

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Plaque Titration Assay

ในการตรวจหาปริมาณไวรัสเริ่มต้นด้วยการนับจำนวน plaque ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และไวรัสตัวอย่างจำนวน 32 ตัวอย่าง หลังจากที่ได้มีการเพิ่มจำนวนใน GMK cells แล้ว พบว่ามีปริมาณไวรัสเริ่มต้นอยู่ระหว่าง $8.3 \times 10^3 - 9.6 \times 10^{10}$ PFU/ml (ตาราง 2)

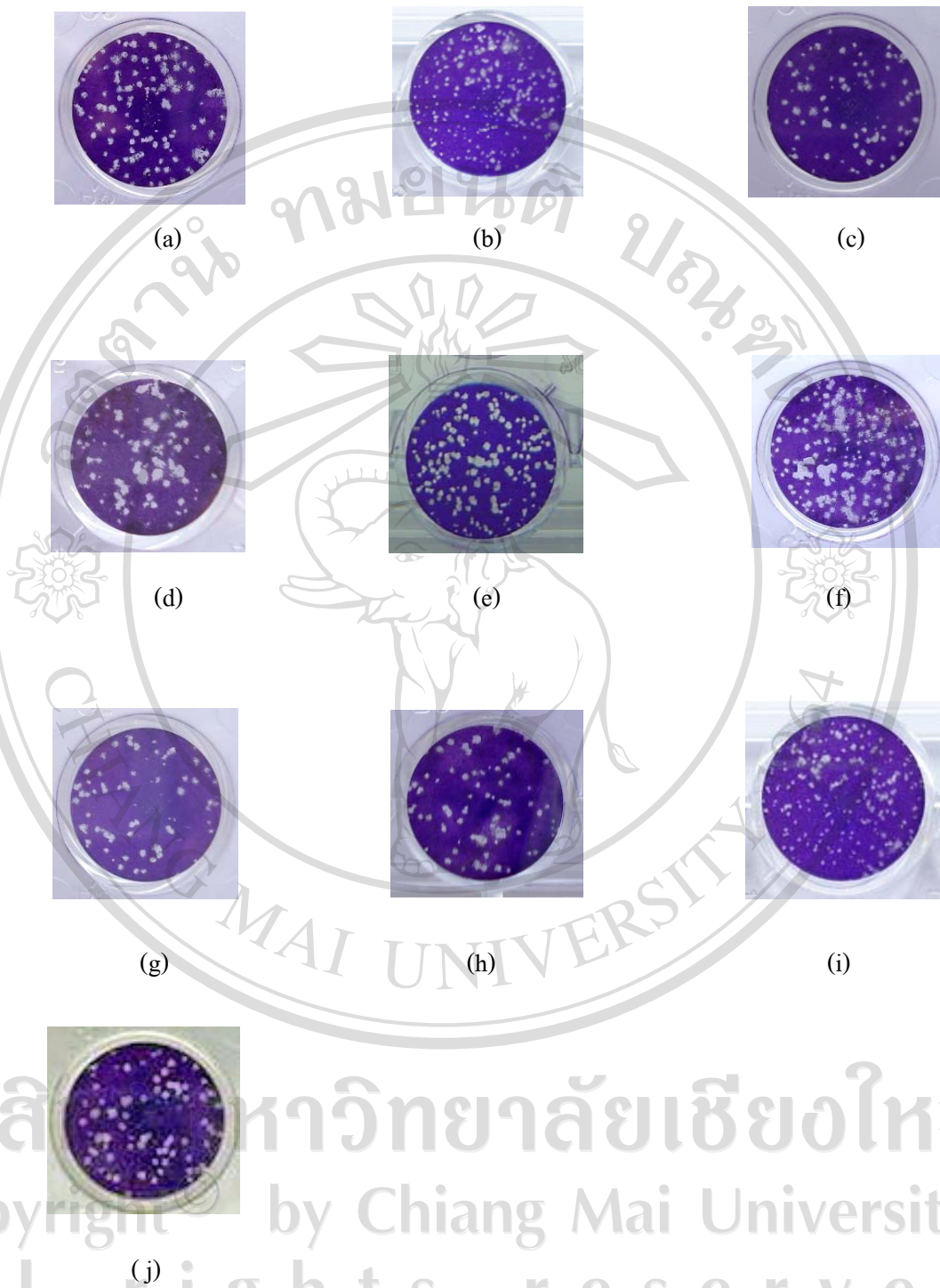
ลักษณะ plaque ของ HSV-1F และไวรัสตัวอย่าง เป็นจุดขนาดเล็ก โดยมีขนาดแตกต่างกันเล็กน้อย (ภาพ 14)

ตาราง 2 ปริมาณไวรัสเริ่มต้นของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และไวรัสตัวอย่างจำนวน 32 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณไวรัส (PFU/ml)
HSV-1F	9.6×10^{10}
1A	1.6×10^7
1B	2.0×10^8
2	6.3×10^6
3	7.1×10^5
4	2.5×10^8
5	8.2×10^3
6	2.6×10^6
7	5.1×10^7
10	1.9×10^7
11	7.2×10^8
12	1.6×10^7
15	1.3×10^6
17	6.3×10^{10}

ตาราง 2 (ต่อ) ปริมาณไวรัสเริ่มต้นของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และ ไวรัสตัวอย่างจำนวน 32 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณไวรัส (PFU/ml)
18	2.6×10^9
19	3.3×10^8
20	1.1×10^9
22	5.4×10^9
23	1.5×10^{10}
24	1.6×10^{10}
25	4.1×10^9
26	4.1×10^9
27	1.4×10^7
28	4.3×10^7
29	1.3×10^7
30	1.3×10^7
31	5.1×10^9
32	5.5×10^7
33	2.4×10^7
34	1.3×10^9
35	7.0×10^9
39	6.0×10^6
41	5.7×10^5



ภาพ 14 Plaque ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F (a) และ ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A (b), 1B (c), 5 (d), 11 (e), 12 (f), 19 (g), 22 (h), 25 (i) และ 31 (j)

2. การทดสอบยาด้านไวรัส Acyclovir ในการยับยั้งเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1 และเชื้อไวรัสตัวอย่าง โดยวิธี Plaque Reduction Assay

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และไวรัสตัวอย่างจำนวน 32 ตัวอย่าง จากนั้นจึงทำการทดสอบยาด้านไวรัส Acyclovir (ACV) ความเข้มข้น 0-50 $\mu\text{g/ml}$ ในการยับยั้งเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และเชื้อไวรัสตัวอย่าง จำนวน 32 ตัวอย่าง โดยวิธี Plaque Reduction Assay และคำนวณหาความเข้มข้นของยา ACV ที่ยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 50% (Inhibitory concentration, IC_{50}) พบว่ามีไวรัสตัวอย่าง จำนวน 23 ตัวอย่าง คือหมายเลข 2, 3, 4, 6, 7, 10, 15, 17, 18, 20, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 39 และ 41 มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1-5 $\mu\text{g/ml}$ และไวรัสตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่าง คือหมายเลข 1-A, 1-B, 11, 19 และ 25 มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 5-10 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนไวรัสตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง คือหมายเลข 12, 22 และ 31 มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 10-15 $\mu\text{g/ml}$ และมีไวรัสเพียง 1 ตัวอย่าง คือหมายเลข 5 ที่มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 15-20 $\mu\text{g/ml}$ (ตาราง 3)

