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.10.2 แล้วนำมาวัดปริมาณ อาร์เอ็นเอ ตามวิธี ข้อ 2.3.10.3 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ อาร์เอ็นเอทั้ง 4 ชนิด คือ 1650, 2420, 880 และ 1100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ และจากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ MMLV-RT โดยทดสอบกับอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 2 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร, primer ความเข้มข้น 25 พิโคโมล/ไมโครลิตร, PCR buffer pH 9, 25 mM$MgCl_2$ ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.5 mM และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:10 ด้วยวิธี RT-PCR ตามวิธีข้อ ก. จากการทดสอบพบว่าเอนไซม์ MMLV-RT ที่ความเข้มข้น 50, 25 และ 12.5 ยูนิต/ไมโครลิตร ให้ผล RT-PCR บวก ส่วนเอนไซม์ MMLV-RT ที่ความเข้มข้น 5 ยูนิต/ไมโครลิตร ให้ผล RT-PCR ลบ (รูปที่ 3.13)

3.7.2 การทดสอบหาความเข้มข้นน้อยที่สุดของอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ที่สามารถทดสอบได้ด้วยวิธี RT-PCR

จากการนำเอนไซม์ MMLV-RT ความเข้มข้น 12.5 ยูนิต/ไมโครลิตร primer ความเข้มข้นชนิดละ 25 พิโคโมล/ไมโครลิตรและเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เจือจาง 1:10 มาทดสอบกับอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ความเข้มข้นแต่ละชนิด 100, 50 และ 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อหาความเข้มข้นน้อยที่สุดของอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิด ด้วยวิธี RT-PCR จากการทดสอบพบว่าไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ที่ความเข้มข้นแต่ละชนิด 100 , 50 และ 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ให้ผล RT-PCR บวก (รูปที่ 3.14) นำผลผลิต RT-PCR ของอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร มาทำการแยก

บน 2% agarose gel (รูปที่ 3.15) และ 10% polyacrylamide gel พบว่าผลผลิต RT-PCR มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิดมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกัน ดังนี้คือ 229, 233, 227และ 241 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3.16)

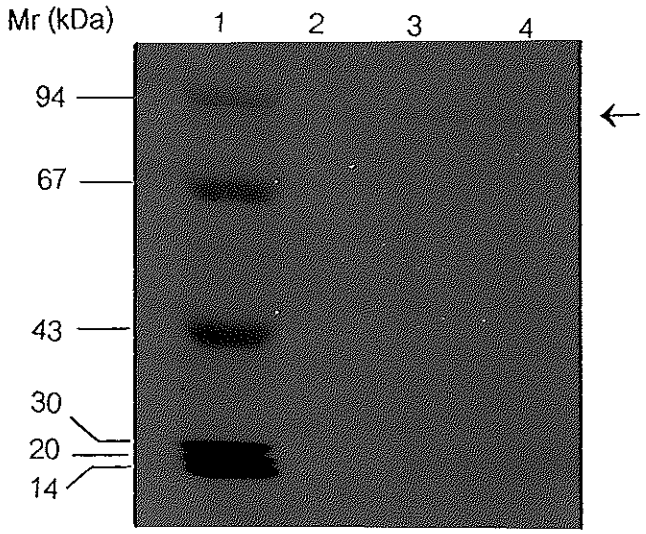
3.7.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้

จากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำมาทำการทดสอบกับเอนไซม์ MMLV-RT ความเข้มข้น 12.5 ยูนิต /ไมโครลิตร, primer ความเข้มข้นชนิดละ 25 พิโคโมล /ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:20, 1:25, 1:30 และ 1:35 ด้วยวิธี RT-PCR จากผลการทดสอบพบว่าที่เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เจือจาง 1:20 ให้ผล RT-PCR บวกกับอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิด แต่ชนิดที่ 4 ให้ผลไม่ชัดเจน ที่ทำการทดสอบโดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เจือจาง 1:25 ให้ผล RT-PCR บวกกับอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2 และ 3 ส่วนชนิดที่ 4 ให้ผล RT-PCR ลบ ที่ทำการทดสอบโดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เจือจาง 1:30 ให้ผล RT-PCR บวกกับอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 3 ส่วนชนิดที่ 1, 2, และ 4 ให้ผลลบ และที่ทำการทดสอบโดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เจือจาง 1:35 ให้ผล RT-PCR ลบกับอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ ทั้ง 4 ชนิด (รูปที่ 3.17)

3.8 การนำเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่มีสภาวะที่เหมาะสมมาตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่ในซีรั่มผู้ป่วย ด้วยวิธี RT-PCR

ตัวอย่างซีรั่มที่เลือกเก็บได้มีทั้งหมด 90 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ โดยมีการส่งตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ซึ่งตรวจหา IgM จำเพาะวิธี ELISA และ Hemagglutination Inhibition (HI) ที่มีค่า HI titer ดังนี้คือ weakly 1 ราย, ต่ำกว่า 1:10 1 ราย, ต่ำกว่า 1:20 7 ราย, 1:20 4 ราย , 1:40 5 ราย, 1:80 7 ราย, 1:160 9 ราย, 1:320 12 ราย, 1:640 8 ราย, 1:1280 10 ราย, 1:2560 11 ราย, 1:5120 7 ราย, 1:10240 4 ราย และ มากกว่า 1:10240 1 ราย ไม่มีข้อมูล 3 ราย และจากซีรั่ม 90 ตัวอย่างนี้ มีผล IgM บวก โดยวิธี Enzymed-linked immunosorbent assay (ELISA) 48 ราย IgM ลบ 42 ราย และจากการค้นประวัติการเป็นไข้ก่อนมาตรวจที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ พบว่ามีไข้ก่อนมาตรวจที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ 2-5 วัน จำนวน 42 ราย และมีไข้มากกว่า 5 วัน ก่อนมาตรวจ จำนวน 46 ราย ไม่มีข้อมูล 2 ราย (ตารางที่ 3.2) และจากซีรั่มผู้ป่วยที่เลือกเก็บมา ทั้งหมด 90 ตัวอย่าง นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ ตามวิธีข้อ 2.3.10.2 เพื่อทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเอนไซม์ MMLV-RT จากบริษัท promega, U.S.A. ความเข้มข้น 12.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, primer ความเข้มข้นชนิดละ 25 พิโคโมล/ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10, PCR buffer pH 9 และ 25 mM $MgCl_2$ ที่เตรียมซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.5 mM ซึ่งจากการทดสอบพบว่าการทดสอบโดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้และจาก บริษัท Promega, U.S.A. ให้ผลสอดคล้องกันคือ จากจำนวนตัวอย่างซีรั่ม 90 ตัวอย่าง ให้ผล RT-PCR บวก 6 ตัวอย่าง ซึ่งซีรั่มที่ให้ผล RT-PCR บวกนี้มีค่า HI titer ต่ำกว่า 1:20 และ เท่ากับ 1:80 ประวัติการเป็นไข้ก่อนมาตรวจไม่เกิน 3 วัน จำนวน 2 ตัวอย่าง ค่า HI titer เท่ากับ 1:20 และ 1:40 ประวัติการเป็นไข้ก่อนมาตรวจไม่เกิน 5 วัน จำนวน 2 ตัวอย่าง และค่า HI titer เท่ากับ 1:160 ประวัติการเป็นไข้ก่อนมาตรวจไม่เกิน 3 วัน จำนวน 2 ตัวอย่าง และซีรั่มทั้ง 6 ตัวอย่างที่ให้ผล RT-PCR บวกนี้ มีค่า IgM บวกและมีค่า

HI titer ในซีรั่มหลังเท่ากับหรือมากกว่าค่า HI titer ในซีรั่มแรก 4 เท่า และซีรั่มผู้ป่วยที่เป็น Leptospirosis (negative control) ให้ผล RT-PCR ลบ (รูป ที่ 3.18 และ ตารางที่ 3.3)

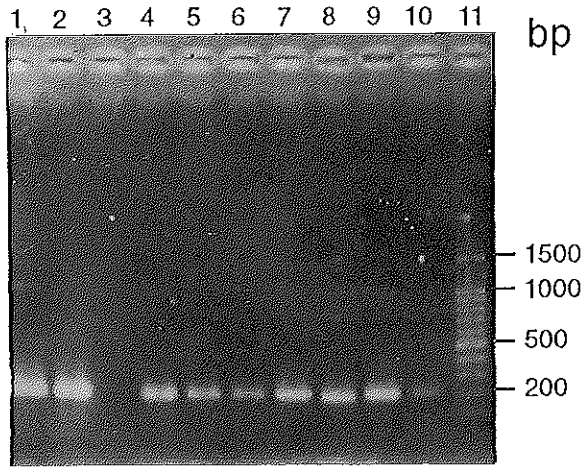


รูปที่ 3.1 แบบแผนของแถบโปรตีนที่ได้จากการทำ SDS-PAGE

แถวที่ 1 แถบของโปรตีนมาตรฐานจาก Low molecular weight calibration kit

แถวที่ 2, 3 แถบเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ปริมาณ 0. 05 และ 0.1 ไมโครกรัม ตามลำดับ

