

สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระดับการประเมินคุณภาพ

☐ ดีเยี่ยม

☒ ดีมาก

☐ ดี

☐ ปานกลาง





การศึกษาผลของพลาสมิดที่โคลนด้วยยีนอินเตอร์เฟอรอนแกมมาของ
สุกรต่อการแบ่งตัวของ PORCINE REPRODUCTIVE AND
RESPIRATORY SYNDROME VIRUS
ในเซลล์ MARC-145

สุรางคนางค์ แย้มกันชู

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักบริหารและพัฒนานิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

การศึกษาผลของพลาสมาที่โคลนด้วยอินเตอร์เฟอรอนแกมมาของ
สุกรต่อการแบ่งตัวของ PORCINE REPRODUCTIVE AND
RESPIRATORY SYNDROME VIRUS
ในเซลล์ MARC-145

โดย

สุรางคนางค์ แยมกันชู

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วสิน เจริญตันธนกุล)

วันที่ 5 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2555

กรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล จิรบุญยานนท์)

วันที่ 5 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2555

กรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

วันที่ 5 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2555

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร

(อาจารย์ ดร.มยุรา ศรีกัลยานกุล)

วันที่ 5 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2555

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำเนียร ยศราช)

ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา

วันที่ 13 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2556

ชื่อเรื่อง	การศึกษาผลของพลาสมิดที่โคลนด้วยอินเตอร์เฟอรอนแกมมาของสุกรต่อการแบ่งตัวของ porcine reproductive and respiratory syndrome virus ในเซลล์ MARC-145
ชื่อผู้เขียน	นางสาวสุรางคนางค์ แยมกันชู
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วสิน เจริญตันธนกุล

บทคัดย่อ

อินเตอร์เฟอรอนแกมมา (interferon gamma ; IFN γ) เป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบช่วยลดการติดเชื้อ porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ในสุกร จุดมุ่งหมายในการศึกษานี้เพื่อสร้างพลาสมิดที่มียีน IFN γ ของสุกรและทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมิดดังกล่าวต่อการแบ่งตัวของ PRRSV ในเซลล์มะเร็งไตลิง (MARC-145) โดยจากการทำ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) จาก peripheral blood mononuclear cell ของสุกรด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน IFN γ ของสุกรที่รายงานในฐานข้อมูล (NM_213948) พบว่าได้ยีน IFN γ ขนาด 501 คู่เบส เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนได้เป็นสายยาว 166 กรดอะมิโน ซึ่งยีน IFN γ ที่แยกได้เหมือนกับยีนเดียวกันที่รายงานในฐานข้อมูล 99% มี 2 เบสที่เกิดจากการแทนที่ของเบส A เป็น G ที่ตำแหน่ง 4 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก serine เป็น glycine ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบเป็นกลางแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน และ เบส A เป็น G ที่ตำแหน่ง 438 ซึ่งไม่มีผลต่อลำดับกรดอะมิโน เมื่อนำพลาสมิดที่มียีน IFN γ ไปถ่ายเข้าสู่เซลล์ MARC-145 และทดสอบด้วยเทคนิค RT-PCR และ ELISA พบว่า พลาสมิดสามารถแสดงออกยีน IFN γ ได้ทั้งในระดับ mRNA และระดับโปรตีน พลาสมิดที่มียีน IFN γ สามารถลด cytopathic effect ในเซลล์ MARC-15 ที่ บ่มร่วมกับ PRRSV ได้ แสดงว่าพลาสมิดดังกล่าวมีผลยับยั้งต่อการแบ่งตัวของ PRRSV ซึ่งในอนาคต พลาสมิดนี้อาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคอันเนื่องมาจาก PRRSV ได้

คำสำคัญ : ยีน, อินเตอร์เฟอรอนแกมมา, สุกร, MARC-145

Title	Study of recombinant plasmids expressing porcine interferon gamma gene on replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in MARC-145 cells
Author	Miss Surangkanang Yamkanchoo
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Wasin Charerntantanakul

ABSTRACT

Interferon gamma (IFN γ) is a pro-inflammatory cytokine that possesses anti-porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) effects. This study aimed to generate recombinant plasmids expressing porcine IFN γ gene and assessed their potential in inhibiting PRRSV replication in MARC-145 cells primarily by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), using IFN γ mRNA isolated from porcine peripheral blood mononuclear cells as templates. Primers from IFN γ were designed based on NM_213948. Results showed that the size of the IFN γ insert was 501 bp which corresponded to 166 amino acids. This nucleotide sequence of the IFN γ insert showed 99% homology to IFN γ mRNA in the database with two nucleotide substitutions, A to G at position 4 and 438. The first substitution resulted in amino acid change from serine to glycine while the second substitution did not result in any amino acid change. When transfected into MARC-145 cells and assessed by RT-PCR and ELISA techniques, the recombinant plasmids could express IFN γ at transcription and translation levels. The recombinant plasmids were able to decrease cytopathic effect in MARC-145 cells induced by PRRSV. These results indicated that recombinant plasmids expressing porcine IFN γ could effectively inhibit the replication of PRRSV in MARC-145 cell. In the future, the recombinant plasmids may be applied therapeutically for PRRSV-mediated diseases.

Keyword : gene, interferon gamma, pig, MARC-145

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์เรื่อง "การศึกษาผลของพลาสมิดที่โคลนด้วยอินเตอร์เฟอรอนแกมมาของสุกรต่อการแบ่งตัวของ porcine reproductive and respiratory syndrome virus ในเซลล์ MARC-145" เพื่อประกอบการศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วสิน เจริญดิ้นธนกุล ผู้ที่เป็นที่ปรึกษาในด้านการทำงานวิจัย และช่วยชี้แนะในการทำงานวิจัย และแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำงานวิจัย และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล ธิบุญยานนท์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาคำแนะนำข้อคิดเห็นและช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำงานวิจัย ตลอดจนการตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์การทำการทดลอง ทั้งการให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมี พร้อมทั้งคำแนะนำในการทำงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่าง ๆ อีกทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความสะดวกในการทำงาน

และเหนือสิ่งอื่นใดขอขอบพระคุณ บิดา มารดา น้องชาย และญาติพี่น้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนทั้งทางด้านกำลังใจ และสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษา ตลอดจนความรักความห่วงใยที่มีให้ตลอดมา ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากนักน้อย ในการที่จะนำไปศึกษาค้นคว้าความรู้ให้มีประสิทธิภาพและมีประโยชน์ต่อการใช้งานจริงในอนาคต

สุรางคนางค์ แยมกันชู

มีนาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(9)
สารบัญตารางผนวก	(11)
สารบัญภาพผนวก	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตงานวิจัย	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)	3
การตอบสนองของสุกรเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส	7
IFN γ	13
การตอบสนองของ NK cell เมื่อมีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์	15
Signal transduction	16
กลไกการเกิด IFN γ จาก APCs	20
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	22
วัสดุอุปกรณ์	22
วิธีการทดลอง	27
สถานที่ดำเนินการวิจัย	36
ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	37
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	38

	หน้า
ผลการวิจัย	38
วิจารณ์ผลการวิจัย	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	56
สรุปผลการวิจัย	56
ข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก	61
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเซลล์ MARC-145	62
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์	71
ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย	76

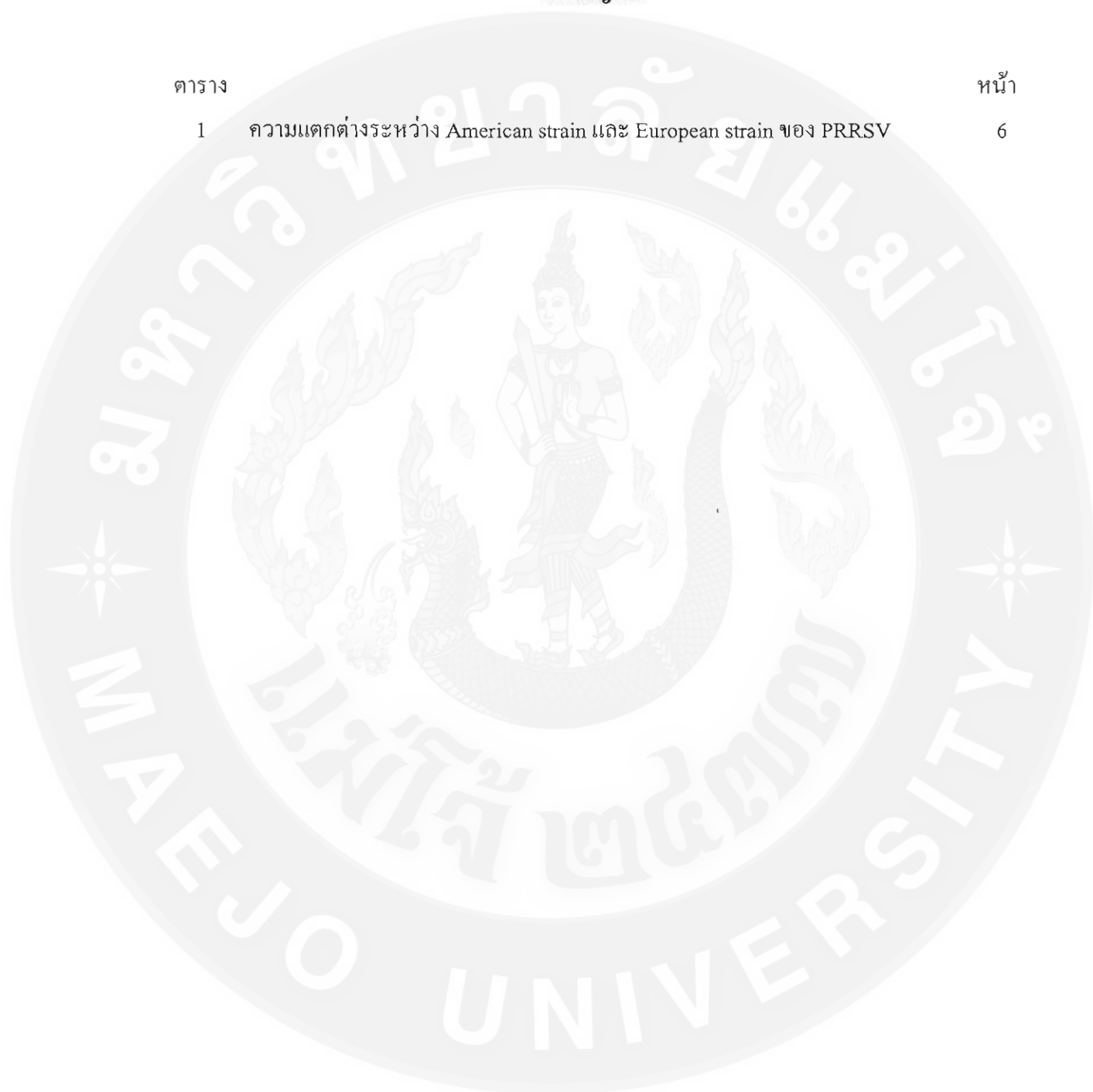
สารบัญตาราง

ตาราง

หน้า

- 1 ความแตกต่างระหว่าง American strain และ European strain ของ PRRSV

6



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 รอยโรคจาก PRRSV ในสุกรแสดงอาการผิวหนังเปลี่ยนสีในบางบริเวณ	4
2 แผนภาพของไวรัส	10
3 Receptor บน PAM ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ PRRSV	10
4 การติดเชื้อ PRRSV เข้าสู่เซลล์มาโครฟาจ	12
5 การตอบสนองของ NK cell ต่อการติดเชื้อ	15
6 IFN γ signal transduction	17
7 PKR pathway	18
8 OAS pathway	19
9 ปฏิกริยาระหว่าง APCs และ ลิมโฟไซต์ชนิดที	21
10 การออกแบบไพรเมอร์จากยีน IFN γ (NM_213948)	29
11 แผนที่เวกเตอร์ pcDNA TM 3.1	30
12 บริเวณ kozak sequence	30
13 การเข้าเชื่อมกันของยีน IFN γ ขนาด 500 คู่เบส ในพลาสมิดเวกเตอร์ pcDNA TM 3.1 ตรวจสอบความถูกต้องด้วย <i>Bam</i> HI	31
14 การเข้าเชื่อมกันของยีน IFN γ ขนาด 500 คู่เบส ในพลาสมิดเวกเตอร์ pcDNA TM 3.1 ตรวจสอบความถูกต้องของทิศทางการโคลนด้วย <i>Pst</i> I	33
15 ชั้นของ PBMC ที่สกัดจากเลือดสุกร	39
16 ผลการทำ RT-PCR ของยีน IFN γ จาก PBMC	40
17 การคัดเลือกโคโลนีของ <i>E. coli</i> ที่คาดว่าจะได้รับยีน IFN γ ด้วยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI	41
18 พลาสมิดเวกเตอร์ที่คาดว่าจะได้รับยีน IFN γ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Pst</i> I	42
19 การตรวจสอบความถูกต้องจากการคัดเลือกโคโลนีของ <i>E. coli</i> ที่คาดว่าจะได้รับยีน IFN γ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI	43
20 การตรวจสอบความถูกต้องจากการคัดเลือกโคโลนีของ <i>E. coli</i> ที่คาดว่าจะได้รับยีน IFN γ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Pst</i> I	44

ภาพ	หน้า
21 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ IFN γ ของสุกร กับ IFN γ ที่ปรากฏ ในฐานข้อมูล Genbank (NM_213948)	45
22 ลำดับเบสและลำดับของกรดอะมิโนของยีน IFN γ ของสุกรในฐานข้อมูล GeneBank (NM_213948)	46
23 ลำดับเบสและลำดับของกรดอะมิโนของยีน IFN γ ของสุกรที่แยกได้จาก PBMC	46
24 พลาสมิด pIFN γ และ pcDNA TM 3.1 หลังจากกำจัด endotoxin เพื่อดูความแตกต่างของ ขนาดดีเอ็นเอที่ต่างกัน 500 คู่เบส	47
25 การแสดงออกของพลาสมิด pIFN γ เมื่อถูกถ่ายเข้าสู่เซลล์ MARC-145 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยการเก็บเซลล์มาวิเคราะห์ RNA โดยเทคนิค RT-PCR	48
26 การแสดงออกของโปรตีน IFN γ ใน MARC-145 หลังจากที่ถูกถ่ายด้วย พลาสมิด pIFN γ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยการเก็บอาหารมาวิเคราะห์โปรตีน โดยเทคนิค ELISA	49
27 การตายของเซลล์ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส	50
28 เปรียบไตเตอร์ของ PRRSV ในเซลล์ MARC-145 (PRRSV) MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วย pcDNA 3.1 (PRRSV+pcDNA 3.1) และ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิด pIFN γ (PRRSV +pIFN γ) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง	53

สารบัญตารางผนวก

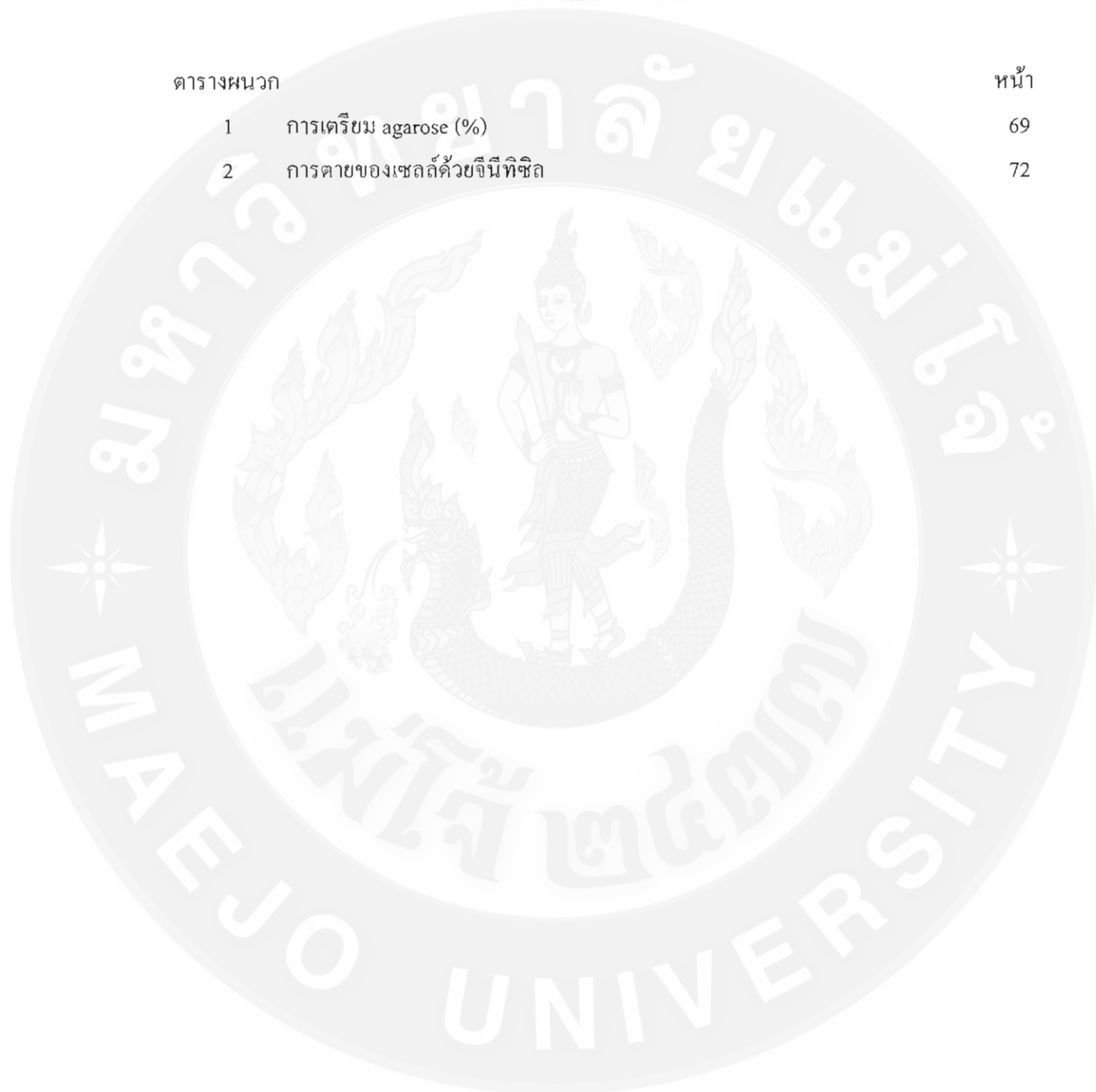
ตารางผนวก

- 1 การเตรียม agarose (%)
- 2 การตายของเซลล์ด้วยจินิทิซิล

หน้า

69

72



สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก

หน้า

1 การตายของเซลล์ด้วยจีนีทิซิด

72



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

สุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจของประเทศไทยทั้งบริโภคภายในและส่งออกไปยังต่างประเทศ ซึ่งในปี 2553 ที่ผ่านมามียอดการส่งออกประมาณ 1,916,621,522.0 บาท ได้ผลผลิตประมาณ 9,928,991 กิโลกรัม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ซึ่งเป็นรายได้หลักเลี้ยงเกษตรกรของประเทศไทย

ปัญหาในการเพาะเลี้ยงสุกรของประเทศไทยที่สำคัญก็คือ มีอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น และมีปัญหาระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว สุกรแม่พันธุ์มีการแท้งในระยะท้ายของการตั้งท้อง มีการตายในลูกสุกร มีอัตราการเติบโตช้า อาการปอดบวม การเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อน ซึ่งเป็นสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส ส่งผลกระทบให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรผลิตสุกรลดลง และเกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก เพราะเมื่อสุกรมีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของสุกรมีการเปลี่ยนแปลง และง่ายต่อการติดเชื้ออื่น ทำให้สุกรตายเพิ่มขึ้น เนื่องจาก PRRSV สามารถทำลายเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) ที่เป็นเซลล์สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (Bautista and Molitor, 1999)

อินเตอร์เฟอรอนแกมมา (Interferon gamma; IFN γ) เป็นไซโตไคน์ (cytokine) สำคัญที่สร้างมาจากลิมโฟไซต์ชนิดที (T lymphocyte) และ natural killer cell (NK cell) มีหน้าที่ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากเซลล์ (cell-mediated immunity) (Susan et al., 1999) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และจะมีการหลั่ง IFN γ ออกมาเมื่อมีการติดเชื้อ (Murtaugh et al., 2002) ซึ่งปริมาณของ IFN γ ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้การแสดงออกของ major histocompatibility complex (MHC) class I และ class II เพื่อนำเสนอแอนติเจนในเซลล์เป้าหมายเพิ่มขึ้น และส่งเสริม cytotoxicity ของ NK cell ทำให้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส PRRSV ในมาโครฟาจได้ (Bautista and Molitor, 1999) และจากการศึกษาการติดเชื้อ PRRSV ในปอดสุกรพบว่ามีการหลั่ง IFN γ ที่มากขึ้น (Thanawongnuwech et al., 2003)

ในการป้องกันการติดเชื้อ PRRSV ได้มีการศึกษาการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดวัคซีนเชื้อเป็น พบว่ากระตุ้นให้เกิด virus specific IFN γ secreting cell และ

neutralizing antibody ได้ (Meier et al., 2003; Royae et al., 2004; Zuckermann et al., 2007) ต่อมา ได้มีการพัฒนา deoxyribonucleic acid (DNA) vaccine ที่เป็นส่วน envelop glycoprotein (GP) 5 และ matrix (M) protein ของ PRRSV พบว่า GP5/M heterodimers สามารถกระตุ้นการสร้าง neutralizing antibody ได้ (Jiang et al., 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าไซโตไคน์เช่น interleukin (IL)-29 ที่ได้จากการแสดงออกใน *Escherichia coli* (*E. coli*) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ PRRSV ใน เซลล์ MARC-145 ได้ (Wang et al., 2011) จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า IFN γ ที่เป็นไซโตไคน์ชนิดหนึ่งน่าจะสามารถลดการเพิ่มจำนวนของ PRRSV ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. แยกยีนอินเตอร์เฟอรอนแกมมาของสุกรและสร้างพลาสมิดที่มียีน IFN γ (pIFN γ)
2. ศึกษาการแสดงออกของยีน IFN γ ในเซลล์ MARC-145
3. การศึกษาผลของ IFN γ ที่มีต่อการแบ่งตัวของ PRRSV