ตาราง 3 ความเข้มข้นยาด้านไวรัส (ACV) ในการยับยั้งเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และไวรัสตัวอย่างจำนวน 32 ตัวอย่าง ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 50% (Inhibitory concentration, IC_{50})

ลำดับที่	ชนิดของไวรัส	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1	สายพันธุ์มาตรฐาน	1.39
2	สายพันธุ์ที่ 1-A	8.41
3	สายพันธุ์ที่ 1-B	6.14
4	สายพันธุ์ที่ 2	3.33
5	สายพันธุ์ที่ 3	2.90
6	สายพันธุ์ที่ 4	3.07
7	สายพันธุ์ที่ 5	15.39
8	สายพันธุ์ที่ 6	4.09
9	สายพันธุ์ที่ 7	2.96
10	สายพันธุ์ที่ 10	4.19
11	สายพันธุ์ที่ 11	6.74
12	สายพันธุ์ที่ 12	11.98
13	สายพันธุ์ที่ 15	3.33

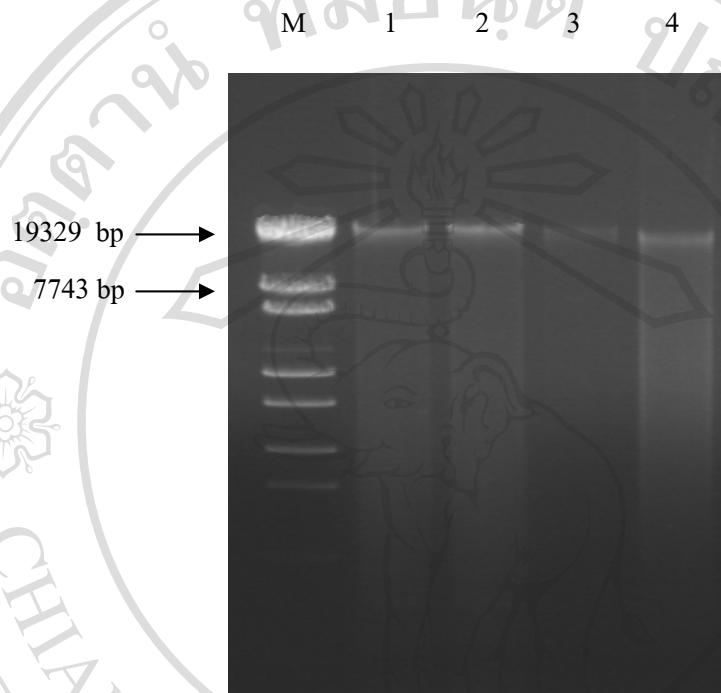
ตาราง 3 (ต่อ) ความเข้มข้นยาต้านไวรัส (ACV) ในการยับยั้งเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และไวรัสตัวอย่างจำนวน 32 ตัวอย่าง ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 50% (Inhibitory concentration, IC_{50})

ลำดับที่	ชนิดของไวรัส	IC_{50} (μ g /ml)
14	สายพันธุ์ที่ 17	3.19
15	สายพันธุ์ที่ 18	1.85
16	สายพันธุ์ที่ 19	7.13
17	สายพันธุ์ที่ 20	3.46
18	สายพันธุ์ที่ 22	11.78
19	สายพันธุ์ที่ 23	4.51
20	สายพันธุ์ที่ 24	1.60
21	สายพันธุ์ที่ 25	7.04
22	สายพันธุ์ที่ 26	4.19
23	สายพันธุ์ที่ 27	2.13
24	สายพันธุ์ที่ 28	1.96
25	สายพันธุ์ที่ 29	2.83
26	สายพันธุ์ที่ 30	3.08
27	สายพันธุ์ที่ 31	11.81
28	สายพันธุ์ที่ 32	1.96
29	สายพันธุ์ที่ 33	4.39
30	สายพันธุ์ที่ 34	3.19
31	สายพันธุ์ที่ 35	3.25
32	สายพันธุ์ที่ 39	2.90
33	สายพันธุ์ที่ 41	3.07

3. ผลการสกัด DNA ของไวรัส HSV จาก infected cell

เมื่อได้ผลค่า IC_{50} ของ ACV ต่อเชื้อไวรัสมาตรฐานและไวรัสตัวอย่างทั้งหมด 32 ตัวอย่าง จึงนำไวรัสตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 5 μ g/ml จำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 1A, 1B, 5, 11, 12, 19, 22, 25 และ 31 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.41, 6.14, 15.39, 6.74, 11.98, 7.13, 11.78, 7.04 และ 11.81

ตามลำดับ มาทำการสกัด DNA ของไวรัส HSV ที่ติดเชื้อใน GMK cells และวิเคราะห์ชิ้น DNA ที่สกัดได้ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่า DNA ของ HSV-1F และไวรัสตัวอย่างมีขนาดใหญ่ (ประมาณ 150 kbp) เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (ภาพ 15)



ภาพ 15 Genomic DNA ของไวรัส HSV-1F (1), 1B (2), 12 (3) และ 22 (4) เปรียบเทียบกับ DNA ขนาดมาตรฐาน 10 kbp (M)

4. การออกแบบ primer เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่บริเวณ DNA polymerase gene ของเชื้อ HSV

หลังจากทำการสกัด DNA ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และ ไวรัสตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} สูง เมื่อเทียบกับไวรัสมาตรฐานแล้ว จึงนำมาทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยได้ออกแบบ primer เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่บริเวณ DNA polymerase gene โดยทำการค้นหาลำดับเบสของ DNA polymerase gene ของ HSV-1 สายพันธุ์ F (accession no. AX 358316) ซึ่งมีขนาด 3708 bp จาก Entrez (National Center for Biotechnology Information, NCBI) และออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อลำดับเบส ซึ่งจะได้ forward primer คือ primer P1, PF5 และ reverse primer คือ primer P2, PR4 (ตาราง 4)

ตาราง 4 primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน DNA polymerase gene ของ HSV-1 ด้วยเทคนิค PCR

Primer	ลำดับเบส (5'-3')	T _m (°C)	ขนาด (bp)
primer P1	ATGCGAAAGCAGATCCGCTCGC	66.0	22
primer P2	GGCTCTATGCAACATTCGACG	62.0	21
primer PF5	CCCGGTTTCATCCTGGACAACCC	65.6	22
primer PR4	GATGGCGGCCTGCTGCTTGTC	67.5	22