แถวที่ 4 แถบเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท promega, U.S.A. ปริมาณ 0.1 ไมโครกรัม



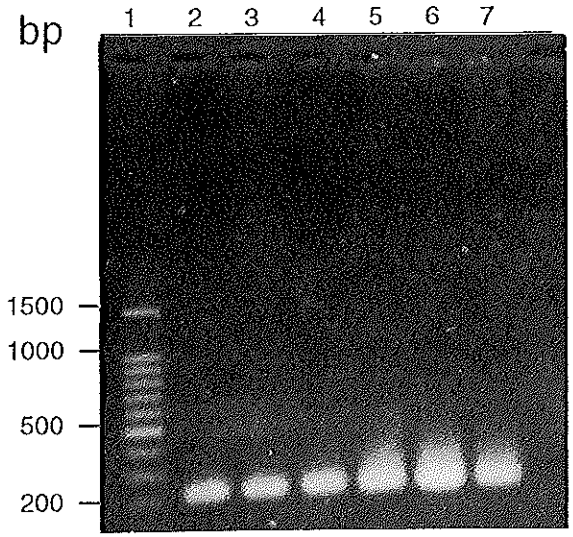
รูปที่ 3.2 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 โดยใช้ PCR buffer ที่ pH ต่าง ๆ กันโดยวิธี PCR วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel

แถวที่ 1 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase, PCR buffer และ $MgCl_2$ ของบริษัท promega, U.S.A. มีขนาด 260 bp

แถวที่ 2 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 โดยใช้ PCR buffer pH 9 และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท promega, U.S.A

แถวที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ10 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 และ PCR buffer pH 8.0, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0, 9.2 และ 9.4

แถวที่ 11 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

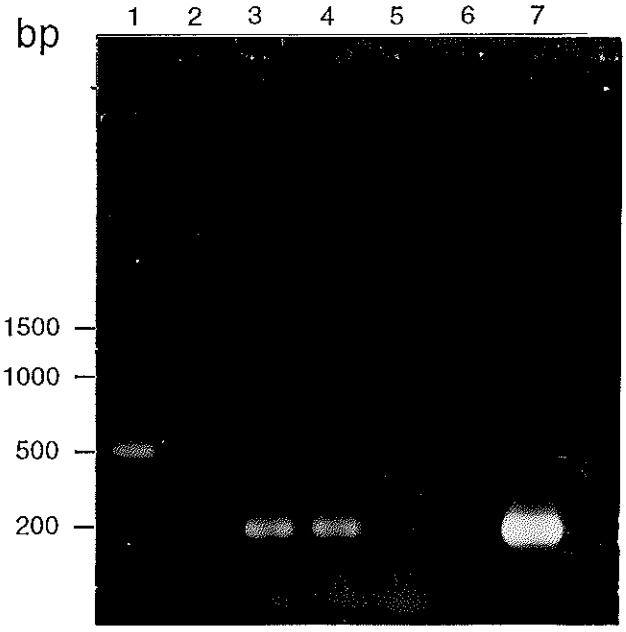


รูปที่ 3.3 แสดงผลการเสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วย เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10, PCR buffer pH 9 และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ต่าง ๆ กันโดยวิธี PCR วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase, PCR buffer และ $MgCl_2$ ของบริษัท promega, U.S.A. มีขนาด 260 bp

แถวที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10, PCR buffer pH 9 และ 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 และ1.25 ไมโครลิตร ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยา PCR ดังนี้คือ 0.625, 1.25, 1.87, 2.5 และ 3.125 mM

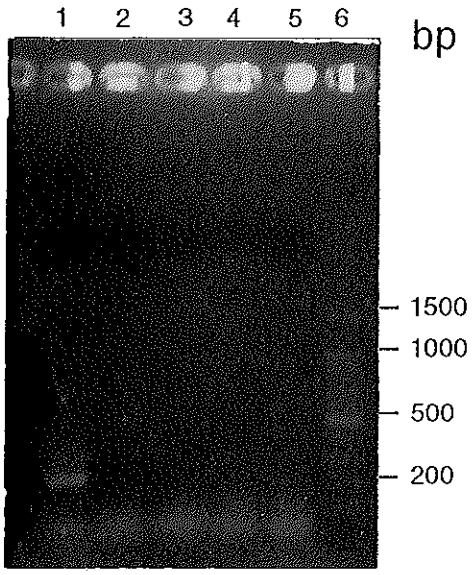


รูปที่ 3.4 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymeraseที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวก วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymeraseที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เจือจาง 1:800, 1:600, 1:600, 1:1000 และ 1:800 ตามลำดับ

แถวที่ 7 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เจือจาง 1:10

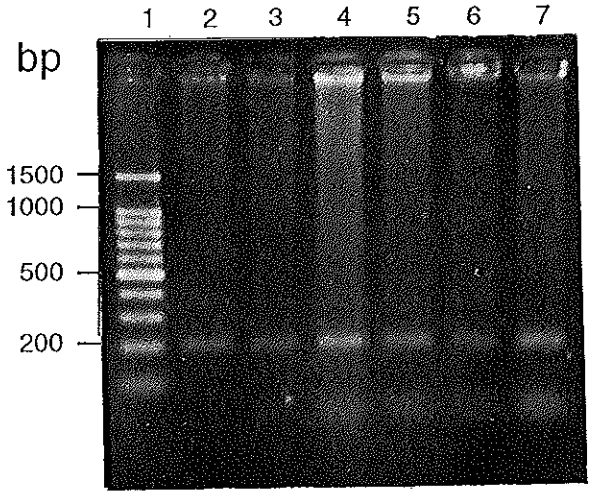


รูปที่ 3.5 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promaga, U.S.A.ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

แถวที่ 1, 2, 3 และ 4 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promaga , U.S.A. ความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.125 ยูนิต / ไมโครลิตร

แถวที่ 5 negative control

แถวที่ 6 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

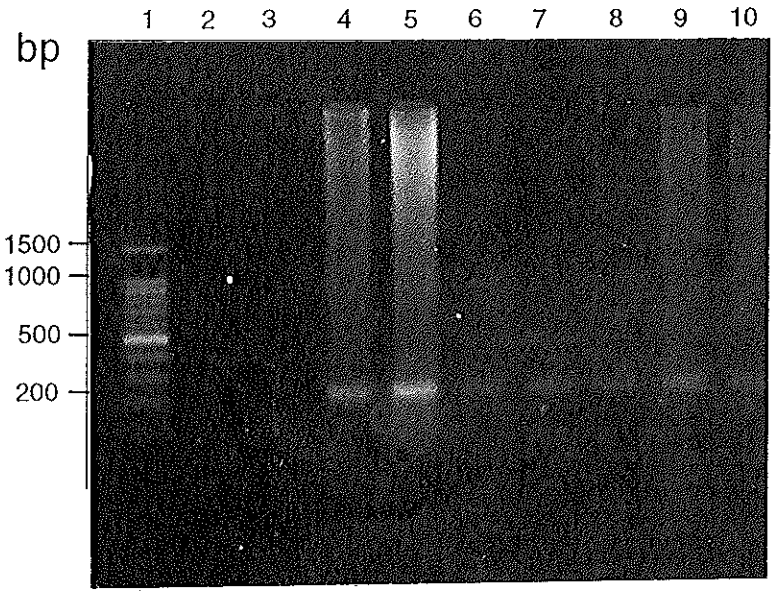


รูปที่ 3.6 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะpPIC3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน และเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวก วิเคราะห์บน 1.5 % agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เจือจาง 1:800, 1:600, 1:600, 1:1000 และ 1:800 ตามลำดับ

แถวที่ 7 แสดงแถบ PCR product (positive control) ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:600 โดยไม่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง



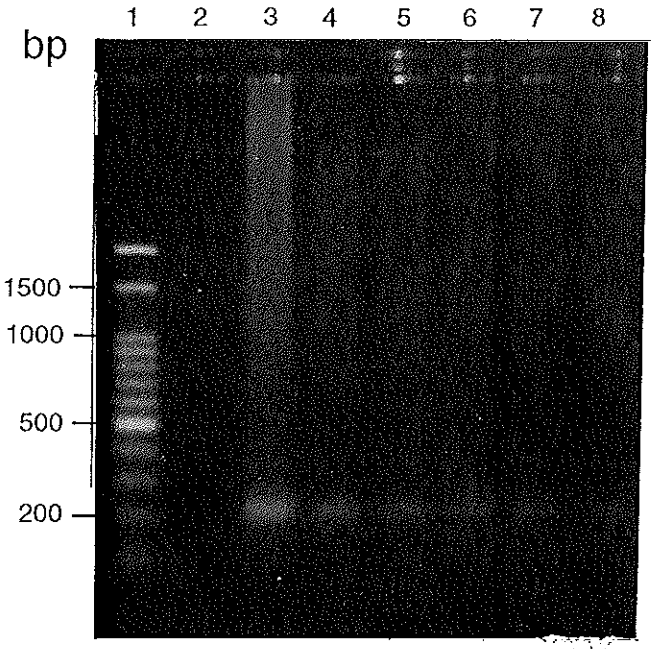
รูปที่ 3.7 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะpPIC3.5เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้ง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 วัน และเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวก วิเคราะห์บน 1.5 % agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2 Negative control