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ pIFN γ
2. ได้องค์ความรู้เรื่อง pIFN γ ต่อการแบ่งตัวของ PRRSV

ขอบเขตงานวิจัย

1. แยกยีน IFN γ จากสุกร
2. สังเคราะห์ pIFN γ ศึกษาการระดับการแสดงออกของยีน IFN γ และการศึกษาผลของ IFN γ ที่มีต่อการแบ่งตัวของ PRRSV

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

PRRSV เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในระบบสืบพันธุ์ในสุกรแม่พันธุ์ ทำให้สุกรแม่พันธุ์มีอาการไม่กินอาหาร แท้งลูก ลูกตาย คลอดก่อนกำหนด (สุกรจะตั้งท้อง 107-112 วัน) ลูกสุกรไม่แข็งแรงและ มีการสืบพันธุ์ในครั้งต่อไปที่ช้า และก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจซึ่งเป็นปัญหากับสุกรทุกอายุ เช่นมีอาการปอดบวม หายใจลำบาก ทำให้มีอัตราการตายที่สูง และมีการติดเชื้อแทรกซ้อนจากไวรัส และแบคทีเรีย ได้แก่ *Salmonella choleraesuis*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* (Zimmerman et al., 1997) และมีอาการ ขี้ต่ออักเสบ การติดเชื้อที่ตา และเยื่อหุ้มสมองอักเสบร่วมกับ การติดเชื้อ Pseudorabies virus, Porcine parvovirus, Swine influenza virus (Molitor et al., 1997)

Cho and Dee (2006) มีการรายงานว่ PRRSV มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมน้อย จะมียู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 ชั่วโมง และ ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ได้นาน 20 นาที ซึ่งไวรัสนี้จะมี ความทนต่อระดับ ความเป็นกรดต่างได้ที่ 6.5-7.5 และจะไม่สามารถทนทานต่อความเป็นกรดต่างในระดับที่ ต่ำกว่า 6 และ มากกว่า 7.65

การแพร่กระจายของโรค

การแพร่กระจายของโรคนี้จะมีมากขึ้นเมื่อมีสุกรในฟาร์มที่หนาแน่นเกินไป การเคลื่อนย้ายสุกร คุณภาพของอากาศ สุขภาพของสุกรในขณะนั้น ระบบการจัดการฟาร์ม และสายพันธุ์ของไวรัสที่มีการติดเชื้อ (Done et al., 1996) เมื่อมีการติดเชื้อในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสุกรอาจจะตายได้ และในระยะที่มีการติดเชื้อแล้วสุกรจะมีอาการเบื่ออาหาร นอนซึม และบางครั้งผิวหนังจะมีการเปลี่ยนสี ในสุกรแม่พันธุ์และลูกสุกร ผิวหนังจะมีแผล หูจะมีสีฟ้า ปากช่องคลอดเป็นสีฟ้า และมีผื่นแดงจากการมีไข้ติดเชื้อ ดังภาพ 1 (Done et al., 1996) การแพร่กระจายของเชื้อสามารถแพร่ผ่านทางจมูก หรือของเหลว ละอองของเหลว และจะมีการแพร่กระจายเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการ

เคลื่อนย้ายสุกร (Done et al., 1996) ในการแพร่กระจายของเชื้อทางอสุจิ เลือด น้ำลาย อุจจาระ ละอองของเหลว นม และเมื่อมีการติดเชื้อในปอดป็นทุติยภูมิ จะสามารถตรวจพบได้ที่อสุจิที่ระยะเวลา 43-92 วัน และจะสามารถตรวจพบได้ที่อุจจาระในระยะเวลา 28-35 วัน (Cho and Dee, 2006)



ภาพ 1 รอยโรคจาก PRRSV ในสุกรแสดงอาการผิวหนังเปลี่ยนสีในบางบริเวณ
ที่มา : Done et al. (1996)

การวินิจฉัย

สามารถแยกไวรัสได้จาก ไชกระดูก ม้าม ทับมัส ต่อมทอลซิล ต่อมน้ำเหลือง ตับ ตับ และในซีรัม ไวรัสสามารถเจริญได้ใน porcine alveolar macrophage (PAM) ที่แยกได้จากปอด และสามารถตรวจสอบไวรัสได้ในเซลล์เพื่อดูการเกิด cytopathic effect (CPE) ของ PRRSV ซึ่งจะสามารถเกิดได้ภายใน 3-4 วัน การตรวจสอบไวรัสด้วย indirect immunostaining method เช่น indirect fluorescent antibody (IFA) test ใช้ตรวจสอบในเนื้อเยื่อ เช่น ปอดและม้าม และมีการตรวจด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) การตรวจสอบในซีรัม (Done et al., 1996) การตรวจซีรัมของสุกรที่มีการติดเชื้อ PRRSV ประกอบไปด้วย serum neutralization (SN) test, immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) และ enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) (Zimmerman et al., 1997)

PRRSV เป็น ribonucleic acid (RNA) ไวรัส อยู่ใน จีนัส (genus) Arterivirus แฟมิลี (family) Arteriviridae ออร์เดอร์ (order) Nidovirales ซึ่งใน แฟมิลี Arteriviridae จะประกอบไปด้วย equine arteritis virus, lactate dehydrogenase evaluating virus และ simian hemorrhagic fever virus (Zimmerman et al., 1997) ลักษณะโดยทั่วไปของ PRRSV เป็น single stranded positive sense RNA เป็นไวรัสที่มีซองไขมัน (envelop) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 50-65 nm (Cho and Dee, 2006) ลักษณะเป็น icosahedral nucleocapsid symmetry (Done et al., 1996) ไวรัสนี้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมได้ง่าย ทำให้มีการป้องกันได้ยาก มี 9 open reading frames (ORF) (ภาพ 2) ซึ่งมี 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6 และ 7 (Delputte and Nauwynck, 2004) ประกอบด้วย nucleocapsid (N) protein (ORF7), unglycosylated membrane protein ประกอบด้วย M protein (ORF6), P2b (ORF2b), GP5 (ORF5), non structural protein หรือ viral replicase (ORF 1a และ ORF 1b) และ membrane glycoproteins ประกอบไปด้วย GP2a, GP3 และ GP4 (ORF2a, ORF3, ORF4) GP5 และ M protein เป็น major membrane proteins ซึ่ง GP2a, P2b, GP3, GP4 เป็น minor structural proteins (Amonsin et al., 2009; Patton et al., 2009) PRRSV มีการเพิ่มจำนวนใน PAM (Bautista and Molitor., 1999) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ใน ม้าม ตับ และ ทัยมัส ต่อมาได้มีการศึกษาสายพันธุ์ของ PRRSV พบว่ามี 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ American stains (VR-2332) และ European stains (Lelystad virus; LV) ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันในระดับดีเอ็นเอ และระดับโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อมีการเปรียบเทียบระหว่าง VR-2332 และ LV พบว่ามีความคล้ายกัน ใน ORF ต่างๆ ดังนี้ ORF 2 76% ORF3 72% ORF4 80% ORF5 80% ORF6 91% และ ORF7 74% (Cho et al., 2006) และได้มีการแยกเชื้อ PRRSV จาก cell line ที่เกิดจาก MA-104 (African green monkey kidney) ซึ่งประกอบด้วย MARC-145 (Kim et al., 1993) เป็นเซลล์ที่ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้

ตาราง 1 ความแตกต่างระหว่าง American strains และ European strains ของ PRRSV

บริเวณที่เป็นยีน	โปรตีน	จำนวนกรดอะมิโน		การคำนวณน้ำหนักโปรตีน (kDa)		glycosylation site	
		Euro	Am	Euro	Am	Euro	Am
ORF2	GP2	249	265	28.4	29.4	2	2
ORF3	GP3	265	254	30.6	29.0	7	7
ORF4	GP4	183	178	20.0	19.6	4	4
ORF5	GP5	201	200	22.4	22.4	2	2-5
ORF6	M	173	174	18.9	19.1	2	1
ORF7	N	128	123	13.8	13.6	1	1

ที่มา : Dea et al. (2000)

หมายเหตุ Euro; European strains, AM; American strains

การตอบสนองของสุกรเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส

การตอบสนองโดยภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ในการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายของสุกร จะมีการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์ เมื่อมีการติดเชื้อจะมีการป้องกันของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่บริเวณการติดเชื้อที่เกิดขึ้น และภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะนี้จะไม่สามารถจดจำเชื้อโรคได้ แต่จะสามารถกำจัดเชื้อโรคได้ และยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้

เมื่อมีการติดเชื้อจะมีการสร้างสารภูมิคุ้มกันด้านการติดเชื้อเช่น อินเตอร์เฟอรอน อัลฟา (Interferon alpha; IFN α) ซึ่งสร้างมาจากมาโครฟาจ อินเตอร์เฟอรอนเบต้า (Interferon beta; IFN β) ซึ่งสร้างมาจากเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อไวรัส มีผลต่อการต่อต้านเชื้อไวรัสในเซลล์ข้างเคียง เมื่อมีการผลิต IFN α และ IFN β จะถูกขับออกมานอกเซลล์ แต่จะพบในปริมาณที่ต่ำ นำไปสู่การตอบสนองแบบจำเพาะ ซึ่งจะมีการกระตุ้น NK cell ให้มีการผลิต IFN γ และทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟา (Tumor necrosis factor-alpha ; TNF- α) มีหน้าที่เป็นสารต้านไวรัส (antiviral) (Dorman et al., 1999; Murtaugh et al., 2002)

การหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่มีการติดเชื้อที่สำคัญได้แก่ TNF- α และ IL-1 ในปอดที่มีปริมาณมากซึ่งมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อแทรกซ้อนของไข้หวัดชนิดรุนแรง (acute influenza) ซึ่ง TNF- α และ IL-1 สร้างมาจากมาโครฟาจ (Murtaugh et al., 2002) TNF- α จะส่งเสริมการอักเสบ กระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจ มีการนำเสนอแอนติเจนต่อ MHC class I และสร้างโปรตีนการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute phase protein) IL-1 เป็นตัวกระตุ้น nuclear transcription factor ซึ่ง nuclear transcription factor มีหน้าที่ควบคุมการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเมื่อมีการติดเชื้อ และควบคุมการถอดรหัสของยีน (transcription) ที่ประกอบไปด้วย การอักเสบ และไซโตไคน์ที่ควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (immunoregulatory cytokine) เป็นต้น (Murtaugh et al., 2002)

การตอบสนองโดยภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

1. ภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (Humoral immune response)

เมื่อสุกรมีการติดเชื้อ PRRSV จะมีกลไกการป้องกันตัวเองด้วยการสร้างสารภูมิคุ้มกันด้านทานอิมมูโนโกลบูลิน ชนิดเอ็ม (immunoglobulin M) ภายใน 5-7 วัน หลังจากที่มีการติดเชื้อ และสามารถตรวจพบอิมมูโนโกลบูลิน ชนิดจี (immunoglobulin G) ได้ภายใน 7-14 วัน และ อิมมูโนโกลบูลิน ชนิดเอ (immunoglobulin A) ที่พบได้ใน 25-35 วัน (Murtaugh et al., 2002; Mateu and Diaz, 2008) อิมมูโนโกลบูลิน ชนิดเอ็ม นี้จะลดต่ำลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ใน 42 วัน เนื่องจากมีความจำเพาะน้อยแต่จะมีการสร้างอิมมูโนโกลบูลินชนิดใหม่ซึ่งมีความจำเพาะมากกว่าคืออิมมูโนโกลบูลิน ชนิดจีสามารถตรวจพบได้มากที่สุดที่ 21-49 วัน ซึ่งเป็นการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันที่รวดเร็ว (Mateu and Diaz, 2008) แต่สารภูมิต้านทานนี้ไม่สามารถทำลายไวรัสที่อยู่ในกระแสเลือดได้ ซึ่งจะต้องใช้สารภูมิต้านทานชนิด neutralizing antibody ในการช่วยลดไวรัสในกระแสเลือด ซึ่งจะสามารถตรวจพบได้ใน 3-4 สัปดาห์ หลังจากที่มีการติดเชื้อ และเป็นการป้องกันการติดเชื้อของไวรัส ซึ่งจะสัมพันธ์กับการลดลงของ PRRSV ที่ปอดและที่ peripheral blood และจะไม่พบ PRRSV ในกระแสเลือดที่ 35-42 วัน (Murtaugh et al., 2002)

การป้องกันไวรัส PRRSV ด้วยแอนติบอดีในซีรัมเป็นการป้องกันขั้นต้นจากการติดเชื้อด้วย N protein (ORF 7) และ M protein (ORF 6) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ภายใน 7 วันและ 14 วันตามลำดับ GP5 (ORF 5) ต้องใช้ neutralizing antibody ซึ่งสามารถตรวจพบได้ใน 28 วัน

2. ภูมิคุ้มกันจากเซลล์

ภูมิคุ้มกันจากเซลล์ใช้กำจัดไวรัสที่มีการติดเชื้ออยู่ในเซลล์ซึ่งภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำไม่สามารถกำจัดได้ ภูมิคุ้มกันจากเซลล์นี้จะประกอบไปด้วย เซลล์ลิมโฟไซตชนิดที่มี $CD4^+$ ได้แก่ T helper (Th) 1 ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจและ $CD8^+$ ได้แก่ Cytotoxic T lymphocyte (CTL) ทำหน้าที่ฆ่าเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส

เซลล์ลิมโฟไซตชนิดที่ แบบ Th จะทำงานโดยการผ่านการกระตุ้นจาก MHC class II สร้างไซโตไคน์เพื่อที่จะกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซตชนิดบี (B lymphocyte) มาโครฟาจ CTL และ NK cell ซึ่งเซลล์ลิมโฟไซตชนิดที่ แบ่งได้ตามไซโตไคน์ที่เกิดขึ้น ได้แก่ Th1 สร้าง IFN γ IL-12 เป็นการตอบสนองจากเซลล์ และ Th2 สร้าง IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 และ IL-13 เป็นการตอบสนองชนิดสารน้ำ CTL ทำงานผ่านการกระตุ้นจาก MHC class I เพื่อเป็นการกำจัดไวรัสที่มีการติดเชื้อ

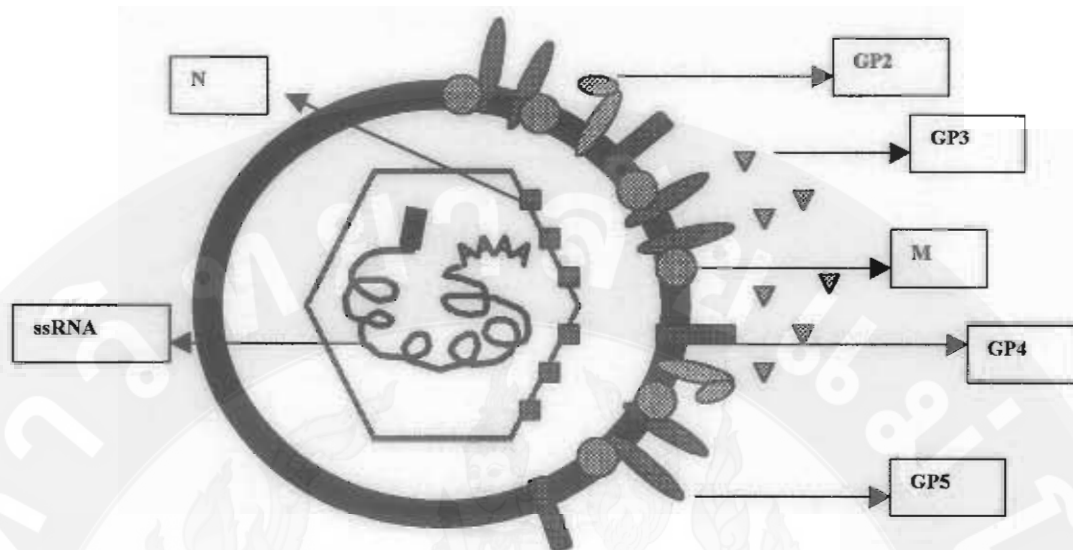
อยู่ภายในเซลล์ เป็นการตอบสนองจากเซลล์ ในการตอบสนองเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ปอดจะสามารถตรวจพบไวรัสจำนวนมากได้ในระยะเวลา 9 วัน หลังจากที่มีการติดเชื้อ ในขณะที่เซลล์ ลิมโฟไซต์มีจำนวนที่ลดลง จากการรายงานพบว่า $CD8^+$ ลิมโฟไซต์ชนิดที มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นในปอดพบวันที่ 25-35 วันหลังจากที่มีการติดเชื้อ ในการตอบสนองที่เกิดขึ้นใน peripheral blood ประมาณ 4 สัปดาห์ และมีการตอบสนองต่อ $CD4^+$ ในระยะเวลา 10 สัปดาห์ หลังจากที่มีการติดเชื้อแล้ว (Molitor et al., 1997; Bautista and Molitor, 1999; Murtaugh et al., 2002)

Fuertes et al. (1999) มีรายงานว่าเมื่อมีการติดเชื้อ PRRSV จะมีการเพิ่มขึ้นของ $CD8^+$ $CD4^+$ และ $D4^+$ $CD8^+$ ภายในจากการกระตุ้นเซลล์ และจะมีการแสดงออกของ TcR receptor ที่เพิ่มขึ้น ลิมโฟไซต์ชนิดทีมีการตอบสนองต่อไวรัสโดยการแสดงออกของไซโตไคน์ที่มาจาก Th 1 และการตอบสนองด้วย cytotoxic ที่เพิ่มขึ้น

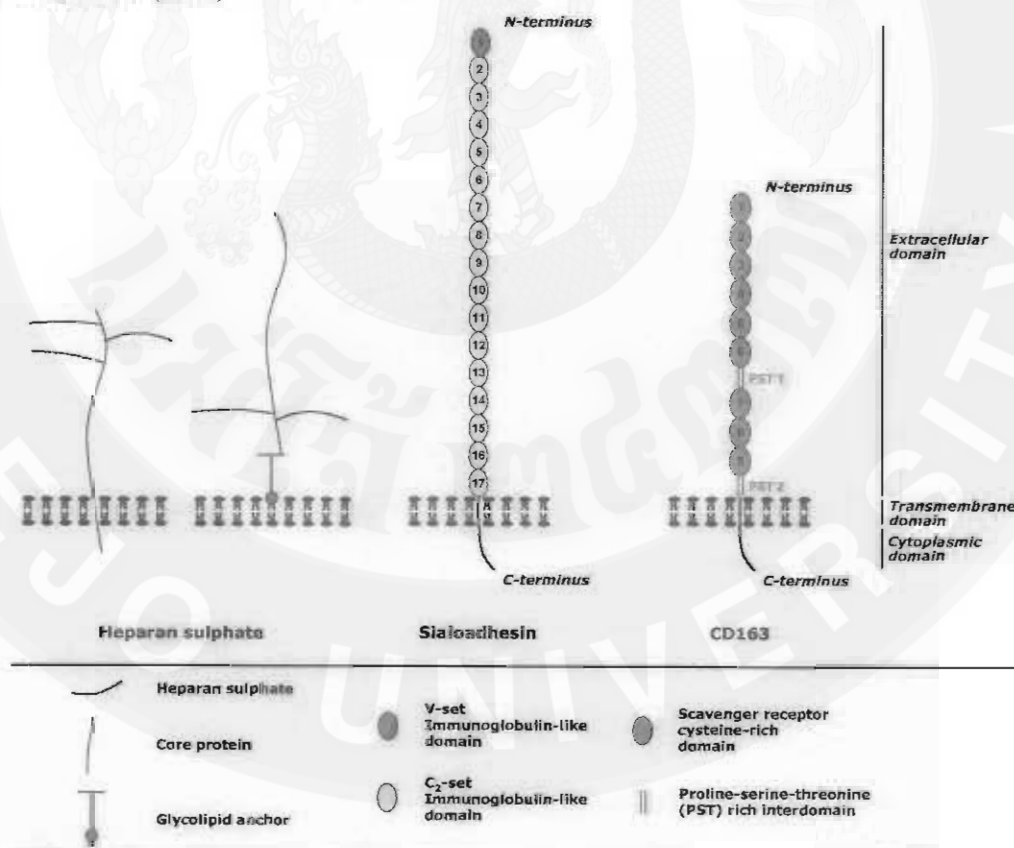
IFN γ เป็นไซโตไคน์ที่สร้างมาจากเซลล์ชนิดลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น และสามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cell ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส เมื่อมีการติดเชื้อจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนประกอบไปด้วย 2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS), double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR), ribonuclease L (RNaseL) OAS, PKR และ RNaseL ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัส (Murtaugh et al., 2002)

การติดเชื้อ PRRSV เข้าสู่เซลล์

บน PAM มี receptor 2 ชนิดที่มีความจำเพาะกับ PRRSV ประกอบไปด้วย heparan sulphate ซึ่งทำให้มีการเกาะติดของ PRRSV และ porcine sialoadhesin (pSn) ซึ่งมีความสำคัญในการปล่อยจีโนมสู่มาโครฟาจ (Delputte and Nauwynck, 2004) CD 163 receptor เป็นการแสดงออกของการเพิ่มจำนวนของ PRRSV ใน PAM (Patton et al., 2009) mRNA ของ CD163 มี 3348 คู่เบส จะประกอบไปด้วย 9 N-terminal scavenger receptor cysteine rich (SRCR) domain, transmembrane segment 24 amino acid และ cytoplasmic tail ประกอบไปด้วย 49 amino acid (Delputte and Nauwynck, 2004)



ภาพ 2 แผนภาพของไวรัส
ที่มา : Dea et al. (2000)