โดย primer P1 และ P2 จะจับบริเวณตำแหน่งที่ 2350-2371 และ ตำแหน่งที่ 3670-3690 ของ HSV-1F DNA polymerase gene (ภาพ 16) ซึ่งจะได้ขนาดของชิ้น DNA จากปฏิกิริยา PCR ขนาด 1340 bp ส่วน primer PF5 และ PR4 จะจับที่ตำแหน่ง 902-923 และตำแหน่ง 2409-2430 ของ HSV-1F DNA polymerase gene (ภาพ 17) ซึ่งจะได้ขนาดของชิ้น DNA จากปฏิกิริยา PCR ขนาด 1528 bp และได้ทำการหาสถานะที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ขนาดของ PCR product ที่ถูกต้องและมีปริมาณมากเพียงพอ สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป โดยมีการหาสถานะดังนี้

Primer P1 (2350-2371)

2350 **a tgcgaaagca gatecgtcg** cggattcccc agagcagccc cgaggaggcc
 2401 gtgctcctgg acaagcagca ggccgccatc aaggtcgtgt gtaactcggg ttacgggttc
 2461 acgggagcgc agcacggact cctgccgtgc ctgcacgttg ccgcgacggg gacgaccatc
 2521 ggccgcgaga tgctgctcgc gaccgcgag tacgtccacg cgcgctgggc ggccttcgaa
 2581 cagctcctgg ccgatttccc ggaggcggcc gacatgcgcg ccccgggccc ctattccatg
 2641 cgcacatct acggggacac ggactccatc ttgtgtgt gccgcggcct caggccgcgc
 2701 gggctgacgg ccgtgggcca caagatggcg agccacatct cgcgcgcgt gtttctgtcc
 2761 cccatcaa ac tgcagtgcga aaagacgtt accaagctgc tgctgatgc caaaaaag
 2821 tacatggcg tcatctacgg gggttaagatg ctcatcaagg gcgtggatct ggtgcgcaa
 2881 aacaactgcg cgtttatcaa ccgcacctcc agggccctgg tcgacctgct gttttacgac
 2941 gataccgtat ccggagcggc cggcgcgtta gccgagcgc ccgcagagga gtggttggcg
 3001 cgaccttgc ccgagggact gcaggcgttc ggggcccgtc tcgtagacgc ccatcggcgc
 3061 ataccgacc ccgagaggga catccaggac ttgtctca ccgccgaact gagcagacac
 3121 ccgcgcgctg acaccaaaa gcgcctggcc cactgacgg tgtattaca gctcatggcc
 3181 cggcgcgcgc aggtcccgc catcaaggac cggatccgt acgtgatct ggcccagacc
 3241 ccgcaggtag aggagacggg cgcgcggctg gccgccctcc gcgagctcga cgcgcggcc
 3301 ccaggggacg agcccgcccc cccgcggcc ctgccctccc cggccaagcg ccccgggag
 3361 acgccgtgc atccgaccc cccgggaggc gcgtccaagc cccgcaagct gctggtgtcc
 3421 gagctggccg aggatccgc ataccatt gccacggcg tcgcctgaa cacggactat
 3481 tacttctccc acctgttggg ggccgctgc gtgacattca aggcctgtt tgggaataac
 3541 gccaatca ccgagagtct gtaaaaagg ttattccc aagtgtggca ccccccggac
 3601 gacgtggccg cgcggctccg ggccgcaggg ttggggcggg tgggtgcccg cgtacggcg
 3661 gaggaaactc **gtcgaatgtt gcatagagcc** ttgatactc

Primer P2 (3670-3690)

ภาพ 16 ตำแหน่งการจับของ primer P1 และ P2 บน HSV-1F DNA polymerase gene ที่มีลำดับเบส
 ตั้งแต่ 2350-3690

Primer PF5 (902-923)

901 **accgggttca tcctggacaa ccccgggttc** gtcaccttcg gctgggtaccg tctcaaaccg
 961 ggccggaaca acacgtagc ccagccgcgg gcccgatgg ccttcgggac atccagcgac
 1021 gtcgagtta actgtacggc ggacaacctg gccatcgagg ggggcatgag cgacctaccg
 1081 gcatacaagc tcattgtctt cgatatcgaa tgcaaggcgg ggggggagga cgagctggcc
 1141 ttccgggtgg ccgggcaccc ggaggacctg gtcaccaga taccctgtct gctctacgac
 1201 ctgtccacca ccgcccgtga gcacgtctc ctgttttcgc tcggttcctg cgacctcccc
 1261 gaatcccacc tgaacgagct ggccggccagg ggctgcccc cgcccggtgt tctggaattc
 1321 gacagcgaat tcgagatgct gttggccttc atgacccttg tgaacagta cggccccgag
 1381 ttcgtgaccg ggtacaacat catcaacttc gactggccct tctgtctggc caagctgacg
 1441 gacatttaca aggtcccccct ggacgggtac ggccgcatga acggccgggg cgtgtttcgc
 1501 gtgtgggaca taggccagag ccacttcag aagcgcagca agataaagg gaacggcatg
 1561 gtgaacatcg acatgtacgg gattataacc gacaagatca agctctcgag ctacaagctc
 1621 aacgccgtgg ccgaagccgt cctgaaggac aagaagaagg acctgagcta tcgcgacatc
 1681 ccgcctact acgcccgcgg gcccgcgcaa cgcgggggtga tcggcgagta ctgcatacag
 1741 gattccctgc tgggtggcca gctgttttt aagtttttc cccatctgga gctctcgccc
 1801 gtcgcgcgct tggcgggtat taacatcacc cgcaccatct acgacggcca gcagatccgc
 1861 gcttttacgt gcctgtctgc cctggccgac cagaagggtt ttattctgcc ggacaccag
 1921 gggcgattta ggggcccgcgg ggggggaggcg cccaagcgtc cggccgcagc ccgggaggac
 1981 gaggagcggc cagaggagga ggggggaggac gaggacgaac gcgaggaggg cgggggagcag
 2041 cgggagccgg agggcgccgc ggagaccgcc ggccggcacg tggggtacca gggggccagg
 2101 gtccttgacc ccacttcggg gtttcatgtg aaccccggtg tgggttcga ctttccagc
 2161 ctgtacccca gcatcatcca ggcccacaac ctgtgttca gcacgtctc cctgagggcc
 2221 gacgcagtgg cgcacctgga ggccgggcaag gactacctgg agatcgaggt gggggggcga
 2281 cggtgttct tcgtcaaggc tcacgtcgca gagagcctcc tcagcatcct cctgcgggac
 2341 tggctcgcca tcgaaagca gatccgtcg cggattcccc agagcagccc cgaggaggcc
 2401 gtgctcctgg **acaagcagca ggccgccatc** aaggtcgtgt gtaactcggg ttacgggttc

Primer PR4 (2409-2430)

ภาพ 17 ตำแหน่งของ primer PF5 และ PR4 บน HSV-1F DNA polymerase gene ตั้งแต่ 902-2430

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ DNA polymerase gene ของเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และ เชื้อไวรัสตัวอย่าง