แถวที่ 4 และ 5 แสดงแถบ PCR product (positive control) ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ครั้งที่ 4 เจือจาง 1: 600 โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน และ ไม่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

แถวที่ 6, 7, 8, 9 และ 10 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC 3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ครั้งที่ 1, 2, 3 และ 4เจือจาง 1:800, 1:600, 1:1000 และ 1:800 ตามลำดับ



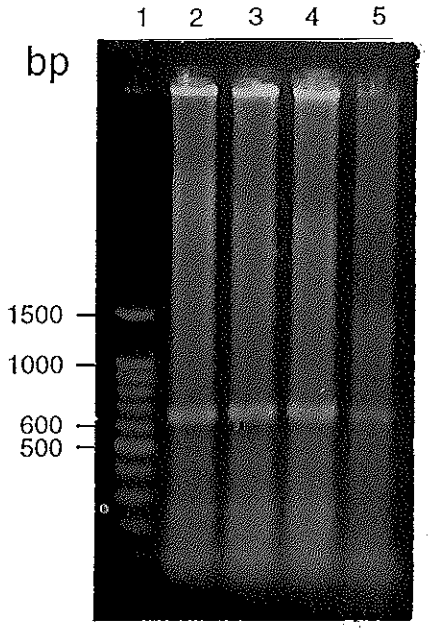
รูปที่ 3.8 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอพาหะpPIC 3.5 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วันและเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCRบวก วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2 negative control

แถวที่ 3 positive control แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะpPIC3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:600 โดยไม่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

แถวที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอพาหะ pPIC3.5 โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เจือจาง 1:800, 1:600, 1:600, 1:1000 และ 1:800 ตามลำดับ

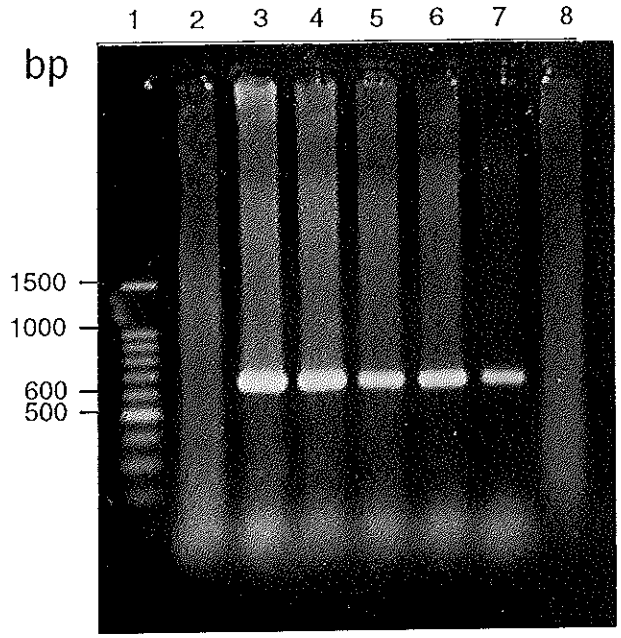


รูปที่ 3.9 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไวรัส SEMBV เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 และ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยวิธี PCR วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2, 3 และ 4 แสดงแถบ PCR product มีขนาด 260 bp ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10 และปริมาตรของ 25 mM $MgCl_2$ 0.5, 0.75 และ 1.0 ไมโครลิตร ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา PCR 0.5, 0.75 และ 1.0 mM

แถวที่ 5 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV โดยใช้ $MgCl_2$ ของบริษัท Promega, U.S.A. ความเข้มข้น 0.75 mM



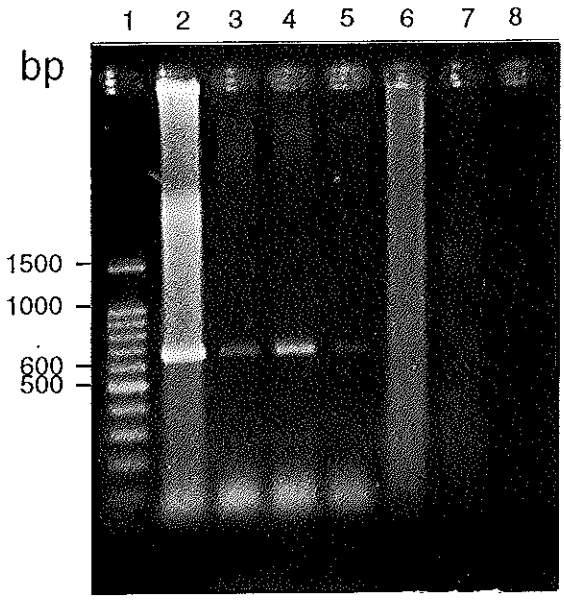
รูปที่ 3.10 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ความเข้มข้น 100, 50, 25, 10 และ 5 นาโนกรัม / ไมโครลิตร เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1: 10 โดยวิธี PCR วิเคราะห์บน 1.5 % agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Laddaer)

แถวที่ 2 negative control

แถวที่ 3 แสดงแถบ PCR product มีขนาด 640 bp ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีอ็นเอไวรัส SEMBV ที่ไม่ได้เจือจาง

แถวที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 แสดงแถบ PCR productที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ความเข้มข้น 100, 50, 25, 10 และ 5 นาโนกรัม /ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณอาร์เอ็นเอสุดท้ายในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 250, 125, 62.5, 25 และ 12.5 นาโนกรัม ตามลำดับ

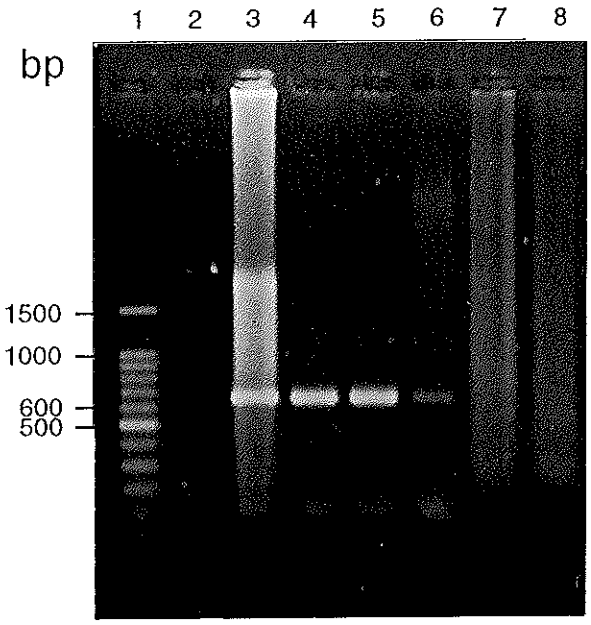


รูปที่ 3.11 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:1000 โดยวิธี PCR วิเคราะห์บน 1.5 % agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

แถวที่ 2 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ที่ไม่ได้เจือจาง

แถวที่ 3, 4, 5 และ 6 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV ความเข้มข้น 1000, 900, 800 และ 700 นาโนกรัม / ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอสุดท้ายในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 2500, 2250, 2000 และ 1750 นาโนกรัม ตามลำดับ



รูปที่ 3.12 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอของกุ้งที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัส SEMBV เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 โดยวิธี PCR วิเคราะห์บน 1.5 % agarose gel

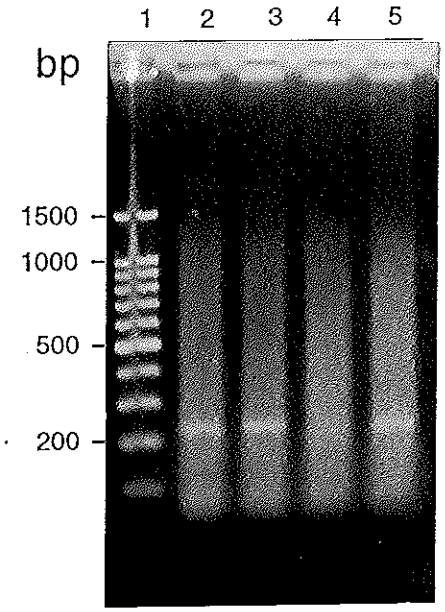
แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2 negative control

แถวที่ 3 แสดงแถบ PCR product ของ positive control มีขนาด 640 bp ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอไวรัส SEMBV

แถวที่ 4, 5 และ 6 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีเอ็นเอของตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส SEMBV