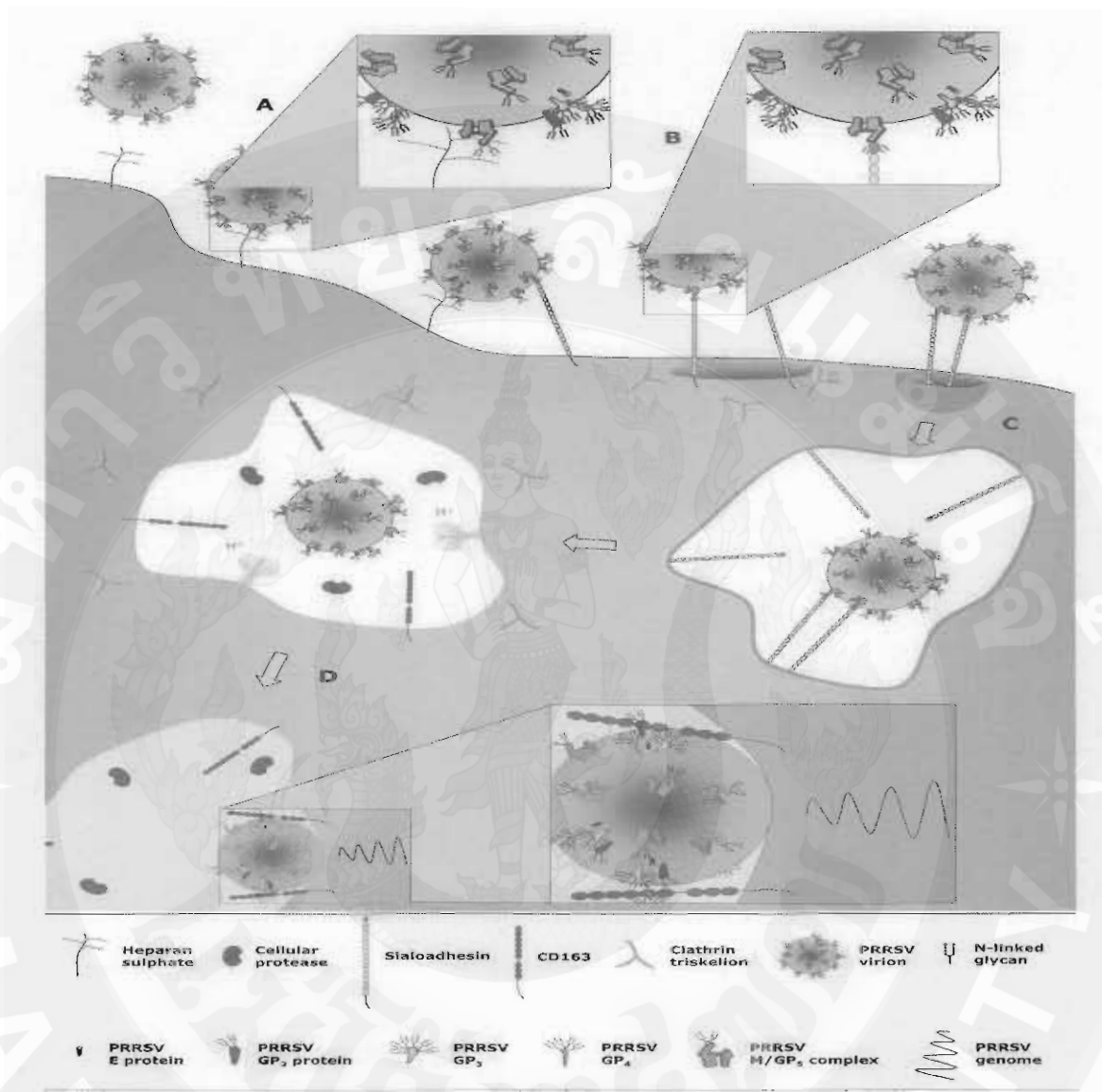


ภาพ 3 Receptor บน PAM ที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ PRRSV
ที่มา : Breedam et al. (2010)

จากภาพ 3 เป็น transmembrane protein ที่มีการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์มาโครฟาจ โดยส่วนแรกจะเป็นส่วนของ heparan sulphate ในผิวเซลล์ของ MARC-145 พบ heparin-like molecules ทำให้เกิดการติด PRRSV แสดงออกอยู่ในส่วนของ O-glycosylated protein ที่เรียกว่า proteoglycans ซึ่ง glycoproteins นี้จะประกอบไปด้วย core protein ที่เกาะอยู่กับ glycosaminoglycan (GAGs) ซึ่งเป็น linear polysaccharide chains ประกอบด้วย disaccharide subunits ของ amino sugar และ hexuronic acid/ galactose จากการศึกษา heparan sulphate GAGs บนผิวของมาโครฟาจมีผลต่อการติดเชื้อของ PRRSV เข้าสู่เซลล์เป็น attachment factor ที่มี virions เป็นจำนวนมากบนผิวเซลล์ ดังนั้นก็จะตามด้วยการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ (Breedam et al., 2010)

Sialoadhesin เป็น macrophage-restricted type 1 transmembrane glycoprotein และอยู่ในแฟมิลี sialic acid binding lectins sialoadhesin เป็นปัจจัยที่มีความจำเพาะต่อมาโครฟาจ (macrophage-specific factor) เป็นตัวที่ไวรัสต้องการในการเกาะติดและปล่อยจีโนมไวรัส จากการศึกษา ก่อนการเกาะติดจะเกิดปฏิกิริยาระหว่าง heparin sulphate และ pSn receptor การรวมตัวของไวรัสนั้นจะรวมตัวเข้าไปที่ pSn receptor และเกิดปฏิกิริยาระหว่าง sialic acid บน PRRS ซึ่งทำให้ติดเชื้อเข้าสู่ PAM (Delpitte and Nauwynck., 2004) ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ด้วย endocytic pathway และมีการปล่อยจีโนมของไวรัสเข้าสู่ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์เป้าหมาย และภายในตัวของไวรัสก็มี endosome ที่สำคัญของการปล่อยจีโนม ซึ่ง CD163 เป็น factor ที่จำเป็นของการปล่อยจีโนมของ PRRSV (Delpitte and Nauwynck., 2004; Breedam et al., 2010)

CD163 เป็น type 1 transmembrane glycoprotein ที่แสดงออกอยู่บนเซลล์ของโมโนไซต์ (monocyte) มาโครฟาจ และ hemoglobin-scavenging CD163 เป็นตัวที่ป้องกันการเกิด free hemoglobin-mediated oxidative damage นอกจากนี้ทำให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ MARC-145 โดย SRCR domains ของ CD163 การแสดงออกของ SRCR 6 และ 2 proline-serine-threonine (PST) rich interdomains ของ CD163 เป็นตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ เมื่อ CD163 รวมกับ GP₂ และ GP₄ จะทำให้เกิดการปล่อยจีโนมของ PRRSV Patton et al. (2009) มีรายงานว่า CD163 เป็น receptor สำหรับการเพิ่มจำนวนของ PRRSV เนื่องจากได้มีการทดลองการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ CD163 เมื่อมีการติดเชื้อของ PRRSV ภายในเซลล์ PAM และมาโครฟาจที่เกิดจาก CD14 positive monocyte derived macrophages (MDMs) ที่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของ PRRSV ด้วยการสร้าง LLC-PK-CD163 cell line ที่มีการแสดงออกของ CD163 CD163 แยกมาจาก total RNA ของ PAM ที่เป็น full length mRNA ที่มี 9 SRCR domains เพื่อใช้ในการศึกษา receptor สำหรับ PRRSV



ภาพ 4 การติดเชื้อ PRRSV เข้าสู่เซลล์มาโครฟาจ

ที่มา : Breedam et al. (2010)

ขั้นตอนในการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์มาโครฟาจ (ภาพ 4)

1. ไวรัสจะติดอยู่กับมาโครฟาจเกิดขึ้นบน heparan sulphate glycosaminoglycan บนผิวเซลล์มาโครฟาจและ sialoadhesin ทำหน้าที่ในการจับกับไวรัส
2. ปฏิกริยานี้เกิดขึ้นที่ช่องไขมันของไวรัส โดยเกิดบน receptor ที่ก่อให้เกิด viral M/GP₂ complex ต่อ N-terminus ของ pSn และ sialic acids บนผิวเซลล์ของ virion

3. การเกาะติดของไวรัสต่อ pSn เป็นไปตาม virus-receptor complex ในกระบวนการของ clathrin-mediated endocytosis และ viral จะถูกปล่อยเข้าสู่ไซโตพลาสซึม

4. CD163 เข้าไปจับกับ GP2 และ GP4 เพื่อเป็นการปล่อยจีโนมของ PRRSV ทำให้ความเป็นกลางมีค่าลดลงภายใน endosome ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญมากต่อการปล่อยจีโนมออกมา (Breedam et al., 2010)

Delputte et al. (2007) ได้ศึกษาพบว่า heparan sulphate เป็น receptor ของ PRRSV บนมาโครฟาจ ที่เป็นสาเหตุในการเกาะติดของไวรัสซึ่งมีหน้าที่สำคัญ pSn เป็น receptor ของ PRRSV มีความสำคัญต่อการปล่อยจีโนมบนมาโครฟาจติดเชื้อเข้าสู่มาโครฟาจ

pSn receptor ประกอบด้วย sialoadhesins N-terminal variable immunoglobulin (Ig)-like domain ซึ่งมีการแสดงออกที่มาโครฟาจ sialic acids จะมีการแสดงออกบน viral glycoprotein ที่มีความสำคัญต่อไวรัสซึ่งทำปฏิกิริยากับ pSn (Delputte et al., 2007)

IFN γ

มาโครฟาจเกิดจากเซลล์โมโนไซต์ที่มีการพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) ในไขกระดูก มาโครฟาจมีความสำคัญมากในการทำหน้าที่ในการตอบสนองภูมิคุ้มกันจากเซลล์ และ antigen presenting cells (APCs) หน้าที่ของมาโครฟาจจะกระตุ้นการส่งสัญญาณในการนำเสนอผิวของเชื้อโรคซึ่งทำให้มีการหลั่งสารจำพวก antimicrobial phagocytic ในการทำหน้าที่ในการทำลายเชื้อโรคนั้น และยังสามารถกระตุ้นการหลั่งของ IFN γ ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบลิมโฟไซต์ชนิดที่การป้องกันการติดเชื้อของไวรัส หน้าที่หลักของไซโตไคน์เป็นการเปลี่ยนแปลงของระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการควบคุมการแสดงออกของโมเลกุลที่สำคัญใน antigen processing รวมทั้งการแสดงออกเช่น transporter of antigenic peptides และ MHC molecules ซึ่งลิมโฟไซต์ชนิดที่จะกระตุ้นการจดจำของ CTL IFN γ จะหลั่งสารต้านไวรัสเมื่อมีการติดเชื้อของสิ่งแปลกปลอม ก่อนหน้านี้นี้มีการศึกษาว่า PRRSV มีความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองของต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบลิมโฟไซต์ชนิดที่ซึ่งสามารถตรวจได้โดยการเพิ่มขึ้นของลิมโฟไซต์ ในการทดลองสามารถบอกได้ว่า PRRSV มีความจำเพาะกับลิมโฟไซต์ ที่มีการหลั่ง IFN γ ในการกระตุ้นในห้องปฏิบัติการ IFN γ ยังสามารถยับยั้งการแบ่งตัวในเซลล์ของตุกร โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ double stranded RNA ที่เหนี่ยวนำ

protein kinase (Murtaugh et al., 2002) และสามารถยับยั้งกระบวนการการเพิ่มจำนวน ของ PRRSV ได้ (Bautista and Molitor, 1999)

IFN γ เป็น glycoprotein ที่มี 2 แฟมิลีคือ type I IFN α/β และ type II IFN γ (Levy and Sastre, 2001) มีโครงสร้างหลัก 2 ส่วน คือส่วนที่เป็น conserved domain และ aminoterminal site ที่ผิวเซลล์ของ receptor (Sharma and Adlakha, 1994) ทำหน้าที่เป็นสารต้านไวรัสโดยปกติใน เซลล์ทั่วไปจะไม่มีการหลั่ง IFN γ แต่เมื่อมีการติดเชื้อจะมีการหลั่ง IFN γ เช่น การติดเชื้อไวรัส ทั้ง ชนิด RNA และ DNA ไวรัส ซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันตัวเองของเซลล์

ผลในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

IFN มีฤทธิ์ในทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น สารต้านไวรัส และ cell multiplication-inhibitory ซึ่งประกอบไปด้วย antitumor, immunomodulation, inhibition ของการสังเคราะห์เซลล์ และการส่งเสริม cytotoxicity เป็นต้น ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อด้วยไวรัสนั้นจะมี IFN มากขึ้น

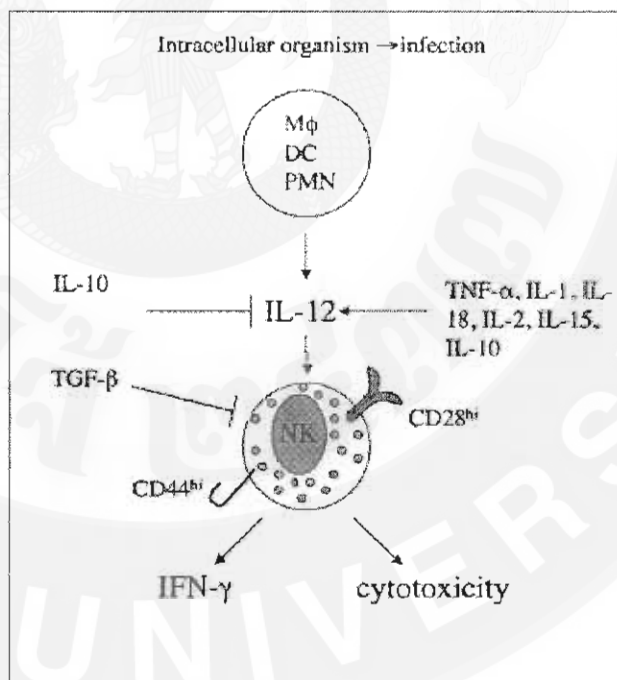
โดย IFN สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัส โดยการยับยั้ง methylation ของ mRNA ไวรัส 5' terminal guanosine 'cap' เป็น unmethylated ในการเปลี่ยน ระดับของ S-adenosylmethionine และ S-adenosylhomocysteine ซึ่งเป็นการยับยั้งการสังเคราะห์ โปรตีนของไวรัส (Sharma and Adlakha, 1994) IFN สามารถดัดแปลง nucleotide metabolism และเหนี่ยวนำให้เกิด cytoplasmic enzymes ซึ่ง cytoplasmic enzyme นั้นสามารถเหนี่ยวนำ 1) protein kinase ที่เป็นส่วนของ phosphorylates a factor ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีน 2) endoribonucle- ase ที่เป็น active against single-stranded RNA และ 3) การสังเคราะห์ oligoadenylic ซึ่งเป็นการเร่ง oligoadenylates ในการยับยั้ง และในการเกิดเป็น polypeptides สายยาว การเติม cytoplasmic enzyme นั้นเป็นการทำให้ acetylglucosaminyl-dolichy phosphates ลดลง ซึ่งจะทำให้ ของไขมันของไวรัสถูกปล่อยออกจากเซลล์ (Prescott and Baggot, 1994)

ผลของสารต้านไวรัส ที่เกิดจาก IFN γ เช่น การสังเคราะห์ OAS ที่เป็นสาเหตุให้ เกิดความเสียหายใน RNA ของไวรัสโดยที่ IFN ไปจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของ receptors อย่างรวดเร็ว IFN ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของแอนติบอดี และมีการนำเสนอเชื้อโรคต่อ MHC class I และ MHC class II (Prescott and Baggot, 1994 ; Choi et al., 2001)

การตอบสนองของ NK cell เมื่อมีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์

การกระตุ้น NK cell ด้วย IL-12 ที่เหนี่ยวนำให้เกิด IFN γ

เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยการติดเชื้อ จะมีการหลั่ง TNF- α ซึ่งจะเป็นการกระตุ้น NK cell ให้มีการผลิต IFN γ ไซโตไคน์ IL-12 จะหลั่งออกมาจากมาโครฟาจ เดนดริตริกเซลล์ (dendritic cells; DCs) และนิวโทรฟิล IL-12 ทำให้มีการหลั่งของไซโตไคน์อีกหลายชนิดเช่น TNF- α , IL-1, IL-18, IL-2, IL-15 และ IL-10 ออกมาเพื่อกระตุ้น NK cell ให้มีการหลั่งของ IFN γ ในการกระตุ้นนี้มีผลในการควบคุมการตอบสนองของผิวเซลล์ เช่น มีการเพิ่มขึ้นของ CD28 CD44 และ cytotoxicity แต่จะมีข้อจำกัดเมื่อเป็นการควบคุมทางลบซึ่งจะมี IL-10 และ Transforming growth factor-beta (TGF- β) เกิดขึ้นในระบบ ซึ่ง IL-10 จะไปยับยั้งไม่ให้เกิด IL-12 TGF- β จะไปยับยั้งไม่ให้ NK cell ทำหน้าที่ได้ ดังภาพ 5 (Lieberman and Hunter, 2002)

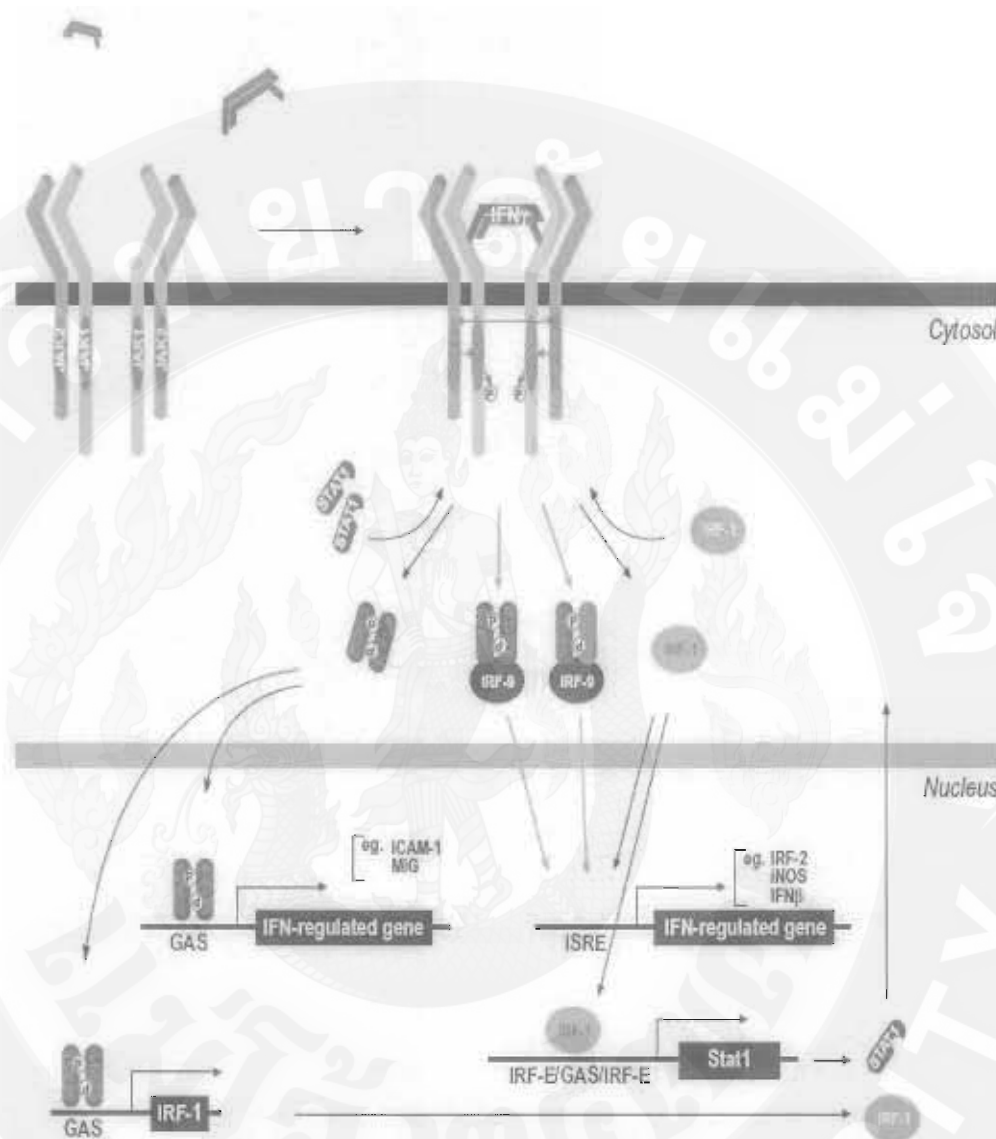


ภาพ 5 การตอบสนองของ NK cell ต่อการติดเชื้อ

ที่มา : Lieberman and Hunter (2002)

Signal transduction

IFN γ receptor (IFNGR)1 และ IFNGR2 เป็น subunits ของ IFNGR ซึ่งได้มีการศึกษาการเกิดขึ้นภายในเซลล์ IFN γ เป็น noncovalent homodimer ที่มีการรวมตัวกันแบบทิศกลับหัว (antiparallel) ใน 2 polypeptides โดยที่จะมีการเหนี่ยวนำ Janus tyrosine kinase (Jak) 2 autophosphorylation และกระตุ้น Jak 1 transphosphorylation ด้วย Jak 2 ซึ่งการกระตุ้น Jak 1 ให้ทำงานได้นั้นจำเป็นต้องมี tyrosines บน IFNGR1 Jak2 อยู่ในรูปที่ยังไม่สามารถทำงานได้ จะอยู่ในรูปที่ทำงานได้ก็ต่อเมื่อมี IFN γ เข้ามาจับ และ Jak2 จะเป็นตัวกระตุ้นให้ Jak1 สามารถทำงานได้ เมื่อ signal transducer and activator of transcription (STAT)1 จับคู่กับ phosphorylated ที่อยู่ใกล้ปลาย C terminus ที่ Y701 ของ IFNGR1 จะเกิด phosphorylation ซึ่งจะช่วยให้แยกจาก STAT1 homodimer จาก receptor ได้ สัญญาณของ IFN γ จะถูกเหนี่ยวนำด้วย STAT1:STAT1:IFN เป็น IFN regulatory factor (IRF)-9 และ STAT1:STAT2:IRF-9 เป็น IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) complexes ซึ่ง STAT1 homodimer จะเข้าสู่นิวเคลียสแล้วรวมกับ promoter IFN γ activation site (GAS) เพื่อทำการเริ่มหรือหยุด การถอดรหัสของยีน IFN γ ซึ่ง transcription factor ของ IFN γ ได้แก่ IRF-1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีน IFN γ และ IFN- β STAT1:STAT1:IRF-9 heterodimers, ISGF3 และ IRF-1 สามารถรวมกับ IFN stimulate response element (ISRE) promoter ที่บริเวณขึ้นเป้าหมายเพื่อควบคุมการถอดรหัส IRF-1 สามารถส่งเสริม STAT1 ผ่าน ISRE site (IRF-E/GAS/IRF-E) (Schroder et al., 2004) (ภาพ 6)



ภาพ 6 IFN γ signal transduction

ที่มา : Schroder et al. (2004)