5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ primer P1 และ primer P2

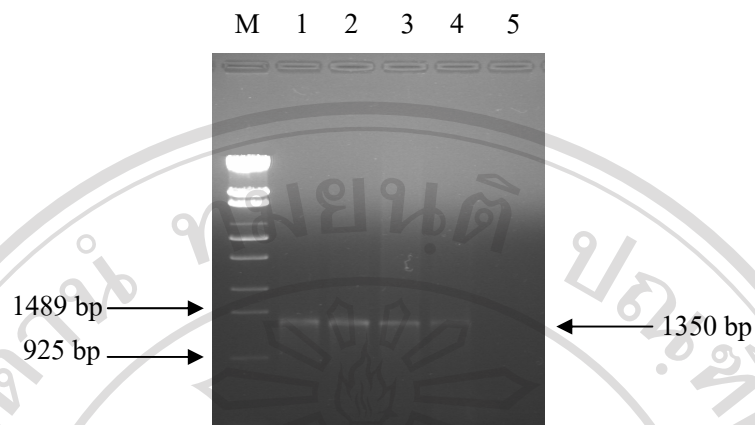
สภาวะที่ 1 สำหรับ *Taq* DNA polymerase (มินิซญา, 2549)

Initial denaturation	95 °C	เป็นเวลา	3	นาที	} 45 รอบ
Denaturation	95 °C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Annealing	60 °C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Extension	72 °C	เป็นเวลา	3	นาที	
Final extension	72 °C	เป็นเวลา	7	นาที	

ปฏิกิริยาประกอบด้วย

Component	Final concentration	Volume/reaction
10X buffer	1X	5.0 μ l
dNTPs	0.2 mM	1.0 μ l
MgCl ₂	1.25 mM	2.5 μ l
Primer P1	0.5 μ M	0.5 μ l
Primer P2	0.5 μ M	0.5 μ l
<i>Taq</i> polymerase	0.05 U/reaction	1.0 μ l
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	-	37.5 μ l
DNA template	-	2.0 μ l
<u>Total volume</u>	-	<u>50.0</u> μ l

ในสภาวะที่ 1 พบว่า PCR product มีขนาด 1340 bp (ภาพ 18) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่ม DNA ที่ DNA polymerase gene ของ HSV-1F ที่ลำดับเบสตั้งแต่ 2350-3690



ภาพ 18 PCR product ของ HSV-1F (1), 1B (2), 12 (3), 22 (4) และ negative control (5) เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (M)

สภาวะที่ 2 สำหรับ *Pfu* DNA polymerase

สภาวะที่ 2.1

Initial denaturation	95 °C	เป็นเวลา	3	นาที	} 45 รอบ
Denaturation	95 °C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Annealing	60 °C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Extension	72 °C	เป็นเวลา	3	นาที	
Final extension	72 °C	เป็นเวลา	7	นาที	

ปฏิกิริยาประกอบด้วย

Component	Final concentration	Volume/reaction
10X <i>Pfu</i> buffer	1X	5.0 μ l
dNTPs	0.2 mM	1.0 μ l
MgSO ₄	2.0 mM	4.0 μ l
Primer P1	0.5 μ M	0.5 μ l
Primer P2	0.5 μ M	0.5 μ l
<i>Pfu</i> DNA polymerase	0.025 U/reaction	0.5 μ l
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	-	36.5 μ l
DNA template	-	2.0 μ l
Total volume	-	50.0 μ l

ในสภาวะที่ 2 เมื่อใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติช่วยรักษาความถูกต้อง (fidelity) เนื่องจากเอนไซม์นี้มี $3' \rightarrow 5'$ exonuclease activity ที่ใช้เพื่อการตรวจสอบ (proofreading) แก้ไขความผิดพลาด และการเกิด mismatched bases เป็นผลให้การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอมีความถูกต้องมากขึ้น ดังนั้น ในสภาวะที่ 2.1 อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing คือ 60°C เช่นเดียวกับเมื่อใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้ 2.0 mM MgSO_4 ซึ่งมากกว่าเมื่อใช้กับ *Taq* DNA polymerase คือ 1.25 mM MgCl_2 และใช้ *Pfu* DNA polymerase 0.025 U เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าไม่สามารถตรวจพบ PCR product ดังนั้น สภาวะที่ 2.1 จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนที่ DNA polymerase gene ของ HSV-1F จึงได้ทำการออกแบบสภาวะที่ 2.2-2.4 (ตาราง 5) ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 2.1

ตาราง 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ *Pfu* DNA polymerase ในสภาวะที่ 2.2, 2.3 และ 2.4

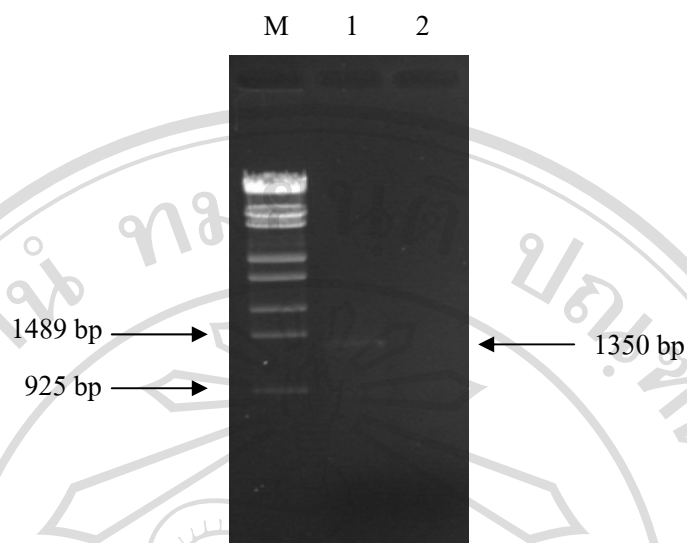
ขั้นตอน	สภาวะที่ 2.2			สภาวะที่ 2.3			สภาวะที่ 2.4		
	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวน รอบ	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวน รอบ	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวน รอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	1	95	3 นาที	1	95	3 นาที	1
Denaturation	95	45 วินาที	45	95	45 วินาที	45	95	45 วินาที	45
Annealing	58	45 วินาที		59	45 วินาที		59.5	45 วินาที	
Extension	72	3 นาที		72	3 นาที		72	3 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1

ในสภาวะที่ 2.2-2.4 เมื่อใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase และทำการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing คือ 58°C , 59°C และ 59.5°C ใช้จำนวนรอบ 45 รอบ ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 2.1 เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าไม่สามารถตรวจพบ PCR product ดังนั้น สภาวะดังกล่าวนี้ จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนที่ DNA polymerase gene ของ HSV-1F จึงได้ทำการออกแบบสภาวะที่ 2.5-2.6 (ตาราง 6) ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 2.1

ตาราง 6 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ *Pfu* DNA polymerase ในสภาวะที่ 2.5 และ 2.6