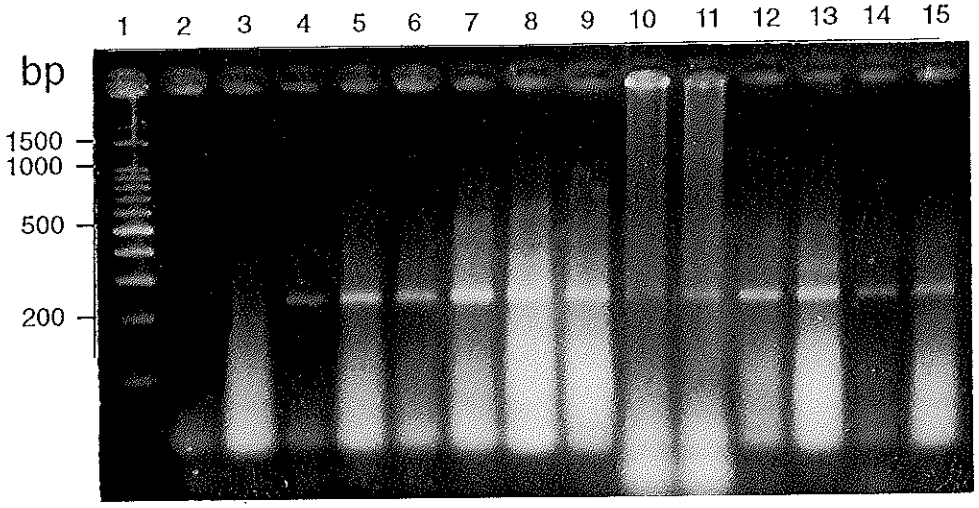
แถวที่ 7 และ 8 ตัวอย่างดีเอ็นเอของกุ้งที่ไม่ติดเชื้อไวรัส SEMBV



รูปที่ 3.13 แสดงผลการสังเคราะห์ อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 2 เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10 และเอนไซม์ MMLV- RT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี RT-PCR วิเคราะห์บน 2% agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2, 3, 4, และ 5 แสดงแถบ PCR product ขนาด 233 bp ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 2 ทดสอบโดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10 และเอนไซม์ MMLV- RT ที่ความเข้มข้น 50, 25, 5 และ 12.5 ยูนิต / ไมโครลิตร



รูปที่ 3.14 แสดงผลการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ความเข้มข้น 100, 50 และ 25 นาโนกรัม / ไมโครลิตรเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1: 10 โดยวิธี RT-PCR วิเคราะห์บน 2 % agarose gel

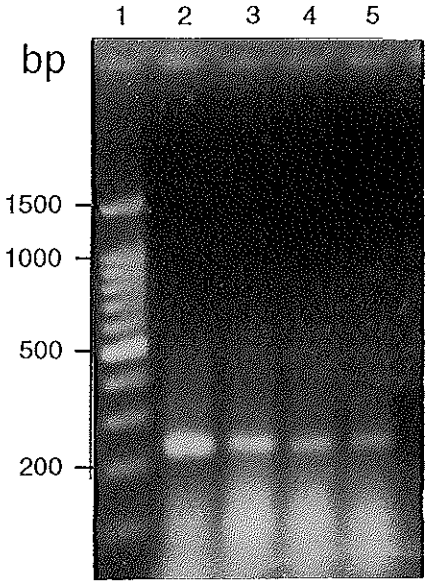
แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2 และ 3 negative control ทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase บริษัท promega, U.S.A. และที่แยกสกัดได้ เจือจาง 1:10

แถวที่ 4, 5, 6 และ 7 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม / ไมโครลิตร

แถวที่ 8, 9, 10 และ 11 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม / ไมโครลิตร

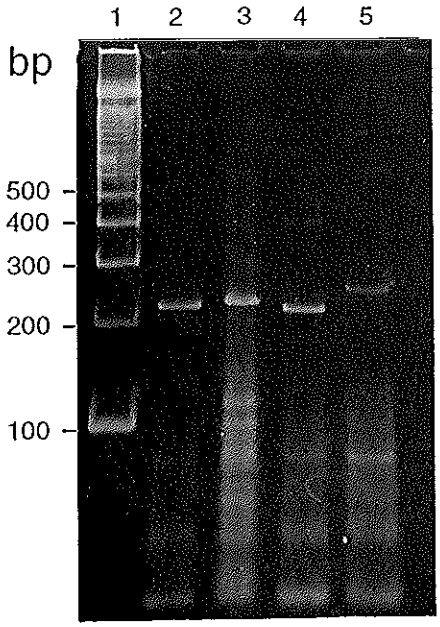
แถวที่ 12, 13, 14 และ15 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม / ไมโครลิตร



รูปที่ 3.15 แสดงผลการสังเคราะห์ อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยวิธี RT-PCR วิเคราะห์บน 2% agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

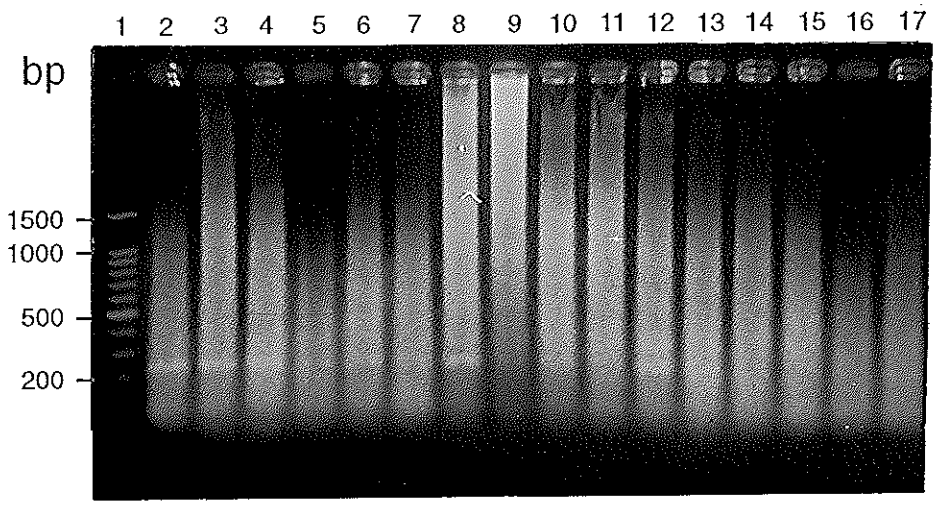
แถวที่ 2, 3, 4 และ 5 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ขนาด 229, 233, 227 และ 241 bp ตามลำดับ



รูปที่ 3.16 แสดงผลการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยวิธี RT-PCR วิเคราะห์บน 10 % polyacrylamide gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2, 3, 4 และ 5 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ขนาด 229, 233, 227 และ 241 bp ตามลำดับ



รูปที่ 3.17 แสดงผลการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม / ไมโครลิตร เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:20, 1:25, 1:30 และ 1:35 โดยวิธี RT-PCR วิเคราะห์บน 2% agarose gel

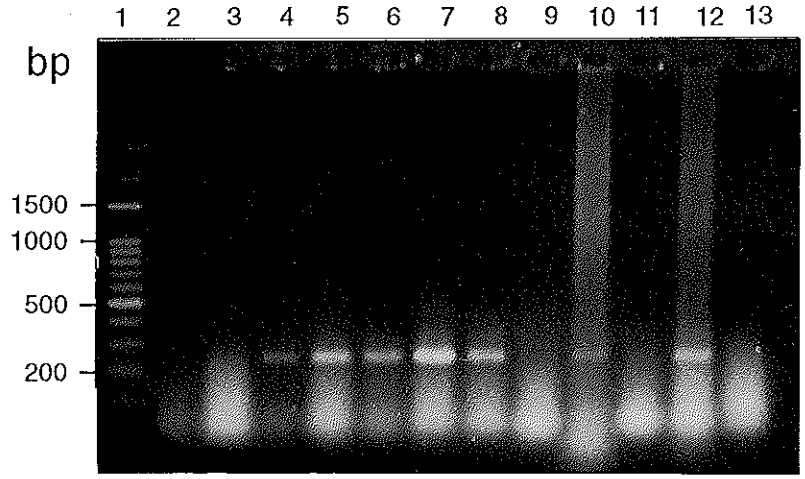
แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

แถวที่ 2, 3, 4 และ 5 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 เมื่อทดสอบด้วย เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:20

แถวที่ 6, 7, 8 และ 9 แสดงแถบ PCR productที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ4 เมื่อทดสอบด้วย เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:25

แถวที่ 10,11,12 และ13 แสดงแถบ PCR productที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ4 เมื่อทดสอบด้วย เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:30

แถวที่ 14, 15, 16 และ 17แสดงแถบ PCRproductที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 เมื่อทดสอบด้วย เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:35



รูปที่ 3.18 แสดงผลการสังเคราะห์ อาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ที่สกัดจากซีรั่มผู้ป่วย โดยวิธี RT-PCR วิเคราะห์บน 2% agarose gel

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Ladder)

แถวที่ 2, 3, 9 และ 11 แสดงผล RT-PCR ของซีรั่มผู้ป่วยที่ให้ผลลบ

แถวที่ 4, 5, 6, 7, 8 และ 10 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ที่สกัดจากซีรั่มผู้ป่วยที่ให้ผลบวก