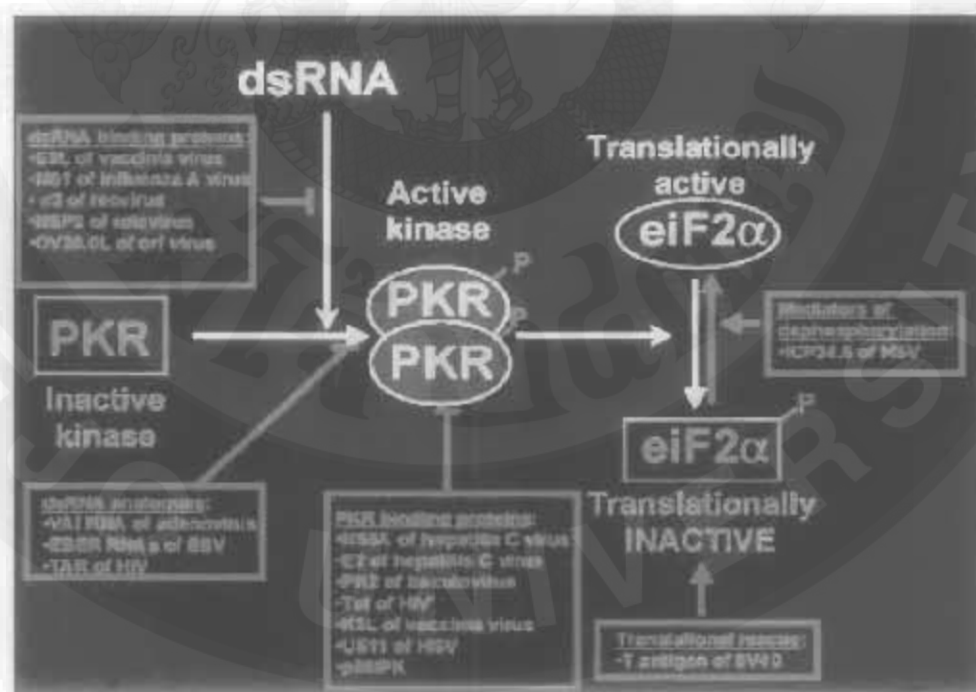
Antiviral pathways ที่เหนี่ยวนำโดย IFN

มีหลายร้อยยีนที่ควบคุมควบคุมโดย IFNs IFN γ แฟมิลีสามารถเหนี่ยวนำยีนได้ และมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากยีนนี้สามารถหลั่งสารต้านไวรัส เช่น PKR และ OAS โปรตีนเหล่านี้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้

PKR

PKR เป็น cellular protein ซึ่งมี amino terminal regulatory domain และ carboxy terminal catalytic domain ควบคุม domain ที่มี double-stranded RNA (dsRNA) ในการทำกิจกรรมการเร่ง domain ให้มีการตอบสนอง serine/threonine kinase ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส เซลล์ยูคาริโอตจะเริ่มการแปลรหัสจาก (translation-initiation factor) eIF-2 α เป็นส่วนหนึ่งที่แสดงถึงสารตั้งต้น (substrates) phosphorylated โดย PKR ดังภาพ 7 phosphorylation of eIF-2 α มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งสามารถกระตุ้น PKR ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนในไวรัส การเพิ่มจำนวนไวรัส

ซึ่งกลไกของการแปลรหัสเป็นโปรตีนสามารถยับยั้งได้โดย PKR ผลผลิตของไวรัสจะถูกควบคุมด้วย PKR pathway เช่น dsRNA binding ซึ่งจะมี p58IPK ที่เป็นตัวยับยั้งอยู่ เซลล์ของ PKR เมื่อมีการติดเชื้อด้วย influenza virus, herpes simplex virus, Epstein-Barr virus, human immunodeficiency virus และ simian virus 40 (Levy and Sastre, 2001)

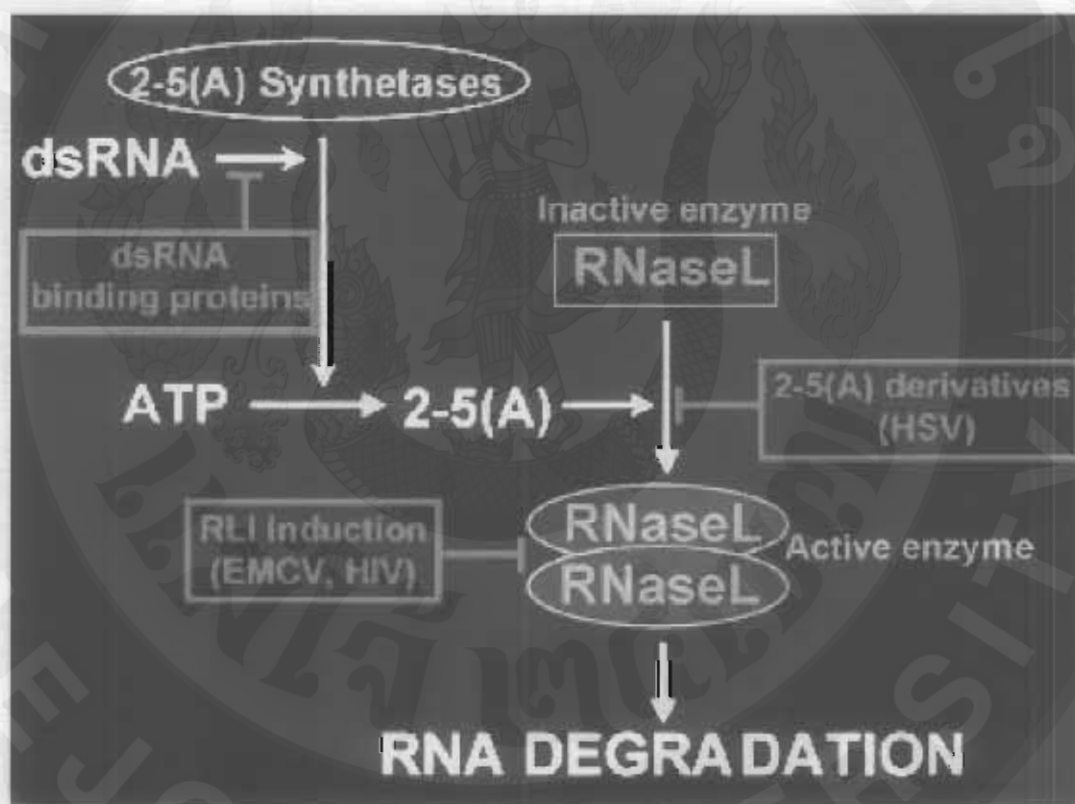


ภาพ 7 PKR pathway

ที่มา : Levy and Sastre (2001)

OAS

IFN เป็นตัวที่เหนี่ยวนำให้เกิด OAS ซึ่งประกอบไปด้วยหลาย isozymes ที่แตกต่างกันด้วยยีนหลายยีน เอนไซม์เหล่านี้จะทำงานคล้าย PKR ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นด้วย dsRNA เมื่อมีการติดเชื้อไวรัส การกระตุ้น OAS ด้วย nucleic acids ที่ผิดปกติรวมอยู่กับ RNaseL ที่ยังไม่ถูกกระตุ้น เมื่อมีการกระตุ้น RNaseL ให้ทำงานสามารถตัดทั้ง mRNA และ rRNA ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เพื่อยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน (Levy and Sastre, 2001) ดังภาพ 8



ภาพ 8 OAS pathway

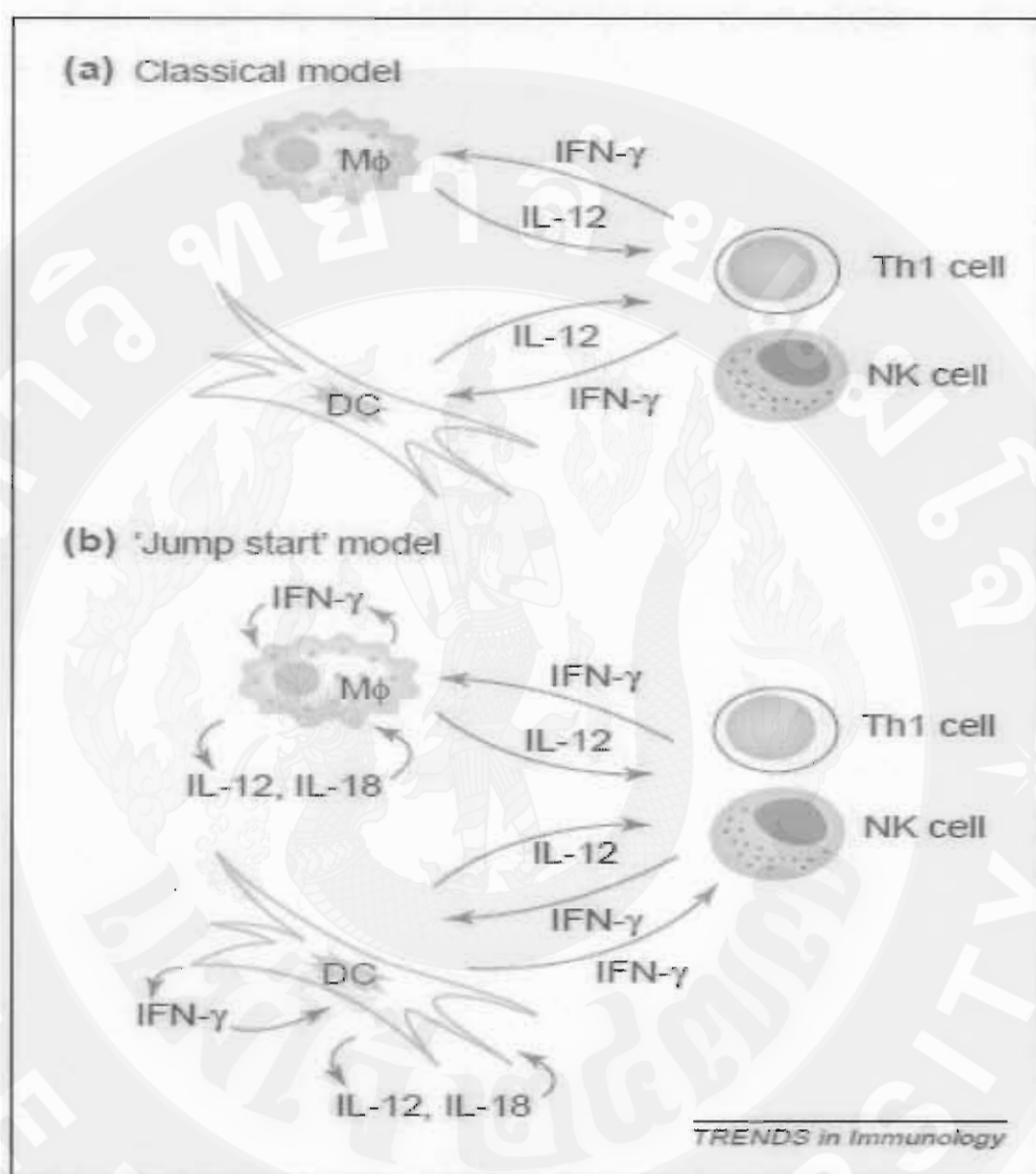
ที่มา : Levy and Sastre (2001)

กลไกการเกิด IFN γ จาก APCs

ปฏิกริยาระหว่าง APCs และลิมโฟไซต์ชนิดที่มีความสำคัญสำหรับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อโรค classical model มีขั้นตอนที่สำคัญในการติดเชื้อภายในเซลล์ก่อนที่จะมีการหลั่ง IFN γ โดย NK cell $CD4^+$ ลิมโฟไซต์ชนิดที่ ซึ่ง IFN γ ส่งเสริมการแสดงออกของ DCs และมาโครฟาจ แล้วยังส่งเสริมการฆ่าเชื้อภายในเซลล์มาโครฟาจ APCs ควบคุมกระบวนการนี้โดย IL-12 ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิด IFN γ โดย NK cell และ $CD4^+$ ลิมโฟไซต์ชนิดที่ซึ่งเกิดความแตกต่างของ IFN γ จาก Th1 ร่วมกับหลาย ๆ ไซโตไคน์ ที่เกิดขึ้นระหว่าง $CD4^+$ ลิมโฟไซต์ชนิดที่และ APCs ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ (ภาพ 9)

Classical model เป็นการกระตุ้นมาโครฟาจและ DCs เหนี่ยวนำให้เกิด IL-12 และ IL-12 จะกระตุ้น NK cell และ Th1 ให้มีการผลิต IFN γ ที่มากขึ้น พร้อมทั้งจะกลับไปกระตุ้นมาโครฟาจและ DCs ให้มีการนำเสนอเชื้อโรคเพิ่มมากขึ้นและฆ่าเชื้อภายในเซลล์

Jump start model IL-12 ที่สร้างมาจากมาโครฟาจและ DCs สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง IFN γ ขณะที่มีการนำเสนอเชื้อโรค ซึ่งเป็นผลผลิตจาก NK cell ขบวนการใน APCs สามารถทำหน้าที่ได้ก่อนการติดเชื้อโดยการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคก่อนที่จะเป็นการป้องกันด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะโดย Th1 (Frucht et al., 2001)



ภาพ 9 ปฏิกริยาระหว่าง APCs และ ลิมโฟไซต์ชนิดที่

ที่มา : Frucht et al. (2001)

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วต่าง ๆ
2. กระบอกตวง (cylinder)
3. บีกเกอร์ (beaker)
4. หลอดไมโครทิวป์ (microtube)
5. ขวดรูปชมพู่ (flask)
6. ขวด Duran
7. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette)
10. ทิป

เครื่องมือ

1. ตู้บ่ม (Hot air oven: Hot air oven: BINDER, model ED115(E2), Norway)
2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave: Autoclave: Astell Scientific, model ASB260, England)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (ปั่นเหวี่ยง: MSE, Germany)
4. ตู้บ่มเพาะเซลล์ (Incubator CO₂ 5%: Forma Scientific, USA)
5. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator 37 องศาเซลเซียส: Gallenkamp Scientific, USA)
6. ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina air flow cabinet class II : Microtech, UK)
7. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker: Ratek, Australia)
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter: Metrohm, Thailand)

9. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath: Julabo, model TW 20, USA)
10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance: METTLER-TOLEDO, model PG802-S, Switzerland)
11. เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กและเตาให้ความร้อน (Magnetic stirrer and hot plate: JENWAY, model 1000, UK)
12. เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Gel electrophoresis: Gel mate 2000, model GPE-103, Japan)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine: MJ research, model PTC 1196 HB, USA)
14. เครื่องวัดปริมาณโปรตีน (Microplate reader: BIO-RAD, model 680XR, USA)
15. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
16. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Chest-type Ult Freezer: Sanyo, Japan)
17. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
18. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Sanyo Harrier 18/80, Japan)
19. เครื่อง Vortex GENIE-2 (Scientific industry, USA)
20. ไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)

สารเคมี

1. Agar powder (Union science)
2. Agarose (Research organic, USA)
3. Ampicillin (Fluka, Switzerland)
4. Ethanol (Merck, Germany)
5. Glycerol (Merck, Germany)
6. Isopropanol (Fisher, UK)
7. Beta-mercaptoethanol (Bio basic, Canada)
8. Yeast extract (Merck, Germany)
9. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA: J.T. Baker, USA)
10. Phosphate buffer saline (PBS)

11. Histopaque (Steinheim, Germany)
12. Nanofectamin (PAA, Canada)
13. Trizol (Invitrogen, USA)
14. Sodium hydroxide (NaOH: Merck, Germany)
15. Hydrochloric acid (HCl: Merck, Germany)
16. Sodium chloride (NaCl: Merck, Germany)
17. Sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4 : Merck, Germany)
18. Potassium phosphate, monobasic (KH_2PO_4 : VWR international, England)
19. Potassium chloride (KCL: Merck, Germany)
20. Ammonium chloride (NH_4Cl : Merck, Germany)
21. Sodium bicarbonate (NaHCO_3 : Merck, Germany)
22. Phorbol 12-myristate 13-acetate/ionomycin (PMA/I; Calbiochem, Germany)
23. Beef extract (Merck, Germany)
24. Peptone (Merck, Germany)
25. Tryptone (Merck, Germany)
26. Tris (Sigma, USA)
27. TBE (Thermo Scientific, USA)
28. Dimethyl sulfoxide (DMSO: Sigma, USA)
29. Fetal bovine serum (PAA, Canada)

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin: Fluka, Switzerland)
2. สารปฏิชีวนะจีเน็ตซิน (geneticin: Invitrogen, USA)
3. Antibiotic/antimycotic (PAA, Canada)

ชุดสำเร็จรูป

1. pcDNA[™]3.1 Directional TOPO[®] expression kit (Invitrogen, USA)

2. Nucleospin[®] RNA II Purification kit (Machery Nagel, Germany)
3. Endofree[®] Plasmid maxi kit (Qiagen, USA)
4. EZ-10 spin column Plasmid DNA kit (Bio basic, Canada)
5. Porcine IFNg ELISA kit (R&D Systems, USA)
6. Reverse aid First strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA)
7. Superscrip III one step RT-PCR with platinum taq (Invitrogen, USA)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Markers)

1. GeneRuler[™] 1kb DNA ladder (Fermentas, USA)
2. GeneRuler[™] 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA)

เอนไซม์

1. *Bam*HI (Fermentas, USA)
2. *Pst*II (Fermentas, USA)
3. Hotstart *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA)
4. Vent[®]_R DNA polymerase (New England Biolabs, USA)

ไพรเมอร์

- (F)1_clone (5'- CAC C AT GGG TTA TAC AAC TAA TTT-3')
- (R)1_clone (5'- TTA TTT TGA TGC TCT CTG GCC-3')
- (F)2_one step (5'- TCT TAC TGC CAG GCG CCC TT-3')
- (R)2_one step (5'- TGA TGC TCT CTG GCC TTG GAA CA-3')
- (F)3_T7 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3')
- (R)3_BGH (5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3')

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และแบคทีเรีย

1. Minimum Essential Media (MEM; Gibco, USA)
2. Luria-Bertani agar
3. RPMI-1640 (Gibco, USA)

เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, USA)

เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

MARC-145 ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

pcDNA[™] 3.1 Directional TOPO[®] expression kit (Invitrogen, USA)

วิธีการทดลอง

การแยกและการกระตุ้น peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

การปั่นแยก PBMC

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรจากโรงเชือดสุกรเบทาโกร โดยเก็บเลือดจากบริเวณคอ เก็บเลือดที่เจาะได้ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดโดยใช้เลือด 40 มิลลิลิตร ในสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด anti-coagulant ซึ่งประกอบด้วย EDTA ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วย PBS 10 มิลลิลิตร ในเลือด 10 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน ใส่ใน Histopaque (Steinheim, Germany) นำไปปั่นเหวี่ยง (Mse, UK) ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เกิดการแยกชั้นของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว เก็บบริเวณที่เป็นเม็ดเลือดขาวที่มี PBMC ใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม PBS ให้ครบ 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วเติม RBC lysis buffer 25 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 2-3 นาที และเติม PBS 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วเติม RPMI-1640 ที่มี fetal bovine serum 5% รวมอยู่ด้วย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในหลุมเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (Nunc) ที่ปรับปริมาณเซลล์ 5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสที่มี CO₂ 5% (Forma Scientific, USA) นาน 24 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วยสาร phorbol 12-myristate 13-acetate/ionomycin (PMA/I; Calbiochem, Germany) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

เซลล์ยูคาริโอต

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือเซลล์มะเร็งไคดิง (MARC-145 ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เนื่องจาก PRRSV สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ชนิดนี้ได้ (Kim et al., 1993) เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Minimum Essential Media (MEM) ที่มี fetal bovine serum ปริมาณ 5-10% ในสภาวะที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การสกัด total RNA จาก PBMC

นำเซลล์ที่เลี้ยงใน 96 หลุมที่ถูกกระตุ้น PMA/I แล้วมาล้างเซลล์ด้วย PBS ที่มี 5mM EDTA ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 300xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส เติม PBS 200 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการล้างเซลล์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 300xg เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นสกัดด้วยชุดสำเร็จรูป nucleospin RNA II (Machery Nagel, Germany)

การเตรียมชิ้นยีน IFNg

นำ total RNA ที่สกัดได้จาก PBMC ที่ถูกกระตุ้นมาสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยชุดสำเร็จรูป reverse aid first strand cDNA synthesis kit (fermentas) โดยใช้ total RNA, random primer และ oligo dT บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติม 5x reaction buffer, RNase inhibitor และ dNTP mix บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติม reverse transcriptase แล้วใช้ลำดับปฏิกิริยาดังนี้ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

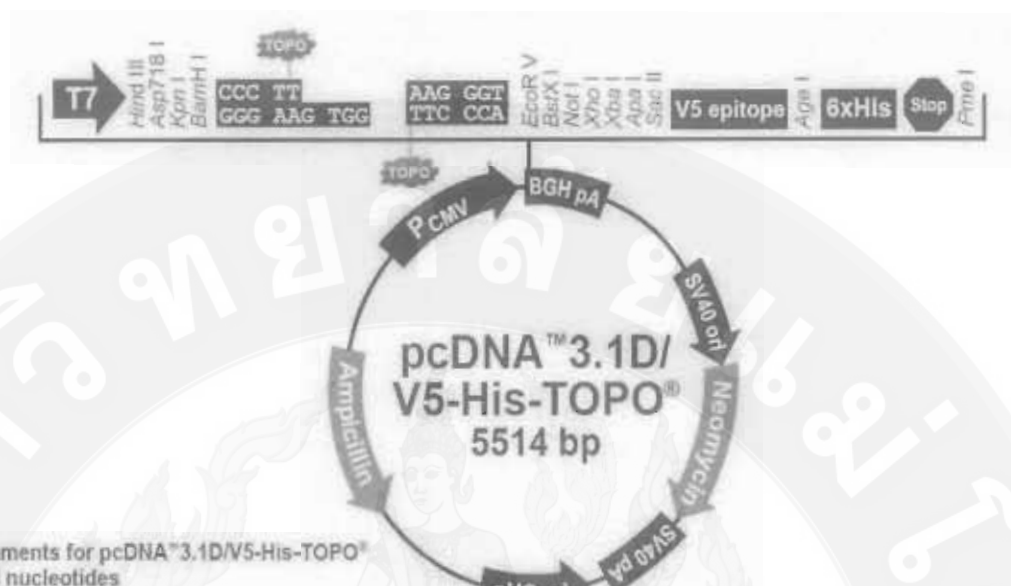
นำ cDNA สายแรกที่ได้มาเพิ่มจำนวน ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ IFNg ของสุกรที่ออกแบบจากยีน IFNg ของสุกรที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (NM_213948) ดังภาพ 10 ได้แก่ Forward primer 1_clone (5'-CACCATGGGTATACAACTTATTT -3') และ Reverse primer 1_clone (5'-TTATTTTGATGC TCTCTGGCC-3') ซึ่งลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้เป็น start codon และ stop codon ด้วยเอนไซม์ Vent[®] DNA polymerase (New England Biolabs, USA) มีลำดับปฏิกิริยาดังนี้ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้น 33 รอบของ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สุดท้ายเป็น 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที



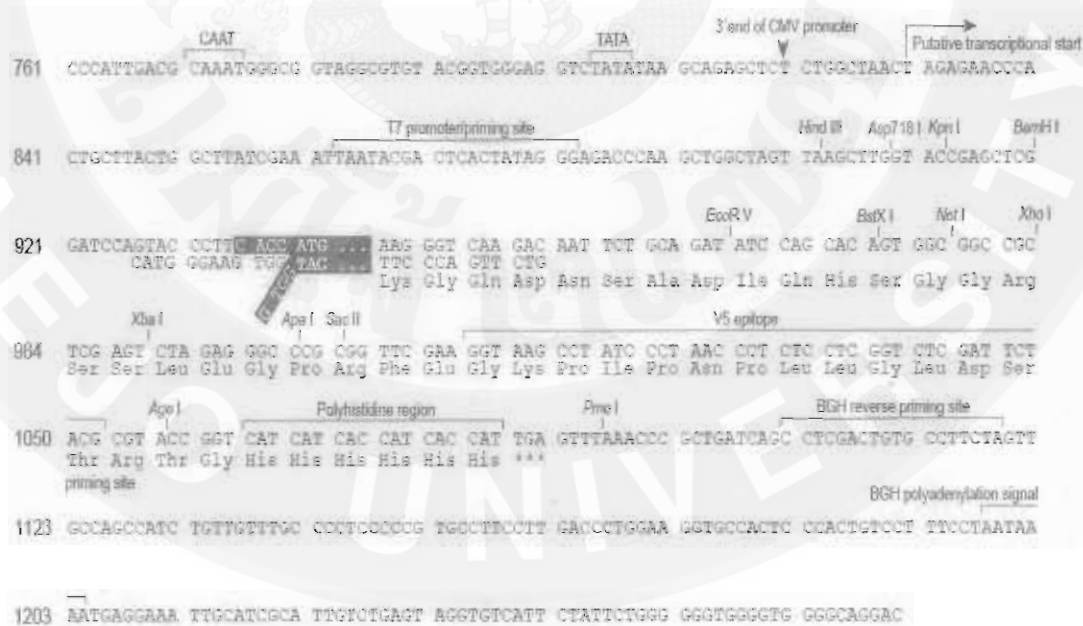
ภาพ 10 การออกแบบไพรเมอร์จากยีน IFN γ (NM_213948)

การโคลนยีน IFN γ เข้าสู่เวกเตอร์ pcDNATM 3.1D/V5-His-TOPO[®]

ยีนยีน IFN γ ที่ได้จะนำมาโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pcDNATM 3.1 (Invitrogen, USA) ดังภาพ 11 บริเวณของ kozak sequence ดังภาพ 12 และนำเข้าสู่ (transformation) เซลล์ One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, USA) มีขั้นตอนดังนี้ ปฏิกริยาของ TOPO cloning ประกอบด้วย Fresh PCR product 0.5 ไมโครลิตร Salt solution 1 ไมโครลิตร Sterile water 3 ไมโครลิตร และ pcDNATM 3.1 1 ไมโครลิตร (cloning reaction) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที วางบนน้ำแข็ง นำ cloning reaction เข้าสู่ *E. coli* บ่มบนน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้น Heat-shock cell ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที วางบนน้ำแข็งทันที เติมน้ำ S.O.C medium 250 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว นำไปเขย่า 200 รอบต่อวินาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไป spread plate 100 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร บน LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เลือกลโคไณท์ที่เจริญบน LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 15-18 ชั่วโมง นำไปเลี้ยงใน LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง รวบรวมสัปดาห์ถัดมา



ภาพ 11 แผนที่เวกเตอร์ pcDNA™3.1



ภาพ 12 บริเวณ kozak sequence

การตรวจสอบความถูกต้องในการโคลนยีน

สกัดพลาสมิดจาก *E. coli* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการหาลำดับนิวคลีโอ

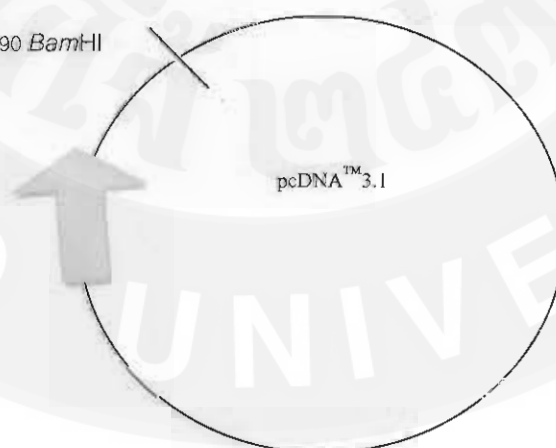
ไทด์

เติมเชื้อลงไป 1.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดเล็กนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทั้งส่วนใสแล้วสกัดด้วยชุดสำเร็จรูป EZ-10 spin column plasmid DNA kit (Bio basic, Canada)

การตัดด้วย *Bam*HI, *Pst*I

*Bam*HI เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่บริเวณของพลาสมิดเวกเตอร์เพียงตำแหน่งเดียว และไม่สามารถตัดในยีน IFN γ ได้ เพราะฉะนั้นขนาดที่ถูกต้องจึงเป็น 6,000 คู่เบส ดังภาพ 13 โดยมีปฏิกิริยาดังนี้ นำพลาสมิด IFN γ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ซึ่งในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย พลาสมิด pIFN γ 2 ไมโครลิตร 10x buffer *Bam*HI 2 ไมโครลิตร *Bam*HI (10 u/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ Nuclease free water 15 ไมโครลิตร โดยบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

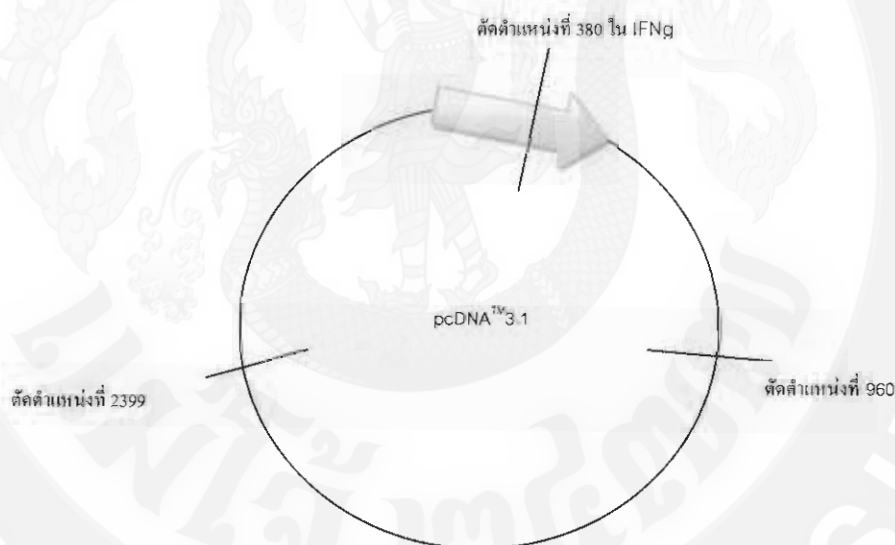
ตำแหน่งที่ 990 *Bam*HI



ตัดด้วย *Bam*HI

ภาพ 13 การเข้าเชื่อมกันของยีน IFN γ ขนาด 500 คู่เบส ในพลาสมิดเวกเตอร์ pcDNATM 3.1 ตรวจสอบความถูกต้องด้วย *Bam*HI

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I เป็นเอนไซม์ที่ตัดในพลาสมิดเวกเตอร์ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 960 และ 2,399 ซึ่งจะตัดขึ้น IFNg ที่ตำแหน่ง 380 เพราะฉะนั้นขนาดที่ถูกต้องจึงเป็น 146 คู่เบส 1,439 คู่เบส และ 4,434 คู่เบส แต่ถ้าวการโคลนเข้าใน One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* นั้นผิดทิศทาง ขนาดที่ได้จะเป็น 409 คู่เบส 1,439 คู่เบส และ 4,171 คู่เบส ดังภาพ 14 โดยมีปฏิกิริยาดังนี้ นำพลาสมิด pIFNg มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ซึ่งในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย พลาสมิด pIFNg 2 ไมโครลิตร 10x buffer O 2 ไมโครลิตร *Pst*I (10 u/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ Nuclease free water 15 ไมโครลิตร โดยบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



ก) เข้าถูกทิศ



ภาพ 14 การเข้าเชื่อมกันของยีน IFNg ขนาด 500 คู่เบส ในพลาสมิดเวกเตอร์ pcDNA™ 3.1

ตรวจสอบความถูกต้องของทิศทางการโคลนด้วย *Pst*I

ก) พลาสมิด pIFNg เข้าแทรกถูกทิศทาง

ข) พลาสมิด pIFNg เข้าแทรกผิดทิศทาง

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

คัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะมีพลาสมิด pIFNg ที่เจริญบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นมาสกัดพลาสมิดเพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย forward primer F3_T7 (5'-TAATACGAC TCACTATAGGG-3') และ reverse primer R3_BGH (5'-TAGAA GGCACAGTCGAGG-3') โดยส่งบริษัท 1st base จำกัด

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megablast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) บนฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.gov/>)

เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม clustal X และสร้างรูปในโปรแกรม GeneDoc

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Bioedit ด้วยการแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนแล้วเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างข้อมูลในฐานข้อมูลของ Genbank กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ IFN γ

นำพลาสมิด pIFN γ กำจัด endotoxin

เลือกโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และลงเชื้อในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช้าเป็นเวลา 8 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส เก็บหัวเชื้อ 100-200 ไมโครลิตร ใส่ใน อาหารเหลว LB 100 มิลลิลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช้าเป็นเวลา 16 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสกัดด้วย EndoFree[®] plasmid isolation kit (Qiagen)

นำพลาสมิด pIFN γ มาถ่าย (transfected) เข้าสู่เซลล์ MARC-145

ควรเตรียมเซลล์ให้มีความหนาแน่นของเซลล์ที่ 30-60 % ด้วยการ subculture cell ของเซลล์ MARC-145 เลี้ยงนาน 16-18 ชั่วโมง (300,000 เซลล์/มิลลิลิตร) ที่อยู่ในช่วง exponential phase เลี้ยงในสภาวะที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเตรียมปฏิกิริยาโดย สารละลาย 1 : nanofectamine (PAA, Canada) 3 ไมโครลิตร ในอาหารที่ไม่มีซีรัม 50 ไมโครลิตร สารละลาย 2 : DNA 1 ไมโครกรัม ในอาหารที่ไม่มีซีรัม 50 ไมโครลิตร นำ สารละลาย 1 และสารละลาย 2 ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ 20 นาที เพื่อให้เกิดเป็น DNA:lipid complex เติมสารละลายที่บรรจุด้วย DNA:lipid complex เข้าไปในเซลล์ MARC-145 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ 30-60 % และเติมอาหารที่ไม่มีซีรัมอีก 400 ไมโครลิตร เลี้ยงในสภาวะที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารที่มีซีรัม เข้าไปอีก 500 ไมโครลิตร เลี้ยงในสภาวะที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง เก็บอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่ถูกถ่ายด้วย pIFN γ ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบโปรตีน IFN γ ต่อไป

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA และระดับโปรตีน

นำเซลล์ที่ได้จากการถูกถ่ายด้วย pIFNg ไปสกัด total RNA ด้วยสาร trizol (Invitrogen, USA) จากนั้นนำศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Superscrip III one-step RT-PCR with platinum taq (Invitrogen, USA) ด้วย primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน IFNg ได้แก่ Forward primer 2_one step (5'-TCTTACTGC CAGGCG CCC TT-3') และ Reverse primer 2_one step (5'-TGATGCTCTCTGGCCTTGGAACA-3')

การสกัด RNA ของ MARC-145 ด้วย Trizol (invitrogen)

ย้ายเซลล์ใส่ในหลอด RNase free ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม Chloroform 50 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด RNase free ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Isopropyl alcohol 125 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol 250 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งระเหยให้ตะกอน RNA แห้ง เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนด้วย RNase free water 30 ไมโครลิตร

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Superscrip III one-step RT-PCR with platinum taq (Invitrogen) ซึ่งในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย RNA 5 ไมโครลิตร 2x reaction mix 25 ไมโครลิตร super Script III RT 2 ไมโครลิตร Forward primer 2_one step (5'-TCTTACTGC CAGGCG CCC TT-3') และ Reverse primer 2_one step (5'-TGATGCTCTCT GGCCTTG GAACA-3') 3 ไมโครลิตร RNase inhibitor (30 units/ไมโครลิตร ; Qiagen, USA) 0.3 ไมโครลิตรและ RNase-free H₂O 11.7 ไมโครลิตร สภาวะของ PCR ที่ใช้คือ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (RT step) จากนั้นเข้าสู่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (Denature) 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที (Annealing)

และ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (Extension) โดยทำซ้ำจำนวน 40 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

การตรวจสอบการแสดงผลของยีนในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค ELISA

ตรวจสอบโดยใช้ porcine IFN γ ELISA kit (R&D Systems, USA) ที่ก้นหลุมจะเคลือบด้วย mouse monoclonal antibody specific for porcine IFN γ ใส่ตัวอย่าง ใช้แอนติบอดีตัวที่ 1 biotinylated polyclonal antibody specific for porcine IFN γ ในการจับโปรตีน IFN γ ใช้แอนติบอดีตัวที่ 2 streptavidin conjugated to HRP จับกับแอนติบอดีตัวที่ 1 ใส่ substrate ดูการเกิดสี

การลดลงของไวรัส

50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) เป็นความเจือจางของสารละลายไวรัสที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงติดเชื้อได้ 50% โดยการเพิ่มจำนวนไวรัส PRRSV ในเซลล์ MARC-145 ที่ปกติ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วย pcDNATM 3.1 และ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วย pIFN γ นาน 4 วัน และนำไปแช่ที่ -80 องศาเซลเซียส ทำการละลาย (freeze-thaw) 2 ครั้งเพื่อให้เซลล์แตก หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 1000 xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนใสที่ -80 องศาเซลเซียส (ส่วนใสที่ได้คือ PRRSV)

เลี้ยง MARC-145 ใน 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนใส่ PRRSV นำตัวอย่างของไวรัสจากเซลล์ปกติ เซลล์ที่ถูกถ่ายด้วย pcDNA 3.1 และ จากเซลล์ที่ถูกถ่ายด้วย pIFN γ ทำ 10-fold serially dilution แล้วเติมลงไปหลุม 100 ไมโครลิตร เลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 วัน หลังจากใส่ PRRSV 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) คำนวณด้วยวิธีของ Reed and Muench (รุ่งโรจน์, 2548)

สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2. ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

26 มิถุนายน 2552 - 6 ตุลาคม 2554



บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการวิจัย

การทดลองนี้ต้องการให้ยีน IFN γ มีการแสดงออกในเซลล์โปรคาริโอตและเซลล์ยูคาริโอต ภายในเวกเตอร์เดียวกัน จึงต้องมีโปรโมเตอร์ 2 ชนิดในเวกเตอร์เดียว และมียีนต้านยาปฏิชีวนะช่วยในการคัดเลือก 2 ยีน ซึ่งประกอบไปด้วยการควบคุมของโปรโมเตอร์ T7 เพื่อให้มีการแสดงออกในเซลล์ *E. coli* ซึ่งยีนต้านยาปฏิชีวนะในการคัดเลือกคือแอมพิซิลลิน (ampicillin resistance) การควบคุมของโปรโมเตอร์ CMV เพื่อให้มีการแสดงออกในเซลล์ ยูคาริโอต (MARC-145) ซึ่งมียีนต้านยาปฏิชีวนะในการคัดเลือกคือนีโอไมซิน (neomycin resistance) จึงทำให้การโคลนเข้าไปยังพลาสมิดเวกเตอร์ pcDNATM3.1 ใช้สำหรับเข้าสู่ *E. coli* เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดได้ และใช้สำหรับการถ่ายเข้าสู่เซลล์ MARC-145 เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนได้

การแยกยีน IFN γ

การเตรียม PBMC

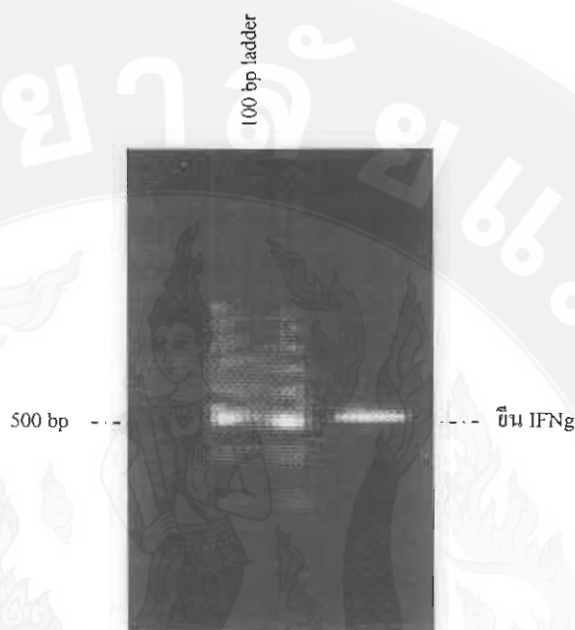
เมื่อนำเลือดสุกรมานั่นเหวี่ยง จนแยกเป็นชั้นของเซลล์ PBMC ดังภาพ 15 ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะนำมาเลี้ยงในสภาวะที่มี CO₂ ปริมาณ 5% และกระตุ้นด้วยสาร PMA/I เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน IFN γ



ภาพ 15 ชั้นของ PBMC ที่สกัดจากเลือดสุกร

การเตรียมชิ้นชิ้น IFNg

จากการเพิ่มจำนวนของ cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เอนไซม์ Vent_R[®] DNA polymerase (New England Biolabs, USA) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ IFNg ของสุกร ไพรเมอร์ F1 และ R1 พบว่าได้ผลผลิตขนาด 500 คู่เบส ดังภาพ 16 ซึ่งเป็นไปตามคาดหมาย (ดังภาพ 10) และนำมาหาความเข้มข้น ด้วยเทคนิคอะโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 เทียบกับ DNA มาตรฐาน ได้ cDNA ที่มีความเข้มข้น 17.35 นาโนกรัม/ไมโครลิตร



ภาพ 16 ผลการทำ RT-PCR ของยีน IFN γ จาก PBMC

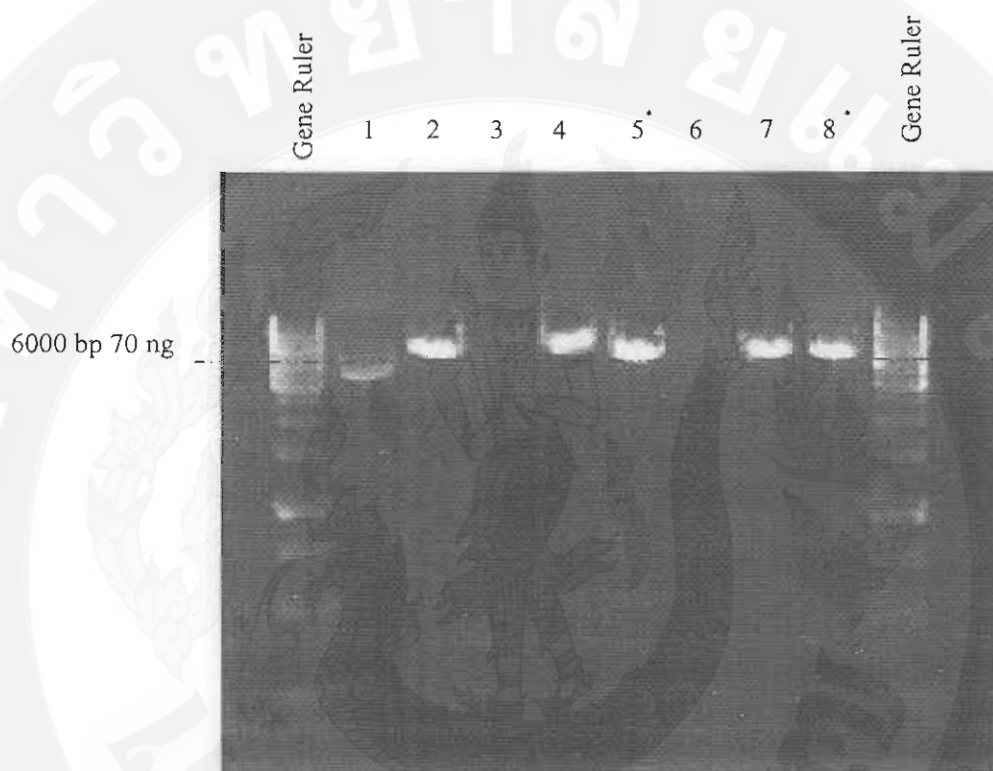
การโคลนยีน IFN γ เข้าสู่เวกเตอร์ pcDNATM 3.1

ยีน IFN γ ที่ได้จากเทคนิค PCR จะโคลนเข้าสู่พลาสมิด pcDNATM 3.1 ได้เป็นพลาสมิด pIFN γ และนำเข้าสู่ *E. coli* ด้วยวิธีการ chemical transformation ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ T7 แล้วคัดเลือกโคโลนีด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด EZ-10 spin column plasmid DNA kit (Bio basic, Canada) จากนั้นทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดตามแผนที่พลาสมิด

การตัดด้วย *Bam*HI, *Pst*I

ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดในพลาสมิดเวกเตอร์ 1 ตำแหน่งที่ 990 และไม่สามารถตัดในยีน IFN γ โดยการเปรียบเทียบขนาดที่ได้ ซึ่ง พลาสมิด pIFN γ จะต้องมียาวกว่าพลาสมิดเวกเตอร์ที่ไม่ได้รับยีน IFN γ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค

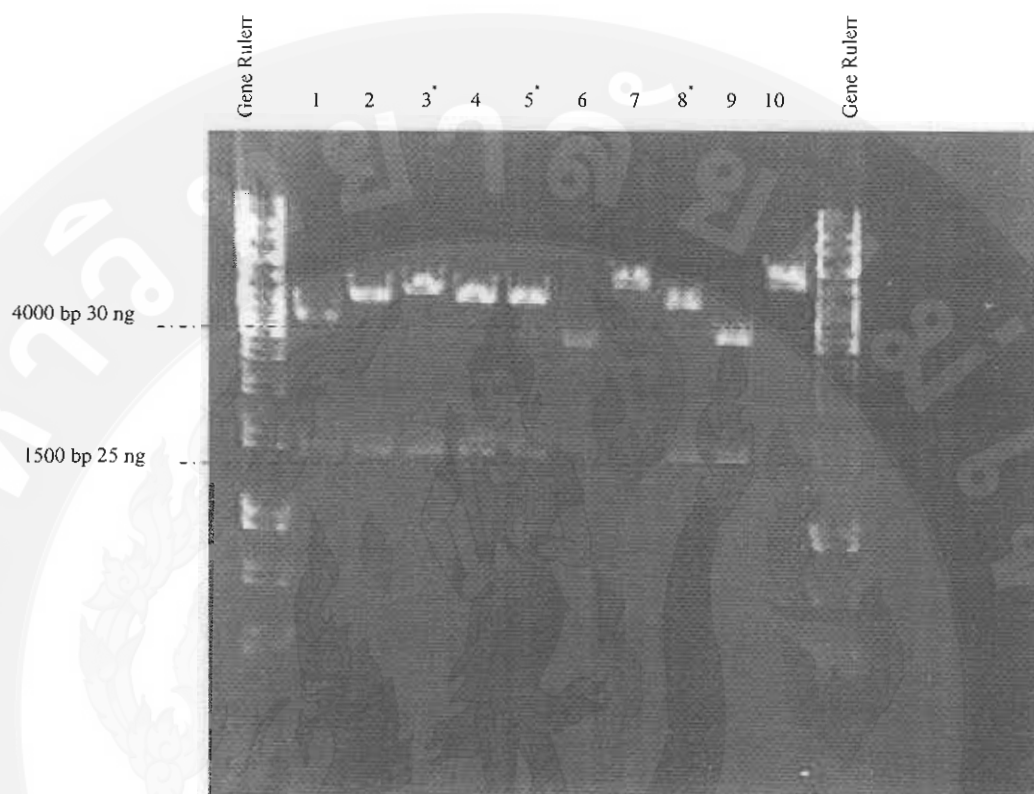
อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลเข้มข้น 1% พบว่า พลาสมิดที่ได้ทั้ง 8 โคลนีนี้นั้นมีขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งขนาดที่ถูกต้อง คือ 6000 คู่เบส ได้แก่โคลนที่ 2 4 5 และ 8 (ภาพ 17)



ภาพ 17 การคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่คาดว่าได้รับขึ้น IFN γ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

หมายเหตุ: Gene Ruler™ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Gene Ruler™ DNA Ladder, 1-8 คือ โคลนของ *E. coli* ที่มี พลาสมิด pIFN γ , * คือ โคลนที่เลือก

เอนไซม์ *Pst*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดในพลาสมิดเวกเตอร์ 2 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ 960 และ 2,399 และจะตัดขึ้น IFN γ ที่ตำแหน่ง 380 เพราะฉะนั้นขนาดที่ถูกต้องจึงเป็น 146 คู่เบส 1,439 คู่เบส และ 4,434 คู่เบส แต่ถ้าการนำเข้าสู่ *E. coli* นั้นผิดพลาดทาง ขนาดที่ได้จะเป็น 409 คู่เบส 1,439 คู่เบส และ 4,171 คู่เบส

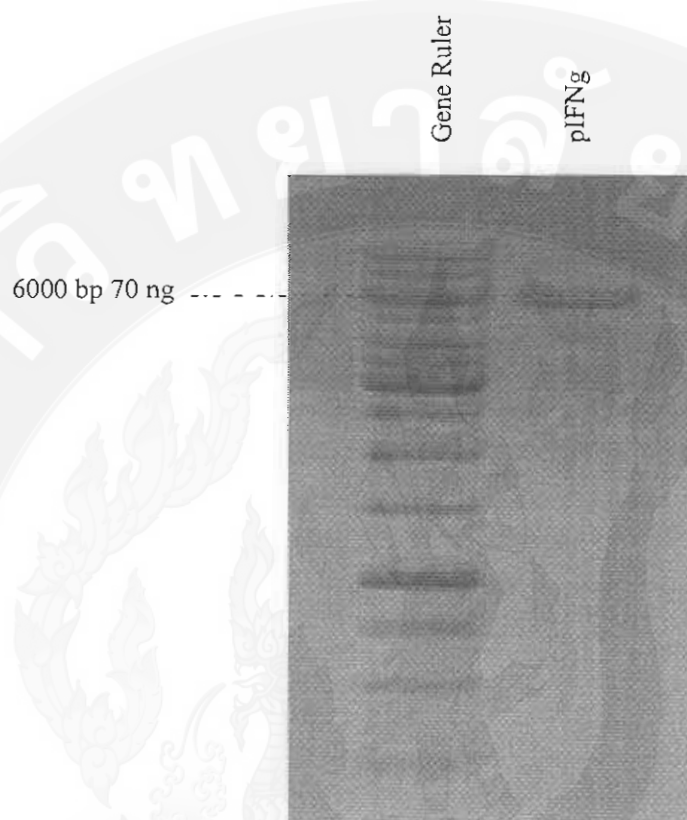


ภาพ 18 พลาสมิดเวกเตอร์ที่คาดว่าจะได้รับยีน IFN γ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I

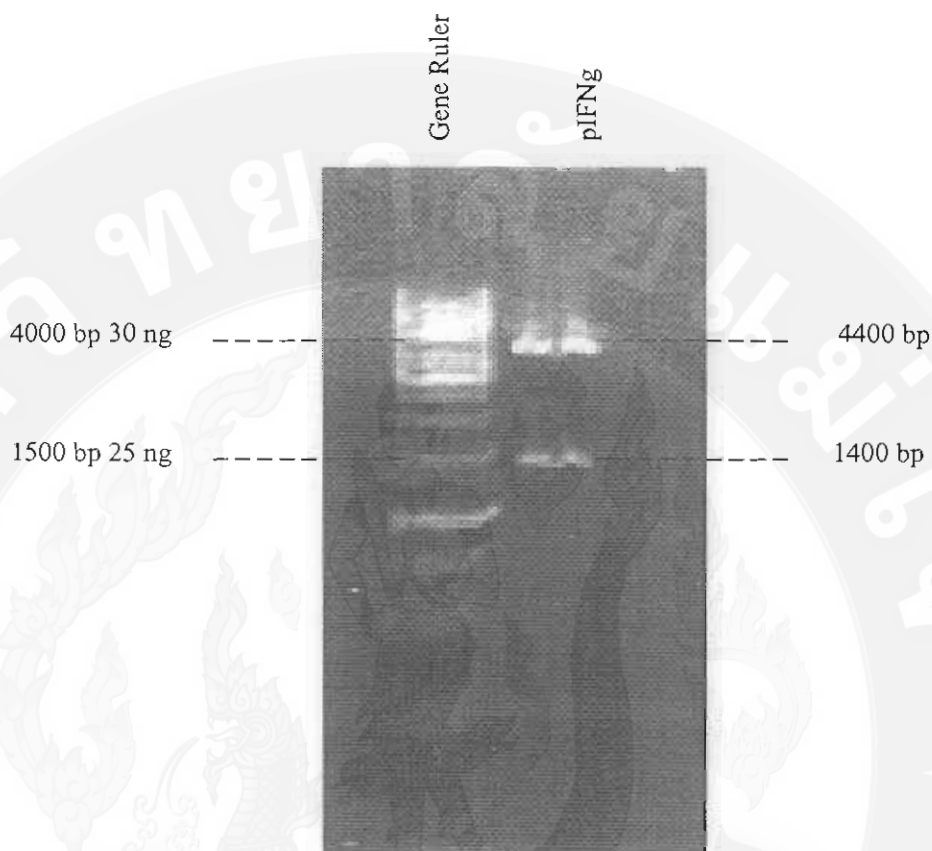
หมายเหตุ: Gene Ruler™ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Gene Ruler™ DNA Ladder, 1-10 คือ โคลนีนของ *E.col* ที่นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I, * คือ โคลนีนที่เลือก

จากการตรวจสอบพลาสมิดเวกเตอร์ที่ตัดด้วย *Pst*I พบว่ามี 3 โคลนีนที่ได้คาดว่าจะได้รับยีน IFN γ ที่คัดเลือกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลเข้มข้น 1% พบว่าโคลนที่ 3, 5 และ 8 มีขนาด 1,439 คู่เบส และ 4,434 คู่เบส ดังที่คาดไว้ ซึ่งเป็นการโคลนที่ถูกทิศทาง

หลังจากที่มีการคัดเลือกโคลนีนที่คาดว่าจะมียีน IFN γ ได้นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Pst*I อีกครั้งเพื่อเป็นการตรวจสอบความถูกต้อง (ภาพ 19 และภาพ 20) และแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลเข้มข้น 1%



ภาพ 19 การตรวจสอบความถูกต้องจากการคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่คาดว่าได้รับยีน IFN γ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI



ภาพ 20 การตรวจสอบความถูกต้องจากการคัดลอกโคลนนิ่งของ *E. coli* ที่คาดว่าได้รับยีน IFN γ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I

และนำไปหาลำดับเบสได้ดังภาพ 21 ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับยีน IFN γ ที่รายงานไว้ (NM_213948) ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ 99% เกิดการแทนที่ของเบส A เป็น G ที่ตำแหน่ง 4 และ 438 ในตำแหน่งที่ 438 ไม่มีผลต่อลำดับกรดอะมิโน ตำแหน่ง 4 มีการแทนที่จากเบส A เป็น G ทำให้เกิดกรดอะมิโนที่เปลี่ยนจาก serine (ภาพ 22) เป็น glycine (ภาพ 23) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ neutral mutation แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน เนื่องจากเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกันและมีสารตั้งต้นในการสร้างเดียวกันคือ 3-phosphoglycerol เหมือนกัน และ เป็นกรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกัน (มีขั้วไม่มีประจุ หมู่ R มีอิเล็กตรอน ให้สารอื่นได้ แต่ไม่สามารถแตกตัวเป็นประจุได้)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีนที่แยกได้นั้นเป็นยีน IFN γ และเมื่อนำลำดับเบสไปแปลรหัสด้วยโปรแกรม bioedit พบว่าสามารถแปลรหัส ได้เป็นโปรตีนขนาด 19.45 kDa

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
213948 : ATACACTTATTCCTTAACTTTTCAGCTTTGGTGATTTTCTGGCTCTACTGCAAGGCGCCCTTTTAAAGAAATAACGATCCTAAAGGACTATT : 112
IFNg   : ATACACTTATTCCTTAACTTTTCAGCTTTGGTGATTTTCTGGCTCTACTGCAAGGCGCCCTTTTAAAGAAATAACGATCCTAAAGGACTATT : 112
      ATG GTATACACTTATTTCTTAGCTTTTCAGCTTTGGTGACTTTGTCTTTTCTGGCTCTACTGCCAGGCGCCCTTTTAAAGAAATAACGATCCTAAAGGACTATT

      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
213948 : TTAATGCAATCTCCTCAGATTAACCTAATGGTGACCTCTTTCTTAGAAATTTTGAAGATTTGAAAGAGGAGAGTGACAAAAAATAATCAGAGCCAAATTTGTCTCTTT : 224
IFNg   : TTAATGCAATCTCCTCAGATTAACCTAATGGTGACCTCTTTCTTAGAAATTTTGAAGATTTGAAAGAGGAGAGTGACAAAAAATAATCAGAGCCAAATTTGTCTCTTT : 224
      TTAATGCAATCTCCTCAGATTAACCTAATGGTGACCTCTTTCTTAGAAATTTTGAAGATTTGAAAGAGGAGAGTGACAAAAAATAATCAGAGCCAAATTTGTCTCTTT

      *      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *
213948 : CTACTCTCAAAATTTCTTGAATCTTCAAGATAACGAGGCAATTCAGAGGAGCATGGATGTGATCAAGCAAGCATGTTTCAGAGGTTCTCAATGGTAGCTCTGGGAAACTG : 336
IFNg   : CTACTCTCAAAATTTCTTGAATCTTCAAGATAACGAGGCAATTCAGAGGAGCATGGATGTGATCAAGCAAGCATGTTTCAGAGGTTCTCAATGGTAGCTCTGGGAAACTG : 336
      CTACTCTCAAAATTTCTTGAATCTTCAAGATAACGAGGCAATTCAGAGGAGCATGGATGTGATCAAGCAAGCATGTTTCAGAGGTTCTCAATGGTAGCTCTGGGAAACTG

      340      *      360      *      380      *      400      *      420      *      440
213948 : AATGACTTCGAAAAGCTGATTAAAAATCCGGTAGATAATCTGCAGATCCAGCGCAAGCCATCAGTGAATCATCAAAGTGATGAATGATCTGTCCACCAAGTCTAAACCTAA : 448
IFNg   : AATGACTTCGAAAAGCTGATTAAAAATCCGGTAGATAATCTGCAGATCCAGCGCAAGCCATCAGTGAATCATCAAAGTGATGAATGATCTGTCCACCAAGTCTAAACCTAA : 448
      AATGACTTCGAAAAGCTGATTAAAAATCCGGTAGATAATCTGCAGATCCAGCGCAAGCCATCAGTGAATCATCAAAGTGATGAATGATCTGTCCACCAAGTCTAAACCTAA

      *      460      *      480      *      500
213948 : GAAAGCGGAAGAGAGTCAGACTATGTTCCAAGGCCAGAGGCATCAAAATTA : 501
IFNg   : GAAAGCGGAAGAGAGTCAGACTATGTTCCAAGGCCAGAGGCATCAAAATTA : 501
      GAAAGCGGAAGAGAGTCAGACTATGTTCCAAGGCCAGAGGCATCAAAATTA

```

ภาพ 21 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ IFNg ของสุกร กับ IFNg ที่ปรากฏในฐานข้อมูล Genbank (NM_213948)

>IFNg

```

1   ATG AGT TAT ACA ACT TAT TTC TTA GCT TTT CAG CTT TGC GTG ACT 45
1   Met Ser Tyr Thr Thr Tyr Phe Leu Ala Phe Gln Leu Cys Val Thr 15

46  TTG TGT TTT TCT GGC TCT TAC TGC CAG GCG CCC TTT TTT AAA GAA 90
16  Leu Cys Phe Ser Gly Ser Tyr Cys Gln Ala Pro Phe Phe Lys Glu 30

91  ATA ACG ATC CTA AAG GAC TAT TTT AAT GCA AGT ACC TCA GAT GTA 135
31  Ile Thr Ile Leu Lys Asp Tyr Phe Asn Ala Ser Thr Ser Asp Val 45

136 CCT AAT GGT GGA CCT CTT TTC TTA GAA ATT TTG AAG AAT TGG AAA 180
46  Pro Asn Gly Gly Pro Leu Phe Leu Glu Ile Leu Lys Asn Trp Lys 60

181 GAG GAG AGT GAC AAA AAA ATA ATT CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTC 225
61  Glu Glu Ser Asp Lys Lys Ile Ile Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe 75

226 TAC TTC AAA TTC TTT GAA ATC TTC AAA GAT AAC CAG GCC ATT CAA 270
76  Tyr Phe Lys Phe Phe Glu Ile Phe Lys Asp Asn Gln Ala Ile Gln 90

271 AGG AGC ATG GAT GTG ATC AAG CAA GAC ATG TTT CAG AGG TTC CTA 315
91  Arg Ser Met Asp Val Ile Lys Gln Asp Met Phe Gln Arg Phe Leu 105

316 AAT GGT AGC TCT GGG AAA CTG AAT GAC TTC GAA AAG CTG ATT AAA 360
106 Asn Gly Ser Ser Gly Lys Leu Asn Asp Phe Glu Lys Leu Ile Lys 120

361 ATT CCG GTA GAT AAT CTG CAG ATC CAG CGC AAA GCC ATC AGT GAA 405
121 Ile Pro Val Asp Asn Leu Gln Ile Gln Arg Lys Ala Ile Ser Glu 135

406 CTC ATC AAA GTG ATG AAT GAT CTG TCA CCA AGA TCT AAC CTA AGA 450
136 Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser Pro Arg Ser Asn Leu Arg 150

451 AAG CGG AAG AGA AGT CAG ACT ATG TTC CAA GGC CAG AGA GCA TCA 495
151 Lys Arg Lys Arg Ser Gln Thr Met Phe Gln Gly Gln Arg Ala Ser 165

496 AAA TAA 501
166 Lys End

```

ภาพ 22 ลำดับเบสและลำดับของกรดอะมิโนของยีน IFNg ของสุกรในฐานข้อมูล GeneBank (NM_213948)

>IFNg

```

1   ATG GGT TAT ACA ACT TAT TTC TTA GCT TTT CAG CTT TGC GTG ACT 45
1   Met Gly Tyr Thr Thr Tyr Phe Leu Ala Phe Gln Leu Cys Val Thr 15

46  TTG TGT TTT TCT GGC TCT TAC TGC CAG GCG CCC TTT TTT AAA GAA 90
16  Leu Cys Phe Ser Gly Ser Tyr Cys Gln Ala Pro Phe Phe Lys Glu 30

91  ATA ACG ATC CTA AAG GAC TAT TTT AAT GCA AGT ACC TCA GAT GTA 135
31  Ile Thr Ile Leu Lys Asp Tyr Phe Asn Ala Ser Thr Ser Asp Val 45

136 CCT AAT GGT GGA CCT CTT TTC TTA GAA ATT TTG AAG AAT TGG AAA 180
46  Pro Asn Gly Gly Pro Leu Phe Leu Glu Ile Leu Lys Asn Trp Lys 60

181 GAG GAG AGT GAC AAA AAA ATA ATT CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTC 225
61  Glu Glu Ser Asp Lys Lys Ile Ile Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe 75

226 TAC TTC AAA TTC TTT GAA ATC TTC AAA GAT AAC CAG GCC ATT CAA 270
76  Tyr Phe Lys Phe Phe Glu Ile Phe Lys Asp Asn Gln Ala Ile Gln 90

271 AGG AGC ATG GAT GTG ATC AAG CAA GAC ATG TTT CAG AGG TTC CTA 315
91  Arg Ser Met Asp Val Ile Lys Gln Asp Met Phe Gln Arg Phe Leu 105

316 AAT GGT AGC TCT GGG AAA CTG AAT GAC TTC GAA AAG CTG ATT AAA 360
106 Asn Gly Ser Ser Gly Lys Leu Asn Asp Phe Glu Lys Leu Ile Lys 120

361 ATT CCG GTA GAT AAT CTG CAG ATC CAG CGC AAA GCC ATC AGT GAA 405
121 Ile Pro Val Asp Asn Leu Gln Ile Gln Arg Lys Ala Ile Ser Glu 135

406 CTC ATC AAA GTG ATG AAT GAT CTG TCA CCA AGG TCT AAC CTA AGA 450
136 Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser Pro Arg Ser Asn Leu Arg 150

451 AAG CGG AAG AGA AGT CAG ACT ATG TTC CAA GGC CAG AGA GCA TCA 495
151 Lys Arg Lys Arg Ser Gln Thr Met Phe Gln Gly Gln Arg Ala Ser 165