ขั้นตอน	สภาวะที่ 2.5			สภาวะที่ 2.6		
	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	1	95	3 นาที	1
Denaturation	95	45 วินาที	} 45	95	45 วินาที	} 45
Annealing	60.5	45 วินาที		61	45 วินาที	
Extension	72	3 นาที		72	3 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1

ในสภาวะที่ 2.5-2.6 เมื่อใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase และทำการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing คือ 60.5°C และ 61°C ใช้จำนวนรอบ 45 รอบ ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 2.1 เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing 60.5°C (สภาวะที่ 2.5) ปรากฏ band ของ PCR product ที่มีขนาด 1350 bp แต่มีปริมาณน้อย (ภาพ 19) จึงได้ทำการออกแบบสภาวะที่ 2.7-2.9 (ตาราง 7) ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 2.1

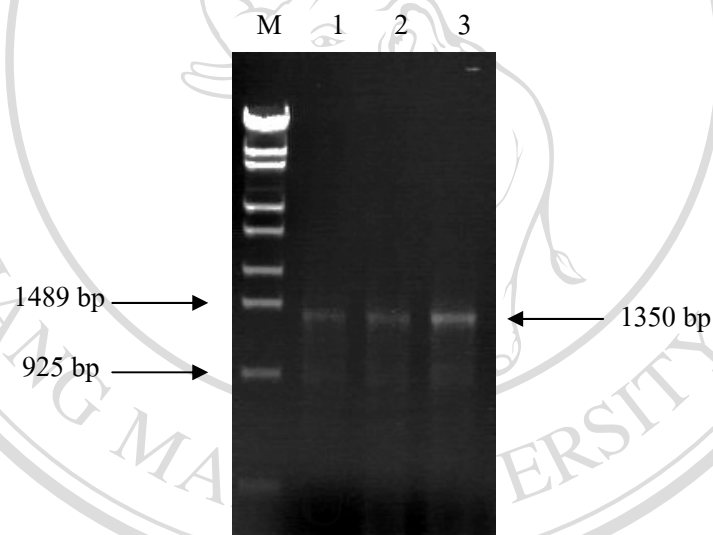


ภาพ 19 PCR product ของHSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 2.5 (1) และPCR product ของHSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 2.6 (2) เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (M)

ตาราง 7 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ *Pfu* DNA polymerase ในสภาวะที่ 2.7, 2.8 และ 2.9

ขั้นตอน	สภาวะที่ 2.7			สภาวะที่ 2.8			สภาวะที่ 2.9		
	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวน รอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวน รอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวน รอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	1	95	3 นาที	1	95	3 นาที	1
Denaturation	95	45 วินาที	45	95	45 วินาที	45	95	45 วินาที	45
Annealing	60.3	45 วินาที		60.5	45 วินาที		60.7	45 วินาที	
Extension	72	3 นาที		72	3 นาที		72	3 นาที	
Final extension	72	12 นาที	1	72	12 นาที	1	72	12 นาที	1

ในสภาวะที่ 2.7-2.9 เมื่อใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase และทำการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing คือ 60.3°C , 60.5°C และ 60.7°C ขั้นตอน final extension คือ 72°C ปรับเวลาเป็น 12 นาที ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 2.1 เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product มีขนาด 1340 bp โดยเฉพาะในสภาวะที่ 2.7 ปรากฏ band ของ PCR product ชัดเจนที่สุด แต่พบว่ามี non-specific band ขนาดเล็ก ซึ่งต้องทำให้แถบดีเอ็นเอบริสุทธิ์ก่อนจะหาลำดับเบส (ภาพ 20) ดังนั้น อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของสภาวะที่ 2.7 จึงเหมาะสมในการเพิ่ม DNA ที่ DNA polymerase ของ HSV-1F ที่ลำดับเบสตั้งแต่ 2350-3690 โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase



ภาพ 20 PCR product ของ HSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 2.8 (1), สภาวะที่ 2.9 (2) และสภาวะที่ (2.7) (3) เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (M)

5.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ primer PF5 และ primer PR4

สภาวะที่ 3 สำหรับ *Taq* DNA polymerase

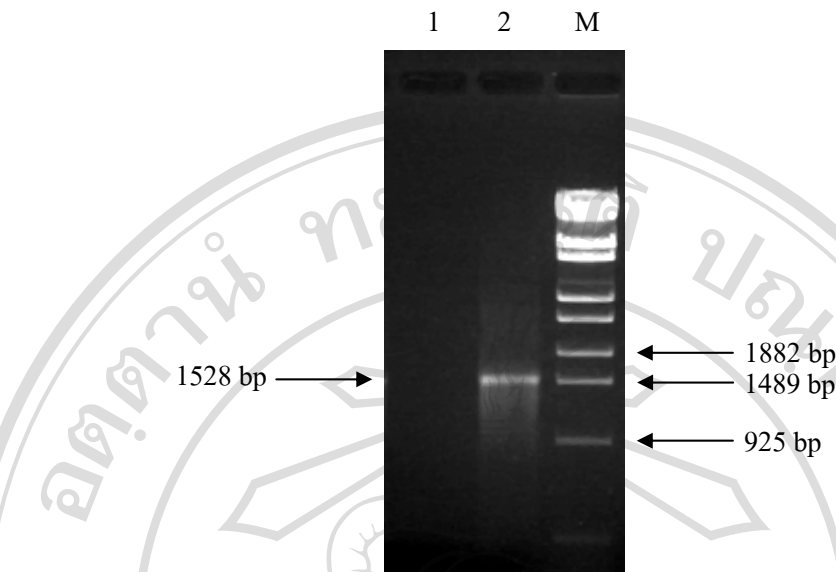
สภาวะที่ 3.1

Initial denaturation	95 °C	เป็นเวลา	3	นาที	} 45 รอบ
Denaturation	95 °C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Annealing	62 °C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Extension	72 °C	เป็นเวลา	3	นาที	
Final extension	72 °C	เป็นเวลา	7	นาที	

ปฏิกิริยาประกอบด้วย

Component	Final concentration	Volume/reaction
10X buffer	1X	5.0 μ l
dNTPs	0.2 mM	1.0 μ l
MgCl ₂	1.25 mM	2.5 μ l
Primer PF5	0.5 μ M	0.5 μ l
Primer PR4	0.5 μ M	0.5 μ l
<i>Taq</i> polymerase	0.05 U/reaction	1.0 μ l
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	-	37.5 μ l
DNA template	-	2.0 μ l
<u>Total volume</u>	-	<u>50.0</u> μ l

ในสภาวะที่ 3.1 เมื่อใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing คือ 62 °C เป็นเวลา 45 วินาที ใช้จำนวนรอบ 45 รอบ ส่วนปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 10X PCR buffer 5 μ l, 1.25 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, template 2 μ l, 0.5 μ M primer PF5, 0.5 μ M primer PR4 และ 0.05 U *Taq* DNA polymerase 1 μ l เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product มีขนาด 1528 bp แต่มีปริมาณน้อย และยังมี non-specific band (ภาพ 21) ดังนั้น จึงได้ทำการออกแบบสภาวะที่ 3.2-3.4 (ตาราง 8) ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 3.1