แถวที่ 12 แสดงแถบ PCR product ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 2 ที่นำมาทำเป็น positive control

แถวที่ 13 negative control

แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้

สกัดครั้งที่	ปริมาตรที่สกัดได้ใน 100 ml cell (ml)	ความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg)	ความเข้มข้นเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCR บวก	ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำสุดที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี (ng/ul)	ค่าความว่องไวของเอนไซม์ที่แยกสกัดได้	
						unit/ul	unit
1	0.58	4.8	2.78	1:800	6.0	800	4.64×10^6
2	0.60	4.5	2.70	1:600	7.5	600	3.6×10^6
3	0.55	4.6	2.53	1:600	7.6	600	3.3×10^6
4	0.60	6.6	3.96	1:1000	6.6	1000	6.0×10^6
5	0.57	5.5	3.13	1:800	6.8	800	4.56×10^6

ตารางที่ 3.2 แสดงผล RT-PCR ของซีรั่มผู้ป่วยในการตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1: 10

ลำดับ	HI Titer	IgM(IU/ml)	ผล PCR	รวมเวลาไข้ก่อนส่งตรวจ
1	weakly	บวก	ลบ	5 วัน
2	<1:10	ลบ	ลบ	7 วัน
3	<1:20	ลบ	ลบ	10 วัน
4	<1:20	ลบ	ลบ	10 วัน
5	<1:20	ลบ	ลบ	8 วัน
6	<1:20	ลบ	ลบ	4 วัน
7	<1:10	ลบ	ลบ	5 วัน
8	<1:10	บวก	ลบ	6 วัน
9	<1:20	บวก	บวก	3 วัน
10	1:20	บวก	บวก	5 วัน
11	1:20	บวก	ลบ	6 วัน
12	1:20	ลบ	ลบ	5 วัน
13	1:20	ลบ	ลบ	4 วัน
14	1:40	ลบ	ลบ	4 วัน
15	1:40	ลบ	ลบ	6 วัน
16	1:40	ลบ	ลบ	5 วัน
17	1:40	บวก	บวก	5 วัน
18	1:40	บวก	ลบ	7 วัน
19	1:80	บวก	ลบ	6 วัน
20	1:80	บวก	ลบ	6 วัน
21	1:80	บวก	ลบ	5 วัน
22	1:80	บวก	ลบ	23 วัน
23	1:80	ลบ	ลบ	6 วัน
24	1:80	ลบ	ลบ	5 วัน

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ลำดับ	HI Titer	IgM(IU/ml)	ผล PCR	รวมเวลาไข้ก่อนส่งตรวจ
25	1:80	บวก	บวก	3 วัน
26	1:160	บวก	ลบ	6 วัน
27	1:160	บวก	บวก	3 วัน
28	1:160	บวก	บวก	2 วัน
29	1:160	บวก	ลบ	3 วัน
30	1:160	บวก	ลบ	5 วัน
31	1:160	ลบ	ลบ	5 วัน
32	1:160	ลบ	ลบ	3 วัน
33	1:160	ลบ	ลบ	4 วัน
34	1:160	ไม่มีข้อมูล	ลบ	ไม่มีข้อมูล
35	1:320	บวก	ลบ	8 วัน
36	1:320	บวก	ลบ	22 วัน
37	1:320	บวก	ลบ	5 วัน
38	1:320	บวก	ลบ	6 วัน
39	1:320	บวก	ลบ	5 วัน
40	1:320	ลบ	ลบ	5 วัน
41	1:320	ลบ	ลบ	3 วัน
42	1:320	ลบ	ลบ	23 วัน
43	1:320	ลบ	ลบ	5 วัน
44	1:320	ลบ	ลบ	5 วัน
45	1:320	ลบ	ลบ	5 วัน
46	1:320	ลบ	ลบ	4 วัน
47	1:640	ลบ	ลบ	5 วัน
48	1:640	ลบ	ลบ	6 วัน
49	1:640	ลบ	ลบ	7 วัน

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ลำดับ	HI Titer	IgM(IU/ml)	ผล PCR	รวมเวลาไข้ก่อนส่งตรวจ
50	1:640	ลบ	ลบ	19 วัน
51	1:640	บวก	ลบ	5 วัน
52	1:640	บวก	ลบ	10 วัน
53	1:640	บวก	ลบ	7 วัน
54	1:640	บวก	ลบ	4 วัน
55	1:1280	บวก	ลบ	5 วัน
56	1:1280	บวก	ลบ	16 วัน
57	1:1280	บวก	ลบ	8 วัน
58	1:1280	บวก	ลบ	5 วัน
59	1:1280	บวก	ลบ	5 วัน
60	1:1280	บวก	ลบ	5 วัน
61	1:1280	ลบ	ลบ	3 วัน
62	1:1280	ลบ	ลบ	7 วัน
63	1:1280	ลบ	ลบ	4 วัน
64	1:1280	ลบ	ลบ	6 วัน
65	1:2560	ลบ	ลบ	4 วัน
66	1:2560	ลบ	ลบ	5 วัน
67	1:2560	ลบ	ลบ	7วัน
68	1:2560	ลบ	ลบ	7 วัน
69	1:2560	ลบ	ลบ	5 วัน
70	1:2560	ลบ	ลบ	6 วัน
71	1:2560	ลบ	ลบ	8 วัน
72	1:2560	ลบ	ลบ	ไม่มีข้อมูล
73	1:2560	ลบ	ลบ	9 วัน
74	1:2560	ลบ	ลบ	7 วัน

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ลำดับ	HI Titer	IgM(IU/ml)	ผล PCR	รวมเวลาไข้ก่อนส่งตรวจ
75	1:2560	บวก	ลบ	15 วัน
76	1:5120	บวก	ลบ	19 วัน
77	1:5120	บวก	ลบ	9 วัน
78	1:5120	บวก	ลบ	20 วัน
79	1:5120	บวก	ลบ	15 วัน
80	1:5120	ลบ	ลบ	5 วัน
81	1:5120	ลบ	ลบ	34 วัน
82	1:5120	ลบ	ลบ	19วัน
83	1:10240	บวก	ลบ	21 วัน
84	1:10240	บวก	ลบ	5 วัน
85	1:10240	บวก	ลบ	7 วัน
86	1:10240	บวก	ลบ	20 วัน
87	>1:10240	ลบ	ลบ	7 วัน
88	ไม่มีข้อมูล	บวก	ลบ	6 วัน
89	ไม่มีข้อมูล	บวก	ลบ	7 วัน
90	ไม่มีข้อมูล	บวก	ลบ	5 วัน

ตารางที่ 3.3 แสดงผล RT-PCR บวกของซีรั่มผู้ป่วยสัมพันธ์กับค่า IgM, HI titer และการมีไข้ก่อนมาตรวจ

จากซีรั่ม 90 ตัวอย่าง

⇓

<table>
<tr><td colspan="4">IgM บวก
48 ตัวอย่าง</td><td colspan="2">IgM ลบ
42 ตัวอย่าง</td></tr>
<tr><td colspan="2">HI titer < 4 เท่า
35 ตัวอย่าง</td><td colspan="2">HI titer ≥ 4เท่า
13 ตัวอย่าง</td><td>HI titer < 4 เท่า
42 ตัวอย่าง</td><td>HI titer > 4เท่า
ไม่มี</td></tr>
<tr><td>RT-PCR
บวก
ไม่มี</td><td>RT-PCR
ลบ
35</td><td>RT-PCR
บวก
6</td><td>RT-PCR
ลบ
7</td><td colspan="2">RT-PCR
ลบ
42</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td>มีไข้ก่อน
มาตรวจ
≤ 5 วัน</td><td>มีไข้ก่อน
มาตรวจ
> 5 วัน</td><td colspan="2"></td></tr>
</table>

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกสกัดเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ทำการแยกสกัดเอนไซม์*Taq* DNA polymerase ไว้ทั้งหมด 5 ครั้ง เพื่อนำมาทดสอบหาความสามารถเพื่อที่นำไปประยุกต์ใช้ ซึ่งแต่ละครั้งของการแยกสกัดได้ทำตามวิธีของ Pluthero,1993 ซึ่งได้ทำการแยกสกัดในขั้นตอนเดียว โดยไม่ได้ผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี ซึ่งในขั้นตอนการแยกสกัดเอนไซม์จะมีการใช้ความร้อนที่ 75°C ซึ่งจะทำให้โปรตีนอื่นๆจากแบคทีเรียถูกทำให้เสียสภาพไปและจะถูกกำจัดออกไปจากการแยกสกัด (Desai *et al.*, 1995) และเมื่อนำเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ไปแยกดูแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ไม่บริสุทธิ์เพราะมีการปนเปื้อนจากโปรตีนชนิดอื่นๆแต่แถบที่ชัดเจนที่สุดอยู่ที่ประมาณ 94 กิโลดาลตัน ซึ่งแถบที่ได้ตรงกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, U.S.A. (รูปที่3.1)