496 AAA TAA 501
166 Lys End

```

ภาพ 23 ลำดับเบสและลำดับของกรดอะมิโนของยีน IFNg ของสุกรที่แยกได้จาก PBMC

นำพลาสมิด pIFNg กำจัด endotoxin

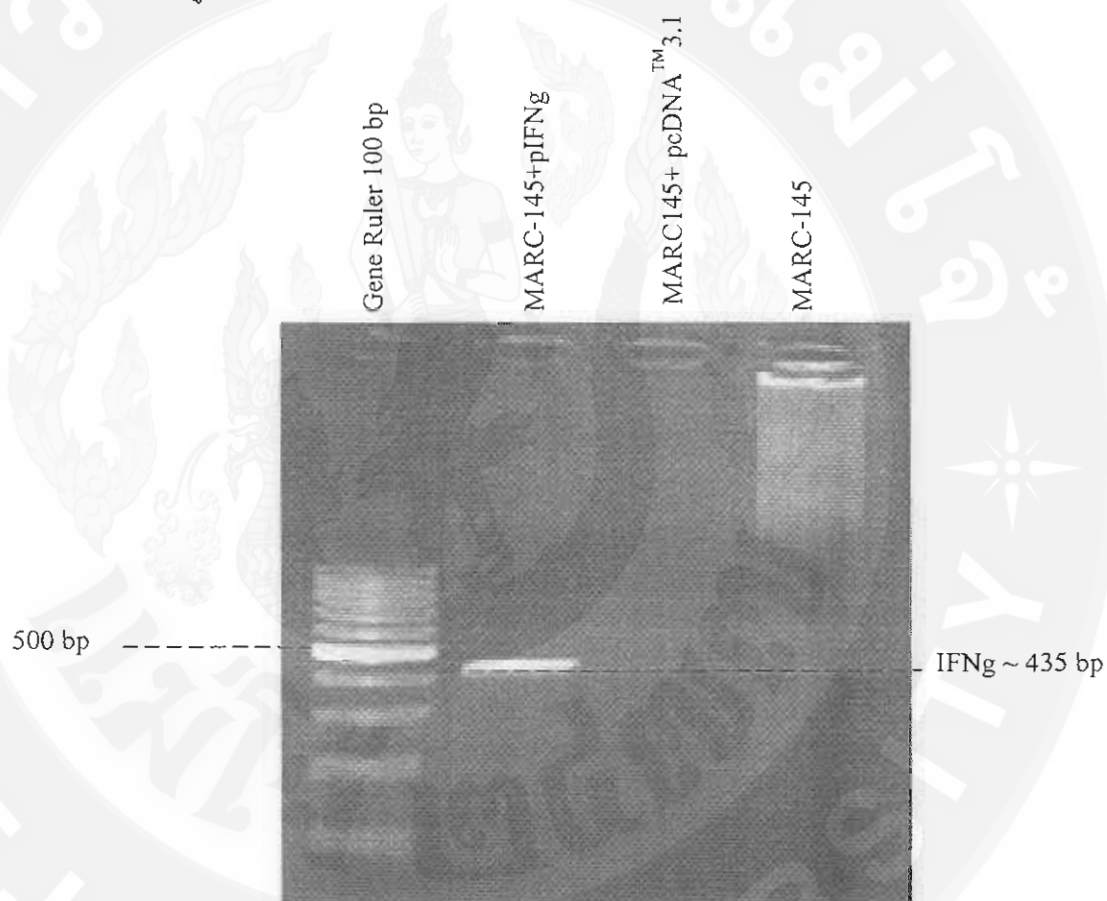
เมื่อได้ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ถูกต้องแล้ว นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวและสกัดพลาสมิด เพื่อกำจัดจากการปนเปื้อนของ endotoxin bacteria ที่อาจจะทำให้เกิดการรบกวนในการทำการทดลอง โดยการใช้ชุดสกัด endofree[®] Plasmid maxi kit (Qiagen, USA) ซึ่งจะใช้กับโคโลนีของพลาสมิด pIFNg และ pcDNATM3.1 จะเห็นความแตกต่างระหว่างพลาสมิด pIFNg และ pcDNATM3.1 ประมาณ 500 คู่เบส (ภาพ 24)



ภาพ 24 พลาสมิด pIFNg และ pcDNATM3.1 หลังจากกำจัด endotoxin เพื่อดูความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่ต่างกัน 500 คู่เบส

หมายเหตุ: Gene RulerTM คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Gene RulerTM DNA Ladder, pcDNATM3.1 คือ พลาสมิดเวกเตอร์ที่ไม่ได้รับยีน IFNg, pIFNg คือ พลาสมิดที่ได้รับยีน IFNg

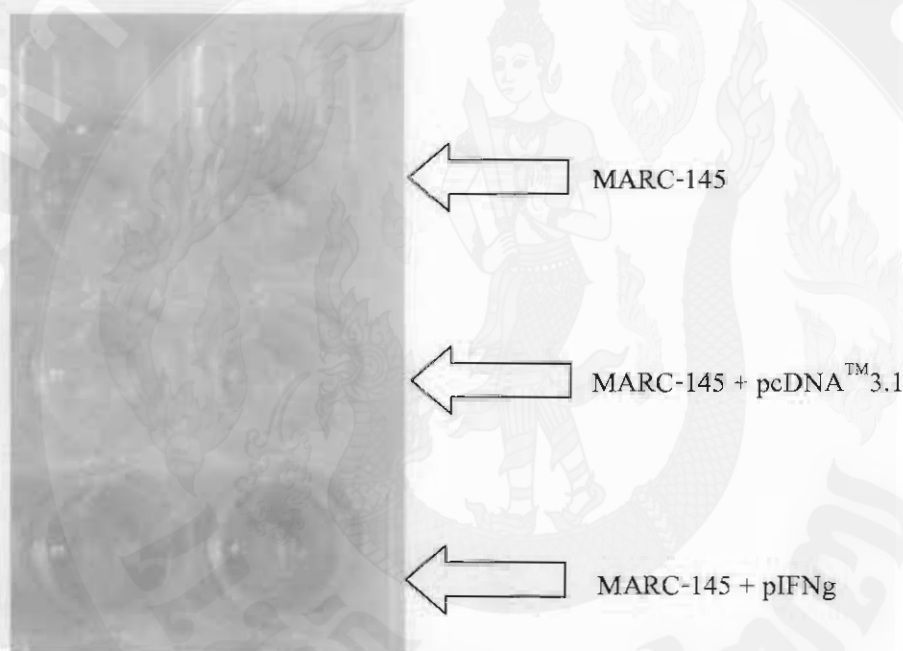
พลาสมิด pIFNg เมื่อถูกถ่ายเข้าสู่เซลล์ MARC-145 นำเซลล์มาทำ RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน IFNg เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน IFNg ในระดับ mRNA ดังภาพ 25 ที่มีขนาด 435 คู่เบส จากเซลล์ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิด pIFNg เท่านั้น และได้ทำการเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิด pIFNg ในสารปฏิกิริยาระงับยีนที่ชนิด 500 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร (ดูผลการทดสอบเซลล์จากภาพผนวก)



ภาพ 25 การแสดงออกของพลาสมิด pIFNg เมื่อถูกถ่ายเข้าสู่เซลล์ MARC-145 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยการเก็บเซลล์มาวิเคราะห์ RNA โดยเทคนิค RT-PCR

หมายเหตุ: Gene Ruler™ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Gene Ruler™ DNA Ladder, MARC- 145+pIFNg คือ เซลล์ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิดที่ได้รับยีน IFNg, MARC-145+ pcDNA™ 3.1D คือ เซลล์ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิดเวกเตอร์ที่ไม่ได้รับยีน IFNg, MARC-145 คือ เซลล์ปกติ

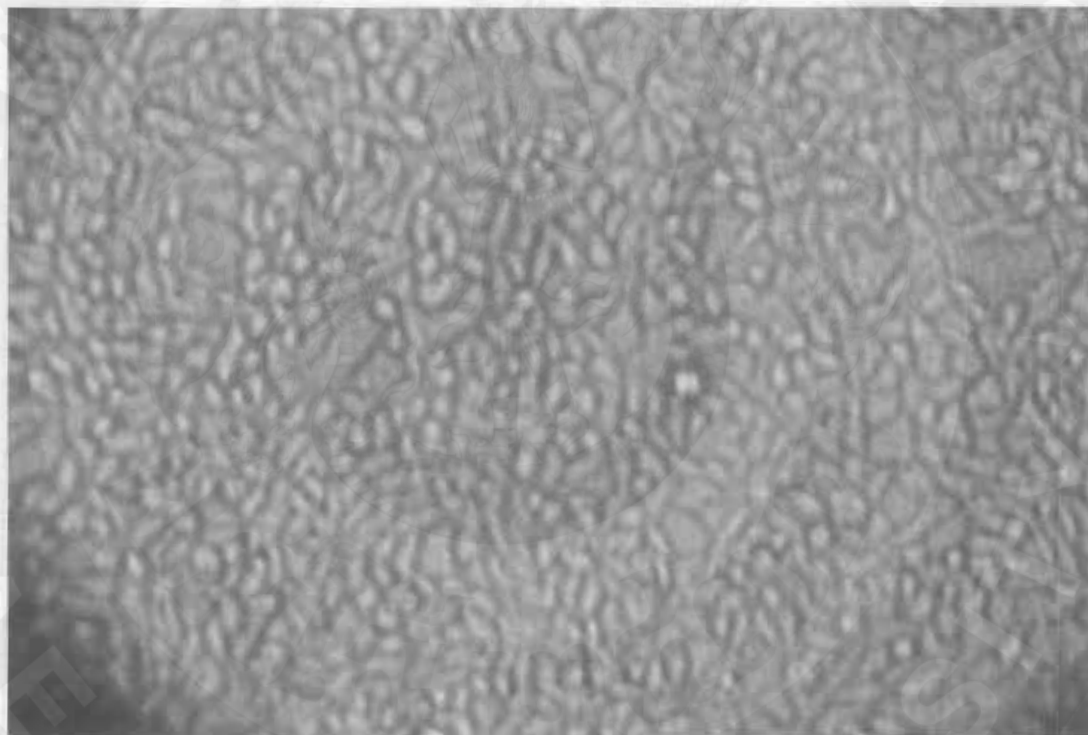
เมื่อนำอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ มาทำการศึกษาการแสดงออกของยีน IFN γ ด้วยเทคนิค ELISA พบว่ามีโปรตีน IFN γ ในอาหารที่ถูกเลี้ยงในเซลล์ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วย พลาสมิด pIFN γ เท่านั้น ภาพ 26 โดยที่ในอาหารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145 และ MARC-145 กับ pcDNATM3.1 ไม่พบโปรตีน IFN γ ซึ่งจากผลการทดลอง RT-PCR และการทำ ELISA แสดงให้เห็นว่ายีน IFN γ ที่แยกได้จากตุ๊กสามารถแสดงออกได้ในเซลล์ MARC-145 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน



ภาพ 26 การแสดงออกของโปรตีน IFN γ ใน MARC-145 หลังจากที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิด pIFN γ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยการเก็บอาหารมาวิเคราะห์โปรตีนโดยเทคนิค ELISA
หมายเหตุ: MARC-145 คือเซลล์ปกติ, MARC-145+ pcDNATM3.1 คือ เซลล์ที่ถูกถ่ายด้วย พลาสมิดเวกเตอร์ที่ไม่ได้รับยีน IFN γ , MARC-145+pIFN γ คือ เซลล์ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิด ที่ได้รับยีน IFN γ

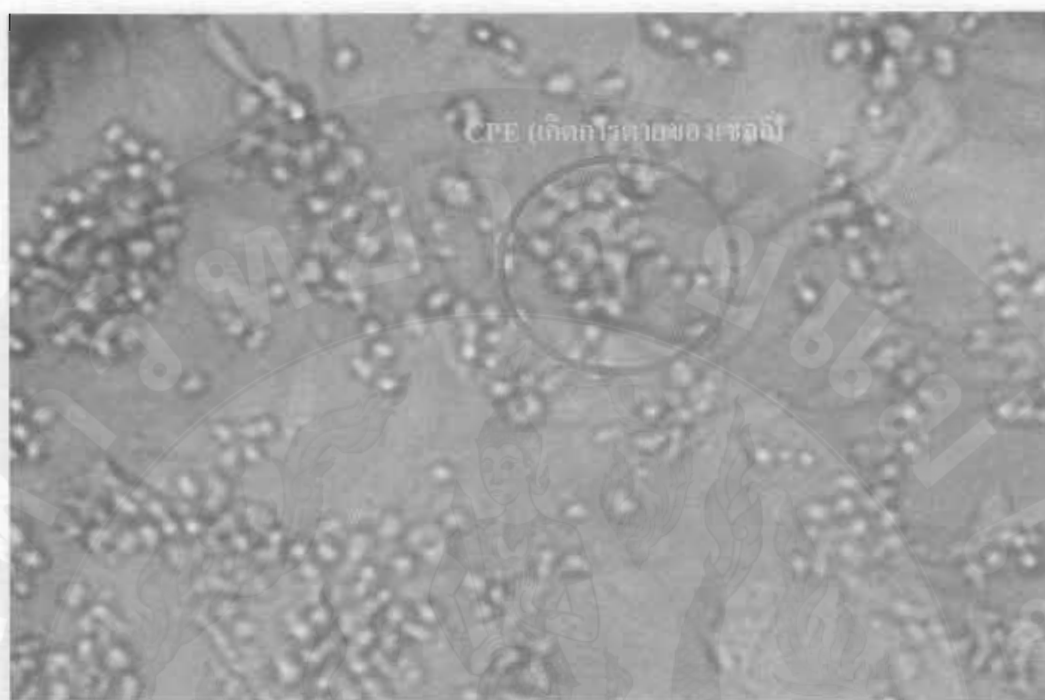
การลดลงของไวรัส

นำเซลล์ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิด pIFNg และ pcDNATM3.1 เลี้ยงใน PRRSV เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ เกิดเป็นลักษณะกลม ซึ่งเรียกว่าการเกิด CPE ดังภาพ 27 ซึ่งมีค่า TCID₅₀/ มิลลิลิตร ของเซลล์ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิด pIFNg และ pcDNATM3.1 เท่ากับ $10^{4.5}$ (31,622) และ $10^{4.6}$ (39,810) ตามลำดับ ซึ่งลดลงจาก $10^{6.75}$ (5,623,413) ของเซลล์ปกติ MARC-145 แสดงให้เห็นว่ายีน IFNg ที่แยกได้จากสุกรสามารถแสดงออกได้ในเซลล์ MARC-145 และสามารถทำงานได้

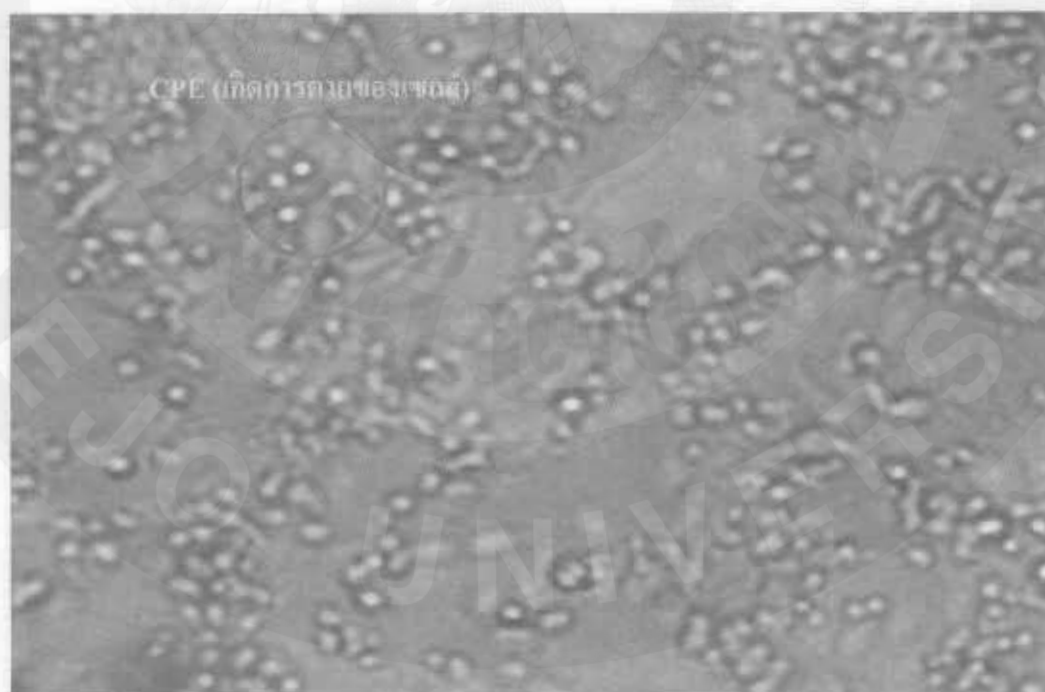


(A) เซลล์ปกติ MARC-145

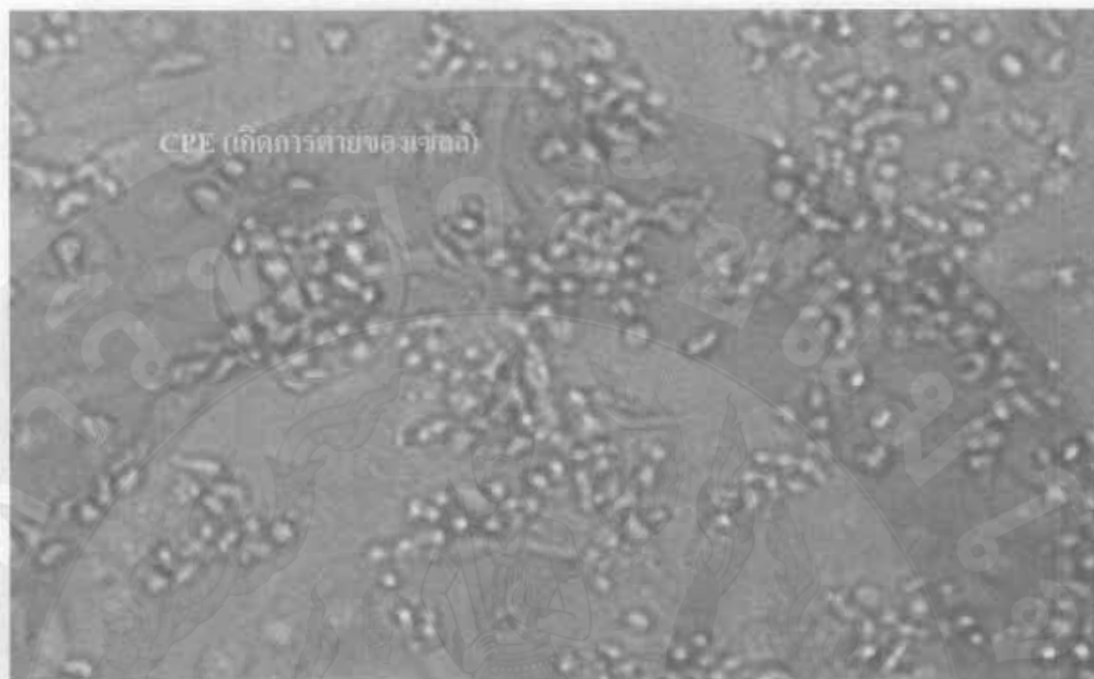
ภาพ 27 การตายของเซลล์ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส



(B) เซลล์ปกติ MARC-145 ที่มีการติดเชื้อ PRRSV

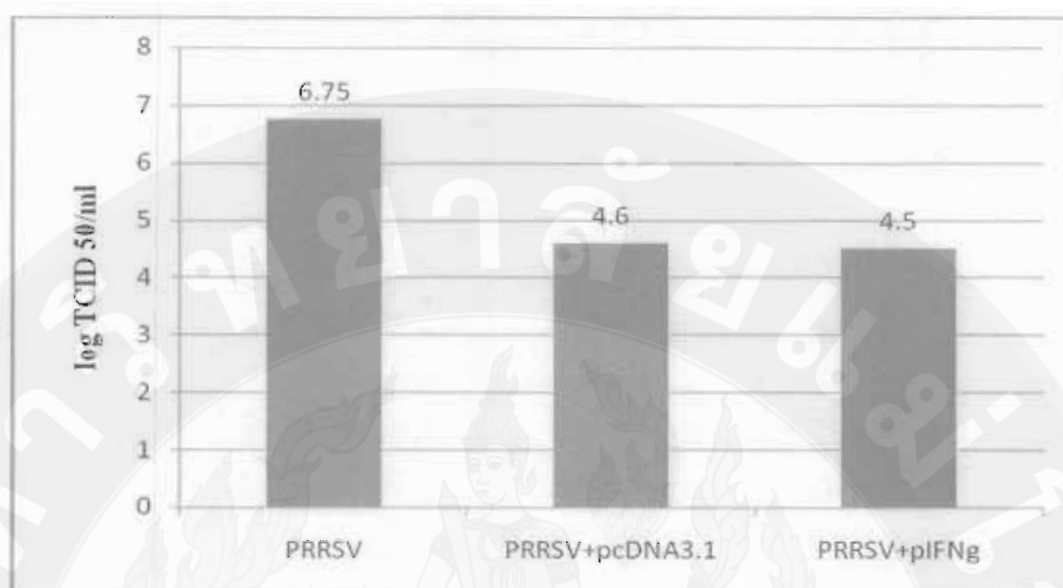


(C) เซลล์ปกติ MARC-145 ที่ถ่ายด้วย pcDNATM3.1 และทำให้ติดเชื้อ PRRSV



(D) เซลล์ปกติ MARC-145 ที่ถ่ายฝากด้วยพลาสมิด pIFNg และทำให้ติดเชื้อ PRRSV

ภาพ 27 (ต่อ)



ภาพ 28 เปรียบไตเตอร์ของ PRRSV ในเซลล์ MARC-145 (PRRSV) MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วย pcDNA 3.1 (PRRSV+pcDNA 3.1) และ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิด pIFNg (PRRSV +pIFNg) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการวิจัย

PRRSV เป็นไวรัสก่อโรคของสุกรที่สร้างความเสียหายเป็นอย่างมากทางเศรษฐกิจ PRRSV ก่อโรคในสุกรทุกอายุ และติดเข้าสู่เซลล์โมโนไซต์ มาโครฟาจ และเซลล์ที่เกิดจาก African green monkey kidney cell เช่น MA-104, MARC-145 และ CL-2621 (Snijder and Meulenberg, 1998) เมื่อมีการติดเชื้อ PRRSV ที่แม่สุกรตั้งท้อง จะมีอาการมีไข้ เบื่ออาหาร สุขภาพทรุดโทรม บางครั้งมีการบวมน้ำใต้ผิวหนังและขาหลัง คั่งเลือดโดยเฉพาะที่ใบหู อวัยวะเพศอาจมีสีม่วงคล้ำ และมีผลต่อแม่สุกรในทุกระยะการตั้งท้อง แต่จะรุนแรงที่สุดในแม่สุกรที่ตั้งท้องในระยะท้าย ทำให้เกิดการแท้ง การตายแรกคลอด หรือลูกสุกรอ่อนแอ การตายก่อนการหย่านม ในแม่สุกรให้นม จะมีอาการคล้ายแม่สุกรตั้งท้อง เช่น มีไข้ เบื่ออาหาร ภาวะนั้นนมแห้ง ทำให้ขาดสารอาหารและภูมิคุ้มกันจากน้ำนมในการต่อต้านเชื้อ เช่น *E. coli* จึงทำให้เกิดอัตราการตายก่อนหย่านมของลูกสุกร การติดเชื้อในสุกรพ่อพันธุ์ จะมีอาการคล้ายกับการติดเชื้อในสุกรแม่พันธุ์ เช่น มีไข้ เบื่ออาหาร และส่งผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจ มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ความสมบูรณ์ของพ่อพันธุ์ มีการลดการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ มีความผิดปกติของตัวอสุจิเกิดขึ้น เช่น มีจุดคล้ายหยดน้ำในไซโตพลาสซึม (proximal cytoplasmic droplets) และความผิดปกติของหางของตัวอสุจิ ในลูกสุกรจะมีอาการ เบื่ออาหาร มีไข้สูง อัตราการหายใจสูงขึ้น หายใจขัด และการติดเชื้อแทรกซ้อน เช่น ไวรัสไข้หวัดสุกร มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการสูญเสียจากโรกระบบทางเดินหายใจแบบซับซ้อนของสุกรเพิ่มขึ้น หรือ porcine respiratory disease complex และมีอาการอื่น ๆ ที่พบในลูกสุกรได้แก่ อาการบวม น้ำ ภาวะบวมของเนื้อเยื่อรอบดวงตา รวมทั้งเปลือกตา เยื่อตาขาวอักเสบ ใบหูคั่งเลือดจนมีสีคล้ำ ขน ลูก หนาวสั่น อาการท้องเสีย เป็นต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกยีน IFN γ ของสุกรและเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสมของยีน IFN γ ที่สามารถแสดงออกได้ในเซลล์มะเร็งไตลิง (MARC-145) เพื่อการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับ PRRSV

การโคลนยีน IFN γ เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ 4 และ 438 จากเบส A เป็น G ซึ่งในตำแหน่งที่ 4 เป็นบริเวณที่จับกับไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน (F 5'-CAC C AT GGG TTA TAC AAC TAA TTT-3', R 5'-TTA TTT TGA TGC TCT CTG GCC-3') จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ 4 จากเดิมในฐานข้อมูลของ Genbank เป็น A จึงเปลี่ยนเป็น G เนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งนี้เป็น G ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก serine เป็น glycine แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน ในตำแหน่งที่ 438 ไม่มีผลต่อกรดอะมิโน

การใช้เซลล์ยูคาริโอตในการทดสอบในระดับ mRNA ไม่จำเป็นต้องใช้เซลล์ MARC-145 อาจจะใช้เซลล์ยูคาริโอตชนิดอื่นได้เช่น HeLa cell หรือ SK-6 แต่เซลล์ที่นำมาใช้นั้น ต้องทดสอบก่อนว่าไม่มีการแสดงออกของยีน IFN γ ด้วยการทำ RT-PCR และจับกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ IFN γ เช่น (F 5'- TCT TAC TGC CAG GCG CCC TT-3', R 5'- TGA TGC TCT CTG GCC TTG GAA CA-3') แต่ในระดับโปรตีนและการทดสอบการลดลงของไวรัสนั้นต้องใช้ MARC-145 เนื่องจาก MARC-145 เป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะกับ PRRSV โดยมี vimentin เป็น receptor (Kim et al., 2006) เมื่อพบการแสดงออกของโปรตีน IFN γ นำเซลล์เหล่านี้ไปทดสอบการลดลงของไวรัส (TCID $_{50}$) เนื่องจาก PRRSV สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ MARC-145 แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์อื่นที่ไม่มีความจำเพาะได้

จากผลการวิจัยพบว่าพลาสมิดเวกเตอร์ pcDNATM3.1 และ IFN γ มีผลต่อการลดลงของไวรัส เนื่องจากในพลาสมิดเวกเตอร์นี้มี unmethylated CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) ซึ่งเป็น motif ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของไซโตไคน์ต่าง ๆ ได้เช่น IFN α , IFN β และ IL-12 เป็นต้น (Miller et al., 2009; Latz et al., 2004) ซึ่งไซโตไคน์เหล่านี้อาจไปรบกวนการแบ่งตัวของ PRRSV ทำให้เซลล์ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิดเวกเตอร์ pcDNATM3.1 มีการลดลงของ PRRSV ซึ่งความเป็นไปได้ของการที่ CpG-ODN กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์อื่นในเซลล์ MARC-145 ควรมีการศึกษาต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้สร้างพลาสมิดที่มียีน IFN γ ของสุกรที่สามารถแสดงออกได้ในเซลล์ MARC-145 ซึ่งเซลล์ MARC-145 ที่มียีน IFN γ ของสุกรนี้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ PRRSV ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาน้ำหนักของโปรตีน IFN γ ด้วยเทคนิค western blot เพื่อบอกน้ำหนักของโปรตีน IFN γ ที่ถูกต้อง
2. งานวิจัยในอนาคตควรมีการทดสอบหา IFN α/β เนื่องจากงานวิจัยนี้พบการลดลงของ PRRSV ในเซลล์ MARC-145 ที่ถูกถ่ายด้วยพลาสมิด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการแสดงออกของ IFN α/β ที่เพิ่มขึ้น
3. ควรศึกษาฤทธิ์ต้าน PRRSV ของพลาสมิดที่มียีน IFN γ ของสุกรในระดับ in vivo ต่อไปเพื่อประยุกต์ใช้กับสุกรในการรักษาโรคอื่นเนื่องจาก PRRSV

บรรณานุกรม

- รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช. 2548. พยาธิวินิจฉัยโรคพอร์ไคร์อาร์เอส. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล ปอยท์ กราฟิค. 189 หน้า
- สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php (7 ตุลาคม 2554).
- Amonsin, A., R. Kedkovid, S. Puranaveja, P. Wongyanin, S. Suradhat and R. Thanawongnuwech. 2009. Comparative analysis of complete nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes). **Virology** 6: 143-153.
- Bautista, E.M. and T.W. Molitor 1999. IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. **Arch. Virol.** 144 : 1191-1200.
- Breedam, W.V., P.L. Delputte, H.V. Gorp, G. Misinzo, N.Vanderheijden, X. Duan and H.J. Nauwynck. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry in the porcine macrophage. **J. Gen. Virol.** 91: 1659-1667.
- Cho, J. G. and S. A. Dee 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Theriogenology** 66 (3): 655-662.
- Choi C., W.-S. Cho, B. Kim and C. Chae. 2001. Expression of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). **J. Comp. Pathol.** 127: 106-113.
- Dea, S., C. A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh and D. Rogan. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the north American and European isolates. **Arch. Virol.** 145 (4): 659-688.
- Delputte, P.L. and H. J. Nauwynck. 2004. Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. **Virology.** 78: 8094-8101.
- Delputte, P.L., W.V. Breedam, I. Delrue, C. Oetke, P.R. Crocker and H.J. Nauwynck. 2007. Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. **Virology.** 81: 9546-9550.

- Done, S. H., D. J. Paton and M. E. C. White. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): A review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. **Br. Vet. J.** 152(2): 153-174.
- Dorman, S. E., G. Uzel, J. Roesler, J. S. Bradley, J. Bastian, G. Billman, S. King, A. Filie, J. Schermerhorn and S. M. Holland. 1999. Viral infections in interferon gamma receptor deficiency. **J. Pediatr.** 135(5): 640-643.
- Fuertes, L.L., N. Domenech, B. Alvarez, A. Ezquerro, J. Dominguez, J.M. Castro and F. Alonso. 1999. Analysis of cellular immune response in pig recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. **Virus Res.** 64: 33-42.
- Frucht, D.M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J.J. O'Shea and S. Koyasu. 2001. IFN gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol.** 22: 556-560.
- Jiang, Y., S. Xiao, L. Fang, X. Yu, Y. Song, C. Niu and H. Chen. 2006. DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. **Vaccine** 24(15): 2869-2879.
- Kim, H. S., J. Kwang, I. J. Yoon, H. S. Joo and M. L. Frey. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. **Arch. Virol.** 133(3): 477-483.
- Kim, J.K., A.M. Fahad, K. Shanmukhappa and S. Kapil. 2006. Defining the cellular target (s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. **Virology.** 80(2): 689-696.