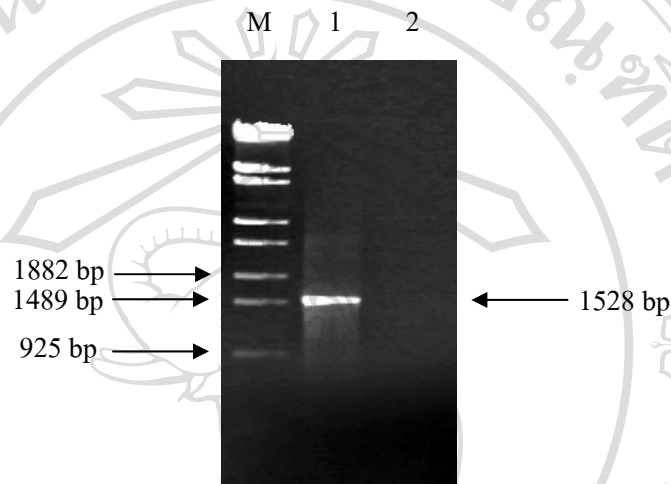
ภาพ 21 PCR product ของ HSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 3.1 (2) และ negative control (1) เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (M)

ตาราง 8 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ *Taq* DNA polymerase ในสภาวะที่ 3.2, 3.3 และ 3.4

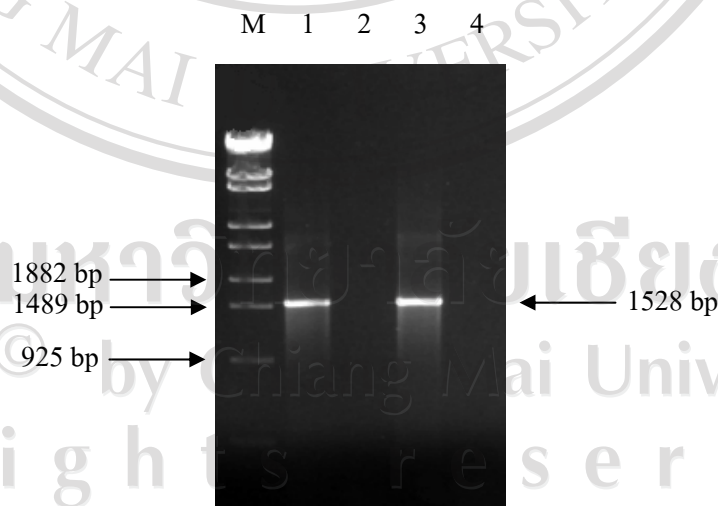
ขั้นตอน	สภาวะที่ 3.2			สภาวะที่ 3.3			สภาวะที่ 3.4		
	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวน รอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวน รอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวน รอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	1	95	3 นาที	1	95	3 นาที	1
Denaturation	95	45 วินาที	45	95	45 วินาที	45	95	45 วินาที	45
Annealing	63	45 วินาที		63.5	45 วินาที		64	45 วินาที	
Extension	72	3 นาที		72	3 นาที		72	3 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1

เมื่อทำการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing คือ 63°C, 63.5°C และ 64°C ในสภาวะที่ 3.2-3.4 และใช้จำนวนรอบ 45 รอบ ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 3.1 เมื่อวิเคราะห์

ผลที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product มีขนาด 1528 bp โดยในสภาวะที่ 3.2 ปรากฏ band ของ PCR product ชัดเจนที่สุด (ภาพ 22) ส่วนสภาวะที่ 3.3 และ 3.4 นั้น พบ band ขนาด 1528 bp แต่มี non-specific band อยู่ด้วย (ภาพ 23) ดังนั้น อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของ สภาวะที่ 3.2 จึงเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ DNA polymerase ของ HSV-1F ลำดับ เบสตั้งแต่ 902-2430



ภาพ 22 PCR product ของ HSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 3.2 (1) และ negative control (2) เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (M)



ภาพ 23 PCR product ของ HSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 3.3 (1), negative control (2), สภาวะที่ 3.4 (3), negative control (4) เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (M)

สภาวะที่ 4 สำหรับ *Pfu* DNA polymerase

สภาวะที่ 4.1

Initial denaturation	95 °C	เป็นเวลา	3	นาที	} 45 รอบ
Denaturation	95 °C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Annealing	63 °C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Extension	72 °C	เป็นเวลา	3	นาที	
Final extension	72 °C	เป็นเวลา	7	นาที	

ปฏิกิริยาประกอบด้วย

<u>Component</u>	<u>Final concentration</u>	<u>Volume/reaction</u>
10X <i>Pfu</i> buffer	1X	5.0 µl
dNTPs	0.2 mM	1.0 µl
MgSO ₄	2.0 mM	4.0 µl
Primer PF5	0.5 µM	0.5 µl
Primer PR4	0.5 µM	0.5 µl
<i>Pfu</i> DNA polymerase	0.05 U/reaction	1.0 µl
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	-	36.0 µl
DNA template	-	2.0 µl
<u>Total volume</u>	-	<u>50.0</u> µl

ในสภาวะที่ 4 เมื่อใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติ 3' → 5' exonuclease activity เพื่อให้การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอมีความถูกต้องมากขึ้น ดังนั้น ในสภาวะที่ 4.1 อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing คือ 63 °C ใช้จำนวนรอบ 45 รอบ ส่วนปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 10X *Pfu* buffer 5 µl, 2.0 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTPs, template 2 µl, 0.5 µM primer PF5, 0.5 µM primer PR4 และ 0.05 U *Pfu* DNA polymerase 1 µl เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าไม่สามารถตรวจพบ PCR product ดังนั้น สภาวะที่ 4.1 จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนที่ DNA polymerase gene ของ HSV-1F จึงได้ทำการออกแบบสภาวะที่ 4.2 และ 4.3 (ตาราง 9) ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 4.1

ตาราง 9 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ *Pfu* DNA polymerase ในสภาวะที่ 4.2 และ 4.3

ขั้นตอน	สภาวะที่ 4.2			สภาวะที่ 4.3		
	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	1	95	3 นาที	1
Denaturation	95	45 วินาที	45	95	45 วินาที	45
Annealing	62	45 วินาที		62.5	45 วินาที	
Extension	72	3 นาที		72	3 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1

ในสภาวะที่ 4.2 และ 4.3 เมื่อใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase ปรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing คือ 62°C และ 62.5°C ใช้จำนวนรอบ 45 รอบ ส่วนปฏิกิริยา PCR ใช้เช่นเดียวกับสภาวะที่ 4.1 เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าปรากฏ band ขนาด 1528 bp อย่างชัดเจน แต่มี band ของ non-specific อยู่ด้วย (ภาพ 24) จึงได้ทำการออกแบบสภาวะที่ 4.4 ดังนี้