4.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมและความสามารถของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ ด้วยวิธี PCR

จากการนำเอนไซม์ที่แยกสกัดได้มาหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR buffer โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากพลาสมิดเวคเตอร์ pPIC3.5 ซึ่งมีซิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 260 bp มาทดสอบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 พบว่าที่ pH 8.2 ถึง 9.4 สามารถทดสอบให้ผล PCR บวกขณะที่ PCR buffer pH 8.0 ทดสอบแล้วให้ผล PCR ลบ (รูปที่ 3.2) ทั้งนี้เนื่องมาจาก pHที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase คือที่ 7.0 - 7.5 ที่อุณหภูมิ 72°C

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase อยู่ใน Tris-buffer สามารถทำงานได้ดีที่ pH 8.5-9.0 ที่ 25°C เนื่องจาก pH ของ Tris-buffer จะลดลงประมาณ 0.03 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศา ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72°C จะได้ pH ประมาณ 7.3-7.6 นั่นเอง (จริยา ชมวารินทร์, 2540) ดังนั้น PCR buffer ที่ pH 8.0 เมื่ออุณหภูมิ 72°C จะมีค่า pH ประมาณ 6.5 ซึ่งจะไม่เหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerse

นอกจากนี้จากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgCl_2$ ที่เตรียม พบว่า เมื่อนำมาทดสอบกับเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ $MgCl_2$ ที่เตรียม ทุกความเข้มข้นสามารถทดสอบให้ผล PCR บวก (รูปที่3.3) แต่ที่ความเข้มข้น 1.87, 2.5 และ 3.125 mM $MgCl_2$ จะมีอัตราส่วนความเข้มข้นมากเกินไป ทำให้แถบที่ได้ไม่คมชัดเห็นเป็นแถบเดียวเหมือนความเข้มข้น 0.625 และ 1.25 mM ซึ่งจริงๆแล้ว Mg^{2+} ทำหน้าที่เป็นปัจจัยร่วม (co-factor) ช่วยส่งเสริมในปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอให้ดำเนินต่อไปได้ ซึ่งมีผลต่อการถูกต้องของการทำงานของเอนไซม์

ดังนั้นจากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR buffer และ $MgCl_2$จึงได้เลือกเอา PCR buffer pH 9.0 ซึ่งเป็น pH ที่ให้ผล PCR บวกค่อนข้างชัดเจนและเป็น pH ที่อยู่กลางๆระหว่าง pH 8.8 กับ pH 9.2 ซึ่งให้ผลชัดเจนเช่นกัน และเลือกเอาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ที่ 0.625 mM โดยใช้ปริมาตรของ 25 mM $MgCl_2$ ที่เตรียม 0.25 ไมโครลิตร เพื่อที่จะได้ไม่ให้มีความเข้มข้นมากเกินไปในการทำปฏิกิริยา

4.3 การทดสอบหาสภาพความคงทน และความว่องไวของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ด้วยวิธี PCR

จากการนำเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งมาทดสอบหาความว่องไวของเอนไซม์ ด้วยวิธี PCR พบว่าเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งเจือจางสุดท้ายที่ให้ผล PCRบวก ใกล้เคียงกันคือที่เจือจางของแต่ละครั้ง ดังนี้ คือ 1:800, 1:600, 1:600, 1:1000 และ 1:800 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทำการทดสอบเทียบกับ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, U.S.A. พบว่ามีค่าความว่องไวของเอนไซม์ที่แยกสกัดได้แต่ละครั้งสูงถึง 10^6 ยูนิต (ตารางที่3.1) เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานมาก่อน (Pluthero, 1993 ; Desai *et al.*,1995 ; Leelayuwat *et al.*,1997)

และจากการทดสอบความคงทนของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้พบว่าถึงแม้ว่าจะวางเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน ก็สามารถให้ผล PCR บวก แต่ผลที่ได้ไม่ชัดเจน ส่วนเอนไซม์ที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน สามารถนำมาใช้ได้อย่างดีให้ผล PCR บวกได้อย่างชัดเจน (รูปที่3.6)

ซึ่งในการแยกสกัดเอนไซม์แต่ละครั้งเสียค่าใช้จ่ายไม่เกิน 1000 บาทและเอนไซม์ที่แยกสกัดได้นี้ยังสามารถเจือจางได้อย่างต่ำ10 เท่าซึ่งเอนไซม์ที่แยกสกัดได้มีปริมาตรประมาณ 600 ไมโครลิตร ดังนั้นจะได้ปริมาตรเพิ่มอย่างน้อยเป็น 6000 ไมโครลิตร ซึ่งจะใช้ครั้งละ1 ไมโครลิตร ในการทำปฏิกิริยา ถ้าเทียบราคาต่อยูนิตแล้ว เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase บริษัท Promega, U.S.A. จะมีราคายูนิตละประมาณ 15 บาท (ราคาเมื่อปีพ.ศ. 2542) ขณะที่เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้มีราคายูนิตละ 0.25 บาท แต่ถึงแม้ว่าเอนไซม์ที่แยกสกัดได้จะมีราคาถูกและสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีแต่ยังมีความบริสุทธิ์ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, U.S.A.

4.4 การนำเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้มาทดสอบหาเชื้อไวรัส Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) ที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว

ดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งกุลาดำที่ถูกฉีดเชื้อ SEMBV เข้าไปนำมาวัดความเข้มข้นได้ 2928 นาโนกรัม /ไมโครลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของ $MgCl_2$ โดยเปรียบเทียบกับ $MgCl_2$ ของบริษัท Promega, U.S.A. พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 , 0.75 และ 1.0 mM $MgCl_2$ ได้ผล PCR บวกได้ชัดเจน (รูปที่3.9) ซึ่งได้ผลชัดเจนกว่า 0.75 mM$MgCl_2$ ของบริษัท Promega, U.S.A. ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นนี้ไม่เหมาะสมกับปฏิกิริยา และจากการทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:10 และ 1:1000 ที่ได้จากการทดสอบข้อ 2.3.9 พบว่าที่เจือจาง 1:10 สามารถทดสอบได้ปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด 25 นาโนกรัม ขณะที่เอนไซม์เจือจาง 1:1000 ต้องมีปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งที่ฉีดเชื้อ SEMBV ถึง 2000 นาโนกรัม จึงจะทดสอบได้ โดยการทดสอบนี้ใช้ primer คู่ ตามที่เคยมีรายงานของ Takahashi และคณะ (1994) ซึ่งได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 640 bp และจากตัวอย่างกุ้ง 5 ตัวอย่าง ที่ได้ผ่านการตรวจโดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase บริษัท Promega, U.S.A. แล้ว เมื่อนำมาทดสอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10 ให้ผลสอดคล้องกัน คือ ให้ผล PCR บวก 3 ตัวอย่าง และให้ผล PCR ลบ 2 ตัวอย่าง (รูปที่3.12) ขณะที่เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์เจือจาง 1:1000 ให้ผล PCR ลบ

จากผลการทดสอบที่ใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเอนไซม์ของบริษัท Promega, U.S.A. ทำให้สามารถนำมาใช้ทดสอบแทนเอนไซม์ของบริษัท ที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ อนึ่งเนื่องจากการตรวจตัวอย่างกุ้งนั้นปริมาณไวรัสจะเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละตัวอย่างซึ่งไม่สามารถกำหนดได้ ดังนั้นจึงควรใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้นเหมาะสมที่สุด คือที่ เจือจาง 1:10 ซึ่งจะทำให้ไม่มีข้อผิดพลาด เนื่องจากการตรวจผิดพลาดให้ผลลบ

4.5 การทำ Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (RT – PCR) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่

จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ใช้ primer ตามรายงานของ Mirawati และคณะ (1997) เพื่อให้มีความไวในการทดสอบ, ความรวดเร็วในการทำ, ง่ายต่อการทำ, ประหยัดและมีความน่าเชื่อถือในความถูกต้อง เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่

Morita และคณะ (1991) ได้ใช้วิธีที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและง่ายโดยการใช้ nonidet P 40 (NP – 40) ในการแยกสกัดอาร์เอ็นเอ และ primer ที่จำเพาะแต่ละซนิดเพื่อการแยกซนิดของไวรัสเด็งกี่ และสามารถทำในขั้นตอนเดียวเช่นเดียวกัน แต่ primer ที่ใช้ต้องใช้ถึง 4 คู่ ดังนั้นถึงแม้ว่าจะได้ผลดี ทำได้รวดเร็วแต่ค่อนข้างสิ้นเปลืองในการใช้ primer ขณะที่ primer ตามรายงานของ Mirawati และคณะ (1997) จะใช้เพียง 3 primer ซึ่งเรียกว่า universal primer