- Latz, E., A.Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B.G. Monks, C.F. Knetter, E. Lien, N.J. Nilsen, T. Espevik and D.T. Golenbock. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. **Nat. Immunol.** 5:190-198.
- Lieberman, L. A. and C. A. Hunter. 2002. Regulatory pathways involved in the infection-induced production of IFN-gamma by NK cells. **Microbes Infect.** 4(15): 1531-1538.
- Levy, D.E. and A.G. Sastre. 2001. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. **Cytokine Growth Factor Rev.** 12: 143-156.
- Mateu, E. and I. Diaz. 2008. The challenge of PRRS immunology. **Vet. J.** 177(3): 345-351.

- Meier, W. A., J. Galeota, F. A. Osorio, R. J. Husmann, W. M. Schnitzlein and F. A. Zuckermann. 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. **Virology** 309(1): 18-31.
- Miller, L.C., K. M. Lager. And M.E. Kehrli. 2009. Role of Toll-like receptors in activation of porcine alveolar macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Clin. Vaccine Immunol.** 16: 360-365.
- Molitor, T.W., E.M. Bautisa and C.S. Choi. 1997. Immunity to PRRSV: double-edged sword. **Vet. Microbiol.** 55: 265-276.
- Murtaugh, M.P., Z. Xiao and F. Zuckermann. 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus Infection. **Viral Immunol.** 15: 533-547.
- Patton, J. B., R. R. Rowland, D. Yoo and K.-O. Chang. 2009. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. **Virus Res.** 140(1-2): 161-171.
- Prescott, J.F. and J.D. Baggot. 1994. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine.** 2nd ed. Iowa: Blackwell Scientific Publications. 612 p.
- Royae A.R., R.J. Husmann, H.D. Dawson, G.C. Nova, W.M. Schnitzlein, F.A. Zuckermann and J.K. Lunney. 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. **Vet. Immunol. immunopathol.** 102 : 199-216.
- Schroder K., P.J. Hertzog, T.Ravasi and D.A. Hume. 2004. Interferon gamma : an overview of signals, mechanisms and functions. **Leukoc. Biol.** 75: 163-189.
- Sharma, S.N. and S.C. Adlakha. 1994. **Textbook of veterinary virology.** New Delhi: Vikas publishing house PTV LTD. 373 p.
- Snijder, E.J. and J.J.M. Meulenber. 1998. The molecular biology of arteriviruses. **J. Gen. Virol.** 79: 961-979.

- Susan E., U. G. Dorman, J. Roesler, J.S. Bradley, J. Bastian, G. Billman, S. King, A. Filie, J. Schermerhorn and S.M. Holland. 1999. Viral infections in interferon gamma receptor deficiency. **J. Pediatr.** 135 : 640-643.
- Thanawongnuwech R., A. Rungsipipat, S. Disatian, R. Saiyasombat, S. Napakanaporn and P. G. Halbur. 2003. Immunohistochemical staining of IFN gamma positive cells in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected lungs. **Vet. Immunol. Immunopathol** 91(1): 73-77.
- Wang, D., L. Fang, F. Zhao, R. Luo, H. Chen and S. Xiao. 2011. Molecular cloning, expression and antiviral activity of porcine interleukin-29 (poIL-29). **Dev. Comp. Immunol.** 35(3): 378-384.
- Zimmerman, J. J., K. J. Yoon, R. W. Wills and S. L. Swenson. 1997. General overview of PRRSV: A perspective from the United States. **Vet. Microbiol.** 55(1-4): 187-196.
- Zuckermann, F. A., E. A. Garcia, I. D. Luque, J. C. Hennings, A. Doster, M. Brito and F. Osorio. 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. **Vet. Microbiol.** 123(1-3): 69-85.





ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเซลล์ MARC-145

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเซลล์ MARC-145

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

LB (Luria-Bertani) broth

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	10 กรัม
dH ₂ O	ทำให้เป็น 1 ลิตร

จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

LB Agar

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	10 กรัม
Agar	15 กรัม
dH ₂ O	ทำให้เป็น 1 ลิตร

จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

LB+แอมพิซิลลิน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	10 กรัม
dH ₂ O	ทำให้เป็น 975 มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีนำมาแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียสและเติม 25 มิลลิลิตร ของแอมพิซิลลิน (2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

อาหารเลี้ยงเซลล์ MARC-145

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ PRMI-1640

RPMI-1640	1 ของ (10.4 กรัม)
NaHCO ₃	2 กรัม
Antibiotic (100x)	10 มิลลิลิตร
Heat-inactivated fetal bovine serum	100 มิลลิลิตร
dH ₂ O	800 มิลลิลิตร

หยด 1 N HCl เพื่อปรับความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเครื่องกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 0.22 ไมครอน)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM

MEM	1 ของ (10.4 กรัม)
NaHCO ₃	2.2 กรัม
Heat-inactivated fetal bovine serum	100 มิลลิลิตร
dH ₂ O	800 มิลลิลิตร

หยด 1 N HCl เพื่อปรับความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเครื่องกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 0.22 ไมครอน)

สารที่ใช้ในการทำการทดลอง

สารกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์

PMA

1 หลอดมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม
DMSO 1 มิลลิลิตร
ทำเป็นความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
เมื่อต้องการใช้ (25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของ PMA)
PMA 1 ไมโครลิตร (จะมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
DMSO 39 ไมโครลิตร
เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

Ionomycin

1 หลอดมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม
DMSO 1 มิลลิลิตร
ทำเป็นความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

PMA/I

1. ความเข้มข้นสุดท้าย 250 ไมโครลิตร ในเซลล์
PBMC 200 ไมโครลิตร + PMA/I 50 ไมโครลิตร

2. ในความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครลิตร ในเซลล์

PBMC 200 ไมโครลิตร + อาหาร 50 ไมโครลิตร + PMA/I 50 ไมโครลิตร

การเตรียมสารละลาย 0.5 M EDTA

EDTA	7.2 กรัม
H ₂ O	400 มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย PBS

NaCl	8 กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.25 กรัม
KCl	0.2 กรัม
H ₂ O	ทำให้เป็น 1 ลิตร

จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย PBS+5 mM EDTA

NaCl	8 กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.25 กรัม
KCl	0.2 กรัม
EDTA	1.86 กรัม
H ₂ O	ทำให้เป็น 1 ลิตร

จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย RBC lysis buffer

NH_4Cl	8.02 กรัม
NaHCO_3	0.84 กรัม
EDTA	0.37 กรัม
H_2O	ทำให้เป็น 1 ลิตร

จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

แอมพิซิลลิน	1 เม็ด
H_2O	125 มิลลิลิตร

นำไปกรองผ่านเครื่องกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 0.22 ไมครอน)

สารละลาย TAE 10X

Tris base	48.4 กรัม
Glacial acetic acid	11.42 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	20 มิลลิลิตร
dH_2O	ทำให้เป็น 1 ลิตร
pH 8.0	

TE buffer

1. เตรียม 1M Tris, pH 8.0

Tris (fw 121.14)

12.11 กรัม

dH₂O

70 มิลลิลิตร

pH 8.0 ด้วย conc. HCl

เติมน้ำอีกจนครบ 100 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2. เตรียม 0.5M EDTA pH 8.0

EDTA (fw 372.24)

18.61 กรัม

dH₂O

70 มิลลิลิตร

pH 8.0 ด้วย NaOH

ทำให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

สำหรับ TE buffer

1M Tris pH 8.0

1 มิลลิลิตร

0.5 M EDTA pH 8.0

0.2 มิลลิลิตร

dH₂O

98.8 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

1 N NaOH

NaOH

4 กรัม

H₂O

100 มิลลิลิตร

1 N HCl จาก 37% HCl

HCl 37 %

9.86 มิลลิลิตร

H₂O

90.14 มิลลิลิตร

ตารางผนวก 1 การเตรียม agarose (%)

% agarose	ช่วงของประสิทธิภาพที่สามารถแยกได้
0.3 %	5 kb - 60 kb
0.6 %	1 kb - 20 kb
0.7 %	800 bp - 10 kb
0.9 %	500 bp - 7 kb
1.2 %	400 bp - 6 kb
1.5 %	200 bp - 3 kb
2.0 %	100 bp - 1.2 kb

% agarose ใน 1x TBE buffer สำหรับ gel electrophoresis

- หลังจากที่ละลายวุ้นแล้วเติม ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 - ถ้า 1x TBE 50 มิลลิลิตร จะต้องเติม ethidium bromide 25 ไมโครลิตร
 - ถ้า 1x TBE 100 มิลลิลิตร จะต้องเติม ethidium bromide 50 ไมโครลิตร
- ใส่ loading dye 2 ไมโครลิตร + ladder 2 ไมโครลิตร
- ใส่ loading dye 2 ไมโครลิตร + PCR product 10 ไมโครลิตร
- run 75 V 45 นาที

การเก็บ MARC-145

Freezing Medium

10% DMSO (กรองด้วย 0.2 μ m nylon membrane)

90% FBS (filtered-sterilized)

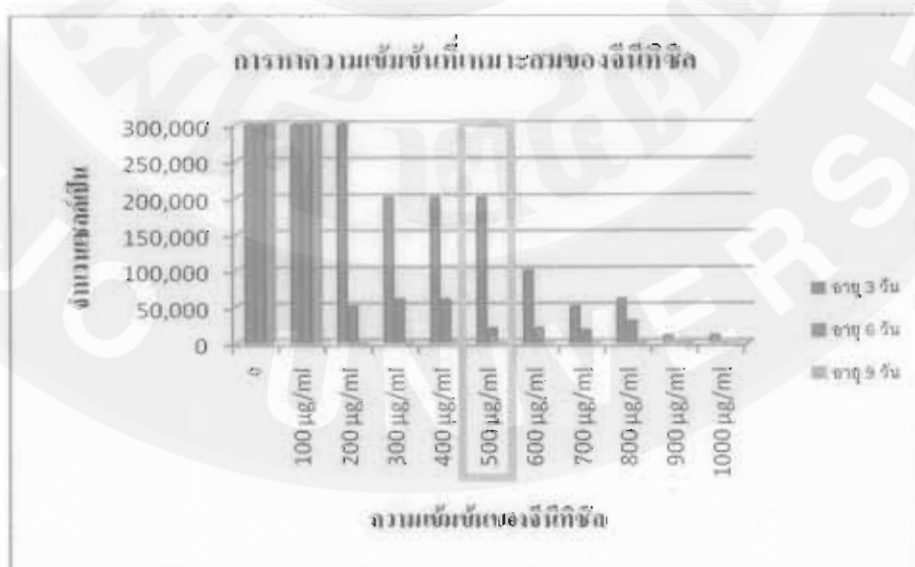




การหาความเหมาะสมของเงินที่ขี้ด

ตารางผนวก 2 การตายของเซลล์ด้วยเงินที่ขี้ด

ความเข้มข้น	อายุ 3 วัน	อายุ 6 วัน	อายุ 9 วัน
0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	300,000	300,000	300,000
100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	300,000	300,000	300,000
200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	300,000	50,000	0
300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	200,000	60,000	0
400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	200,000	60,000	0
500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	200,000	20,000	0
600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	100,000	20,000	0
700 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	50,000	17,500	0
800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	60,000	30,000	0
900 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	10,000	0	0
1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	10,000	0	0



ภาพผนวก 1 การตายของเซลล์ด้วยเงินที่ขี้ด

การคำนวณ TCID₅₀

การเจือจาง	1	2	3	4	% การตาย
0	☐	☐	☐	☐	0%
10 ⁻¹	☐	☐	☐	☐	100%
10 ⁻²	☐	☐	☐	☐	100%
10 ⁻³	☐	☐	☐	☐	80%
10 ⁻⁴	☐	☐	☐	☐	30%
10 ⁻⁵	☐	☐	☐	☐	0%
10 ⁻⁶	☐	☐	☐	☐	0%
10 ⁻⁷	☐	☐	☐	☐	0%
10 ⁻⁸	☐	☐	☐	☐	0%

1. การคำนวณ Proportionate Distance (PD) ระหว่างไวรัส 2 ความเจือจางที่อยู่ใกล้ 50% สูตร $(\% \text{ การเกิด CPE ที่มากกว่า } 50\%) - 50\% / (\% \text{ การเกิด CPE ที่มากกว่า } 50\%) - (\% \text{ การเกิด CPE ที่น้อยกว่า } 50\%)$

$$80\% - 50\% / 80\% - 30\% = 0.6$$

2. การคำนวณ 50% end point คือการเอาค่าการเจือจางที่ทำให้เกิด CPE มากกว่า 50% ความเจือจางของไวรัสที่มีค่ามาก เท่ากับ 10⁻³ หรือ -3

3. เดิมค่า PD และค่า log

$$-3 + 0.6 = -3.6$$

$$\text{Log TCID}_{50} = 10^{-3.6}$$

แสดงให้เห็นว่าที่ความเจือจาง 10^{-3.6} ไวรัสมีความเข้มข้น 10^{3.6} TCID₅₀ / 100 ไมโครลิตร หรือในสารละลาย 1 มิลลิตร จะมีไวรัสอยู่ 10¹ x 10^{3.6} มีค่าเท่ากับ 10^{4.6} TCID₅₀ / มิลลิตร

การคำนวณความเข้มข้นของผลผลิต PCR

การปรับ molar ratio ของผลผลิต PCR:TOPO vector = 0.5:1 – 2:1

Molar ของ TOPO vector

ขั้นตอนที่ 1

$$1\text{bp} = 660\text{ Da}$$

$$5,500\text{ bp} = 660 \times 5,500 = 3,630,000\text{ Da}$$

$$1\text{ molar} = 3,630,000\text{ g/L}$$

ขั้นตอนที่ 2 ความเข้มข้นของ vector

$$15\text{-}20\text{ ng}/\mu\text{l}\text{ หรือ } 15\text{-}20 \times 10^{-3}\text{ g/L}$$

ขั้นตอนที่ 3 การคำนวณ molar

$$3,630,000\text{ g/L} = 1\text{ molar}$$

$$1\text{ g/L} \rightarrow 1/3,630,000\text{ molar}$$

$$15\text{-}20 \times 10^{-3}\text{ g/L} \rightarrow 15\text{-}20 \times 10^{-3} / 3,630,000 = 4.13 - 5.5\text{ nanoMolar (nM)}$$

Molar ของผลผลิต PCR

ขั้นตอนที่ 1

$$1\text{bp} = 660\text{ Da}$$

$$500\text{ bp} = 660 \times 500 = 330,000\text{ Da}$$

$$1\text{ Molar} = 330,000\text{ g/L}$$

ขั้นตอนที่ 2 จำนวนของผลผลิต PCR

Ladder 500 bp มี DNA 115 ng (Fermentas cat#SM0241)

ผลผลิต PCR มี 17.35 ng/ μ l หรือ 17.35×10^{-3} g/L

ขั้นตอนที่ 3 การคำนวณ molar

330,000 g/L = 1 molar

1 g/L $\rightarrow$ 1/330,000 Molar

17.35×10^{-3} g/L $\rightarrow 17.35 \times 10^{-3} / 330,000 = 52.5$ nM

Molar ratio = Molar PCR product : Molar TOPO vector

= 52.5:4.13

= 12.7:1

ถ้าจะใช้อัตราส่วน 0.5:1 -2:1 ratio ต้องใช้ผลผลิต PCR 0.1 μ l



ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุรางคนางค์ เข้มกันฐ
เกิดเมื่อ	27 ตุลาคม 2528
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2546 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนลับแลศรีวิทยา จังหวัดอุตรดิตถ์ พ.ศ. 2551 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ. 2554 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
การนำเสนอผลงาน	การนำเสนอผลงานวิจัยในงานสัมมนาวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ “แม่โจ้-แพร์ วิจัย ครั้งที่ 2” ประจำปี 2554 (โปสเตอร์) เรื่อง “การโคลนยีนอินเทอเฟयरอนแกมมาของสุกรและการแสดงออกในเซลล์ MARC-145” ระหว่างวันที่ 1-2 กันยายน 2554 ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร์ เฉลิมพระเกียรติ อ. ร้องกวาง จ.แพร์