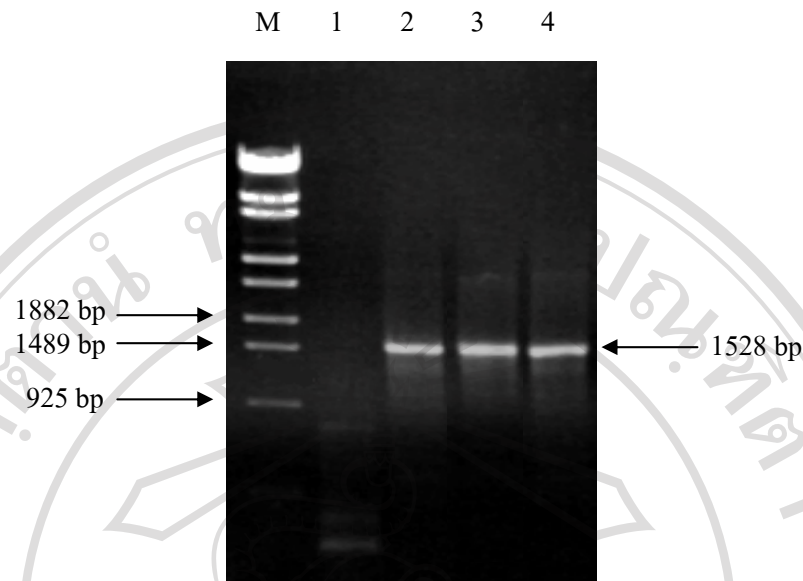
สภาวะที่ 4.4

Initial denaturation	95°C	เป็นเวลา	3	นาที	} 45 รอบ
Denaturation	95°C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Annealing	62.5°C	เป็นเวลา	45	วินาที	
Extension	72°C	เป็นเวลา	3	นาที	
Final extension	72°C	เป็นเวลา	7	นาที	

ปฏิกิริยาประกอบด้วย

<u>Component</u>	<u>Final concentration</u>	<u>Volume/reaction</u>
10X <i>Pfu</i> buffer	1X	5.0 μ l
dNTPs	0.2 mM	1.0 μ l
MgSO ₄	2.0 mM	4.0 μ l
Primer PF5	0.5 μ M	0.5 μ l
Primer PR4	0.5 μ M	0.5 μ l
<i>Pfu</i> DNA polymerase	0.025 U/reaction	0.5 μ l
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	-	36.5 μ l
DNA template	-	2.0 μ l
<u>Total volume</u>	-	<u>50.0</u> μ l

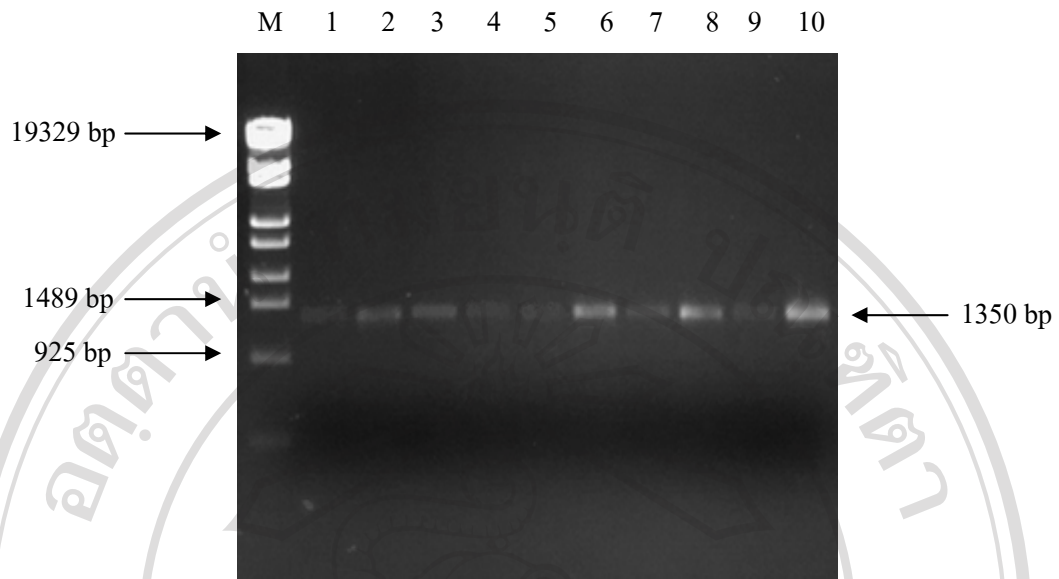
ในสภาวะที่ 4.4 ทำเช่นเดียวกับสภาวะที่ 4.3 และลดปริมาณเอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase (0.025 U) 0.5 μ l เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าปรากฏ band ขนาด 1528 bp อย่างชัดเจน และมี band ของ non-specific อยู่เล็กน้อย (ภาพ 24) ดังนั้น ปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของสภาวะที่ 4.4 จึงเหมาะสมในการเพิ่ม DNA ที่ DNA polymerase ของ HSV-1F ที่ลำดับเบสตั้งแต่ 902-2430 โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase



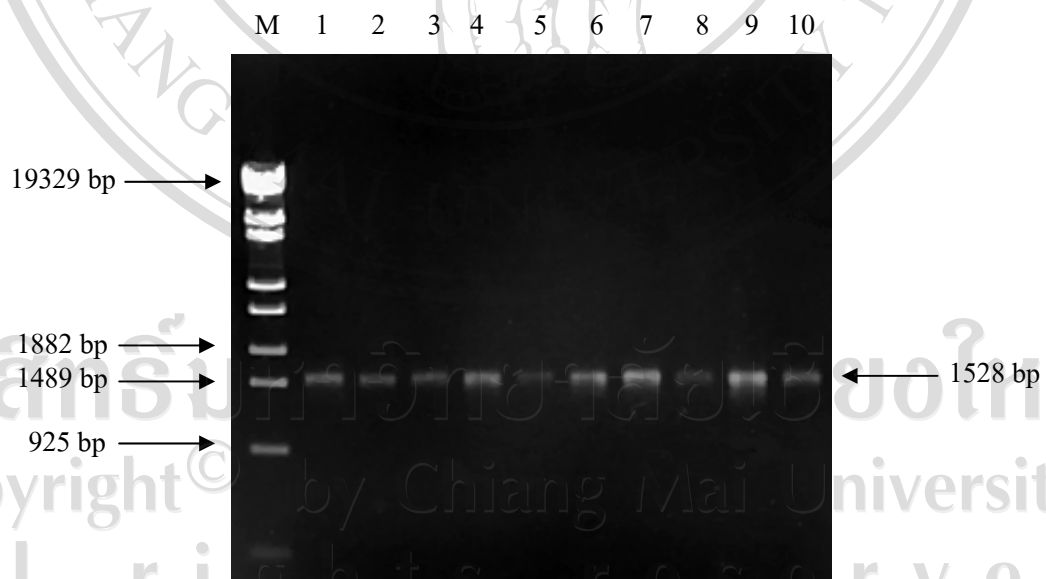
ภาพ 24 PCR product ของ HSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 4.1 (1), สภาวะที่ 4.2 (2), สภาวะที่ 4.3 (3) และสภาวะที่ 4.4 (4) เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (M)