ดังนั้นเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด จึงเลือกใช้วิธีของ Mirawati และคณะ (1997) ซึ่งได้มาจากการประยุกต์หาไวรัสเด็งกี่ด้วย primer ที่จำเพาะแต่ละซนิดตามวิธีของ Chang และคณะ (1994) และการสกัดอาร์เอ็นเอได้ดัดแปลงวิธีตามรายงานของ Boom และคณะ (1990) ซึ่งวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยซิลิกานี้ทำได้รวดเร็ว โดยในขั้นตอนแรกจะต้องทำการไลซีสก่อนเพื่อให้อาร์เอ็นเอสามารถจับกับอนุภาคซิลิกา แล้วค่อยแยกอาร์เอ็นเอออกมา ซึ่งวิธีนี้ได้พัฒนาให้มีความสะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้ในงานประจำ (routine) (Boom *et al.*,1990)

จากอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ซนิดที่สกัดได้มีความเข้มข้น 1650, 2420, 880 และ 1100 นาโนกรัม /ไมโครลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้ สภาวะที่เหมาะสมในการนำไปใช้ คือ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้เจือจาง 1:10, เอนไซม์ MMLV – RT ความเข้มข้น 12.5 ยูนิต /ไมโครลิตร, primer ความเข้มข้นซนิดละ 25 พิโคโมล / ไมโครลิตร, PCR buffer pH 9, ความเข้มข้น 0.5 mM $MgCl_2$ ซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถจะทดสอบไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ซนิดได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 3.14) ขณะที่สภาวะอื่นๆ ทดสอบได้ไวรัสเด็งกี่บางซนิดเท่านั้น ซึ่งจากการทำ RT-PCR โดยใช้ positive

control ไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอต่ำสุด 137.5 นาโนกรัม ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ดังนี้คือ 229, 233, 227 และ 241 bp ตามลำดับ ซึ่งแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย 10% polyacrylamide gel (รูปที่ 3.16) และจากจำนวนตัวอย่างซีรั่ม 90 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการทดสอบวิธี RT-PCR พร้อมกันไปกับการหาค่า IgM และ ค่า HI titer พบว่ามี 48 ตัวอย่างที่ให้ผล IgM บวก ซึ่งจาก 48 ตัวอย่างนี้เมื่อดูค่าระดับของ HI titer ในซีรั่มของการเจาะเลือดครั้งที่สองที่มีค่าHI titerเท่ากับหรือมากกว่า 4 เท่า ของ ค่า HI titer ในซีรั่มแรก มีจำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งจากข้อมูลที่ได้นี้แสดงว่ามีซีรั่ม 13 ตัวอย่าง ที่ชี้ให้เห็นว่าน่าจะเป็นไข้เลือดออก และสามารถตรวจโดยวิธี RT-PCR ได้เพียง 6 ตัวอย่าง ซึ่งเท่ากับ 46% ของจำนวนตัวอย่างที่ชี้ว่าเป็นไข้เลือดออก ซึ่งในจำนวนซีรั่ม 6 ตัวอย่างนี้จะมีประวัติการเป็นไข้ก่อนมาตรวจไม่เกิน5วัน ซึ่งอีก 54% ที่เหลือที่ให้ผลRT-PCR ลบ จะมีประวัติการเป็นไข้เกิน 5 วัน ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถตรวจโดยวิธี RT-PCR ได้

ถึงแม้ว่าวิธี RT-PCR จะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีความไวสูง แต่การนำมาใช้เพื่อการวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกยังมีข้อจำกัด เพราะขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ระยะเวลาของการเป็นไข้ ซึ่งการตรวจโดยวิธี RT-PCR นี้จะสามารถตรวจได้เฉพาะในระยะที่มีการติดเชื้อในกระเลือดซึ่งเป็นระยะที่สั้น ดังนั้นในขณะที่เริ่มมีไข้ต้องมาพบแพทย์เลยเพราะสามารถตรวจได้ในระยะที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดเท่านั้นซึ่งเป็นระยะที่สั้นเพราะถ้าพ้นระยะนี้ไปแล้วทำให้เชื้อไวรัสมีระดับต่ำเกินไปไม่สามารถจะทดสอบได้ และเนื่องจากเชื้อไวรัสเด็งกี่เป็นอาร์เอ็นเอไวรัสซึ่งง่ายต่อการถูกทำลายโดย RNase ซึ่งต้องระวังอย่างมาก การตรวจหาเชื้อไวรัสเด็งกี่ โดยวิธี RT-PCR นอกจากจะมีประโยชน์ในการวินิจฉัยเพื่อการรักษาผู้ป่วยที่เป็นไข้เลือดออกแบบเฉียบพลันแล้ว ยังมีประโยชน์ในการป้องกันการแพร่ระบาดของไข้เลือดออกได้อีกด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองศึกษาการผลิตและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. เมื่อทำการแยกสกัดเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ที่มี *Taq* DNA polymerase recombinant plasmid โดยได้ทำการแยกสกัดเอนไซม์ทั้งหมด 5 ครั้ง พบว่าเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 94 กิโลดาลตัน

2. ค่าความว่องไวของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ทั้ง 5 ครั้งมีค่าดังนี้ 800, 600, 600, 1000 และ 800 ยูนิต/ไมโครลิตร ตามลำดับได้ปริมาณเอนไซม์ทั้งหมด ดังนี้คือ 4.6×10^6, 3.6×10^6, 3.3×10^6, 6.0×10^6 และ 4.56×10^6 ยูนิต

3. จากการทดสอบหาความคงทนของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ พบว่า เอนไซม์ที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7 วันสามารถให้ผล PCR บวก ได้ชัดเจนเหมือนปรกติแต่ถึงแม้ว่าจะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน ก็สามารถให้ผล PCR บวกได้

4. เมื่อนำเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ครั้งที่4 เจือจาง 1:10 และ 1:1000 มาทดสอบกับดีเอ็นเอไวรัส SEMBV (positive control) พบว่าสามารถให้ผล PCR บวกกับปริมาณของดีเอ็นน้อยที่สุด 25 และ 2000 นาโนกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ 640 bp

5. เมื่อนำเอนไซม์ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:10 และ 1:100 มาทดสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างกุ้ง 5 ตัวอย่าง พบว่าเอนไซม์ที่เจือจาง 1:10 สามารถให้ผล PCR บวก 3 ตัวอย่าง PCR ลบ 2 ตัวอย่าง ขณะที่เอนไซม์เจือจาง 1:1000 ให้ผล PCR ลบทั้ง 5 ตัวอย่าง

6. สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้ทำการทดสอบในการตรวจหาไวรัสเด็งกี่ คือเอนไซม์ MMLV-RTความเข้มข้น 12.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, primer ความเข้มข้น 25 พิโคโมล/ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:10

7. ปริมาณน้อยที่สุดของอาร์เอ็นเอไวรัสเด็งกี่ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 (positive control) ที่สามารถทดสอบได้โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ครั้งที่ 4 เจือจาง 1:10 คือ ที่ 137.5 นาโนกรัม มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชนิดดังนี้คือ 229, 233, 227 และ 241 bp ตามลำดับ

8. จากจำนวนตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วย 90 ตัวอย่าง เป็นไข้เลือดออก 13 ตัวอย่าง ให้ผล RT-PCR บวก 6 ตัวอย่าง

9. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่แยกสกัดได้ มีราคาถูกกว่าเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, U.S.A. ประมาณ 50 เท่า

เอกสารอ้างอิง

จริยา ชมวารินทร์. 2540. PCR Technology and Applications. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.. หน้า 3.8.

ประเสริฐ ทองเจริญ. 2530. ไข้สมองอักเสบ. คลินิก. 1 :13 -17.

พีไลพันธ์ พุธวัฒนะ.2540. ไวรัสวิทยา. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 21.9 - 21.10.

Attathom, S., Chiemsombol, P., Sutabutra. and Pongpanitanond, R. 1990. Characterization of tomato yellow leaf curl virus. Kasetsart Journal. 24: 1-5.

Birnboim, H.C.and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extration procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids. Res. 7 : 1513 - 1523.

Boom, R., Sol, C., Salimans, M., Jansen, C.L., Wertheim, P. and Vander Noorda , J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28 : 495 - 503.

Chang, J.J., Trent, D.W. and Vorndam, A.V. 1994. An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize flaviviruses. J. Clin. Microbiol. 32 : 477 - 83.

Desai, U.J. and Pfaffle, P.K. 1995. Single-Step Purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli.* Bio. Techniques. 19: 780 - 784.

Deubel, V., Kinney, R.M. and Trent, D.W. 1990. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype : comparative analysis of the full-length genome. Virology. 165 : 234 - 244.

Eckert, K.A. and Kunkel, K.A. 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Nucleic Acid Res. 18 (13) : 3739 – 3744.

Eldadah, Z.A., Asher, D.M. and Godec, M.S. 1991. Detection of Flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Med. Virol. 33 : 260 - 267.

Halstead, S.B. 1988. Pathogenesis of dengue ; challenges to Molecular Biology. Science. 239 : 476-481.

Henchal, E.A., Polo, S.L., Vorndam, V., Yaemsiri, C., Innis, B.L.and Hoke C.H.1991. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infection by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. Am.J. Trop. Med. Hyg. 45 : 418 - 428.

Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H. and Brown, M.A.D. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplifier DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 9436 - 9440.

Inouye, K., Yamano, K., Ikeda, N., Kimura, T., Nakaho, H., Momoyama, K., Kobayashi, J. and Miyajima, S. 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) , which causes penaeid acute virus viremia (PAV) . Fish Path. 31 : 39 - 45.

Jarumanokul, R. 1996. Cloning and expression of dengue virus envelope protein gene in *Escherichia coli* . A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of master of science (microbiology). p.13 – 14.

Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S., Khongpradit, R. and Akpanithan-pong , U. 1995. Mass mortality caused by systemic bacilliform virus in cultured penaeid shrimp, *Penaeus monodon*, in Thailand. Asian Shrimp News. 5 : 2 – 3.

Klenow, H. and Henningen, I. 1970. Selective elimination of the exonuclease activity of deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* by limited proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 65 : 168 – 175.

Korolev, S., Nayal, M., Barnes, W.M., Di-Cera, E. and Waksman, G. 1995 . Crystal structure of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I at 2.5 A resolution : structural basis for thermostability. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 92 (20) : 9264 - 9268.

Laille, M., Deubel, V. and Sainte-Marie, F.F. 1991. Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction. J. Med. Viol. 34 : 51 - 54.

Lanciotto, R.S., Callsher, C. H., Gubler, D.J., Chang, G.J. and Vorndam, A.V. 1992. Rapid detection and typing of dengues viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Clin. Micro. 30 : 545 - 551

Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R. and Gelfand,D.H. 1989. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. J. Biol. Chem. 264 : 6427 - 6437.

Leelayuwat, C., Pacchaiyaphum, R., Romphruk, A., srisuk, T., Limpaiboon, T. and Romphruk, 1997. Production and Evaluation of *Taq* DNA polymerase. J. Med. Assoc. Thai. 80(1) : 130 - 137.

Leland, D.S. 1996. The pathogenesis of dengue : molecular epidemiology in Infectious disease. Am. J. Epidermal. 114 : 632 - 648.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure during assembly of head of Bacteriophage-T. Nature. 277 : 680-685.

Lo, C.F, Leu, J.H., HO, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E.,Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H. and Kou, G.H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Org. 25 : 133 - 141.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951.Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Mirawati sudiro, T., Ishiko, H., Green, S., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Kalayanaroog, S., Rothman, A.L. Raengsakulrach, B., Janus, J., Kurane, I. and Ennis, F.A. 1997. Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3′- noncoding region universal primers. Am. J. Trop. Med. Hyg. 56 : 424 - 429.

Morita, K., Tangks, M. and Igarashi, A. 1991. Rapid Identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. J. Clin. Micro. 29 : 2107 - 2110.

Mullis, K.B. and Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology. 55 : 335 - 350.

Nakano, H., Koube, H., Umesawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K. and Oseko, N. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993 : epizootiological survey and infection trial. Fish Path. 29 : 135 - 139.

Nash, G.L. 1995. SEMBV – An emerging viral treat to cultured shrimp in Asia, Asian Shrimp News. 4 : 2 - 3.

Park, J.H., Kim, J.S. and Kwon, S.T. 1993. Purification and characterization of *Thermus caldophilus* Gk 24 DNA polymerase. Eur. J. Biochem. 214(1) : 135 - 140.

Phair, L.P. and Wolonsky, S. 1992. Diagnosis of infectious with the human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. 15 : 13 - 16.

Pluthero, F.G. 1993. Rapid purification of high-activity *Taq* DNA polymerase. Nucleic Acid Res. 21 : 4850 - 4851.

Ruangsri, J. and Supamattaya, K. 1999. DNA detection in suspected carriers of virus (SEMBV) by PCR (polymerase chain Reaction). Songklanakarin J. Sci. Technol. 21(1) : 41 - 51.

Saiki, S.F., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.S., Harm, G.T., Erich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230 : 1350 - 1354.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory manual, 2 nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Press; New York.

Soo, H. M., Jimin, W. and Thomas, A. 1996. Structure of *Taq* DNA Polymerase with DNA at the polymerase active site. Nature. 382 : 278 – 281.

Takahashi, Y., Itami, T., Kondo, M., Fujii, R., Tomonaga, s., Supamattaaya, K. and Boonyaratpalin, S. 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus Japonicus*). Fish Path. 29 : 121 - 125.

Tanner, J.J., Hecht, R.M.and Krause, K.L.1996. Determination of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus Aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 25 angstroms resolution. Biochemistry. 35(8) : 2597 - 2609.

Tindall, K.R. and Kunkel, T.A. 1988. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Biochemistry. 27 : 6008 -6013.

Wang, C.S., Tsai, Y.J., Kou, G.H. and Chen, S.N. 1997. Detection of white spot disease virus infection in wild-caught greasy back shrimp, *Metapendeus ensis* (de Haan) in Taiwan. Fish Path. 32(1) : 35-41.

White, D.O. and fenner, F.J., comp. 1994. Laboratory diagnosis of viral diseases. Medical virology, 4 th edition, San Diego. Academic Press. 191 - 218.

Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akrajamorn, A., Boonsaeng, V. , Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995. A nonoccluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. 21 : 69 - 77.

Yenchitsomanus, P., Sricharoen, P., Jaruthasana, I., Pattanakitsakul, S., mongkolsapaya, J. and Malasit, P. 1996. Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). Southest Asain J. Med. Public Health. 27:228 – 236.

ภาคผนวก

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อ** (Media)

   1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม

2. **สารละลายและบัฟเฟอร์** (Solution and Buffer)

   2.1 สารละลายสำหรับการแยกสกัดเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

2.1.1 Buffer A
- 50 mM Tris – HCl pH 7.9
- 50 mM Dextrose
- 1 mM EDTA

2.1.2 Lysis buffer
- 10 mM Tris – HCl pH 7.9
- 50 mM KCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM PMSF
- 0.5% Tween 20
- 0.5% Nonidet P40

2.1.3 Storage buffer
- 50 mM Tris – HCl pH 7.9
- 50 mM KCl
- 0.1 mM EDTA
- 1 mM DTT
- 0.5 mM PMSF
- 50% Glycerol

2.2 สารละลายสำหรับการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

2.2.1 สารละลาย I - 50 mM glucose
- 25 mM Tris – HCl, pH 8.0
- 10 mM EDTA

2.2.2 สารละลาย II - 0.2 N NaOH
- 1% SDS

2.2.3 สารละลาย III - 5 M Potassium acetate
- 11.8 ml glacial acetic acid
- น้ำกลั่น 28.5 ml

2.3 สารละลายสำหรับการตรวจหาปริมาณโปรตีน

2.3.1 Reagent A - Alkaline copper tartate solution บริษัท BIO-RAD, U.S.A.

2.3.2 Reagent B - Folin Reagent บริษัท BIO-RAD, U.S.A.

2.4 สารละลายสำหรับ การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

2.4.1 Stacking gel - 30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide
- 10 M Tris–HCl, pH 6.8
- 10% SDS
- 10% Ammonium persulfate
- TEMED
- น้ำกลั่น

2.4.2 Separating gel - 30% Acrylamide -0.8% bisacrylamide
- 1.5 M Tris – HCl, pH 8.8
- 10% SDS
- 10% Ammonium persulfate
- TEMED
- น้ำกลั่น

2.4.3 Laemmli running buffer pH 8.3

- 0.025 M Tris-HCl
- 0.192 M glycine
- 1% SDS

2.4.4 Sample buffer
- 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8
- 40% glycerol
- 8 mM EDTA
- 4% SDS
- 4% β mercaptoethanol
- 0.4% bromophenolblue

2.4.5 1 x TAE บัฟเฟอร์

- 4.84 gm Trisbase
- 1.02 ml glacial acetic
- 2.0 ml 0.5 M EDTA pH 8.0

2.4.6 staining solution
- 0.02% Coomassie brillient blue
- 50% methanol
- 7.5% acetic acid

2.4.7 destaining solution
- 50% methanol
- 7.5% acetic acid

2.5 สารละลายสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

2.5.1 ซิลิกา (SiO_2)

2.5.2 Lysing buffer
- 4 M guanidine isothiocyanate
- 40 mM Tris – HCl , pH 6.7
- 17 mM EDTA , pH 8.0
- 1% Triton X–100

2.5.3 Washing buffer
- 50% ethanol
- 10 mM Tris – HCl , pH 7.4
- 1 mM EDTA
- 50 mM NaCl

2.6 สารละลายสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR

2.6.1 PCR buffer (10 x buffer)
- 50 mM KCl
- 10 mM Tris HCl
- 0.1% Triton X- 100
- 1.0 mM $MgCl_2$

2.6.2 25 mM $MgCl_2$

ชั่งสาร $MgCl_2$ 5.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางวาสนา บัวทอง

วัน เดือน ปีเกิด 18 กันยายน 2504

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2531