6. ผลการสกัดชิ้นส่วน PCR product ให้บริสุทธิ์

หลังจากได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ และทำการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ DNA polymerase gene ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และไวรัสตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 5 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 9 ตัวอย่าง คือ 1A, 1B, 5, 11, 12, 19, 22, 25 และ 31 พบว่าในการทำ PCR โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase ซึ่งให้ผล PCR product ที่มีความถูกต้องสูง แต่การปรับหาสภาวะที่เหมาะสม ยังคงมี band ของ non-specific product อยู่ด้วย ดังนั้นจึงได้ทำการสกัดชิ้นส่วน DNA (PCR product) ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, UK) (รายละเอียดของวิธีสกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ง) (ภาพ 25, 26)



ภาพ 25 PCR product ขนาด 1350 bp (ลำดับเบสตั้งแต่ 2350-3690) ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F (1), ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A (2), 1B (3), 5 (4), 11 (5), 12 (6), 19 (7), 22 (8), 25 (9) และ 31 (10) หลังจากสัคคให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (M)



ภาพ 26 PCR product ขนาด 1528 bp (ลำดับเบสตั้งแต่ 902-2430) ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F (1), ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A (2), 1B (3), 5 (4), 11 (5), 12 (6), 19 (7), 22 (8), 25 (9) และ 31 (10) หลังจากสัคคให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp (M)

7. การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัส HSV-1 ที่มีค่า IC_{50} สูง เพื่อหาความสัมพันธ์กับการดื้อยา acyclovir

เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 5 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 9 ตัวอย่างคือ 1A, 1B, 5, 11, 12, 19, 22, 25 และ 31 โดยไวรัสตัวอย่างแต่ละหมายเลขจะได้ผล PCR product 2 ชิ้น คือ ขนาด 1528 bp เมื่อใช้ primer PF5 และ primer PR4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 902-2430 ซึ่งเป็นส่วนเริ่มต้นของยีน DNA polymerase ของไวรัส HSV-1 ส่วนที่ 2 คือ ขนาด 1340 bp โดยใช้ primer P1 และ primer P2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2350-3690 ซึ่งเป็นส่วนท้ายของยีน DNA polymerase นำผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F (accession no. AX358316) (Tatusova and Madden, 1999) เพื่อตรวจสอบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน และสัมพันธ์กับการดื้อยา acyclovir

7.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 2065-3291 ที่ได้จาก primer PR4, P1 และ P2 (overlap) กับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F

7.1.1 ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A, 1B, 12, 22 และ 31 พบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ DNA polymerase gene ที่ตรงกันทั้ง 5 ตัวอย่าง คือ บริเวณตำแหน่งที่ 2127 (T→C), 2451 (T→G), 2468 (C→T), 2670 (C→A), 2713 (G→A), 2758 (T→C) และ 3288 (C→A) และมีผลการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ T ในตำแหน่งที่ 2375 (ภาพ 27)

7.1.2 ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 19 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ คือ บริเวณตำแหน่งที่ 2127 (T→C), 2451 (T→G), 2468 (C→T), 2670 (C→A), 2713 (G→A), 2758 (T→C), 2863 (G→T), 2866 (G→T) และ 3288 (C→A) และมีการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ T ในตำแหน่งที่ 2375 (ภาพ 28)

7.1.3 ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 25 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ คือ บริเวณตำแหน่งที่ 2127 (T→C), 2451 (T→G), 2468 (C→T), 2670 (C→A), 2713 (G→A), 2758 (T→C), 2865 (G→T), 2885 (A→T), 2904 (C→T) และ 3288 (C→A) และมีการขาดหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ T ในตำแหน่งที่ 2375 (ภาพ 29)

ลำดับเบสจาก primer PR4, P1 และ P2 (overlap)

2065 accgcc ggccggcacg tggggtacca gggggccagg
 2101 gtcttgacc ccacttcggg gttcacgtg aaccccgagg tgggttcga cttgccagc
 2161 ctgtaccca gcatcatcca ggcccacaac ctgtgctca gcacgcttc cctgagggcc
 2221 gacgcagtgg cgcacctgga ggccgggcaag gactacctgg agatcgagg gggggggcga
 2281 cggctgttct tcgtcaaggc tcacgtgcga gagagcctcc tcagcatcct cctgcgggac
 2341 tggctcgcca tgcgaaagca gatccgctcg cgga_tcccc agagcagccc cgaggaggcc
 2401 gtgctcctgg acaagcagca ggccggccatc aaggctcgtg gtaactcggg gtacgggttc
 2461 acgggagtg agcacggact cctgccgtgc ctgcacgtg ccgcgacggt gacgaccatc
 2521 ggccgcgaga tgctgctcgc gacccgcgag tacgtccacg cgcgctgggc ggccttcgaa
 2581 cagctcctgg ccgatttccc ggagggggcc gacatgcgcg cccccgggccc ctattccatg
 2641 cgcacatct acgggggacac ggactccata tttgtgctg gccgcggcct cacggccgcc
 2701 gggctgacgg ccattgggcca caagatggcg agccacatct cgcgcgcgt gtttctgcc
 2761 cccatcaaac tcgagtgcga aaagacgttc accaagctgc tgctgatgc caagaaaaag
 2821 tacatcgcg tcattacgg gggtaaagtg ctcacaaagg gcgtggatct ggtgcgcaa
 2881 aacaactcg cgtttatcaa ccgcacctcc agggccctgg tcgactgct gttttacag
 2941 gataccgtat ccggagcggc gcgccggtta gccgagcggc ccgcagagga gtggctggcg
 3001 cgacccctgc ccgagggact gcagggcgtt gggggcctcc tcgtagacgc ccatcgcgcg
 3061 atcaccgacc cggagaggga catccaggac tttgtctca ccgccgaact gagcagacac
 3121 ccgcgcgcgt acaccaacaa gcgcctggcc cacctgacgg tgtattacaa gctcatggcc
 3181 ccgcgcgcgc aggtcccgtc catcaaggac cggatcccg acgtgatgt ggcccagacc
 3241 cgcgaggtag aggagacggt cgcgcggctg gccgccctcc gcgagctaga c

ภาพ 27 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 1A, 1B, 12, 22 และ 31 อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2127, 2451, 2468, 2670, 2713, 2758 และ 3288 และช่องว่างที่ขีดเส้นใต้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2375

ลำดับเบสจาก primer PR4, P1 และ P2 (overlap)

2065 accgcc ggccggcacg tggggtacca gggggccagg
 2101 gtcttgacc ccacttcggg gttcacgtg aaccccgagg tgggttcga cttgccagc
 2161 ctgtaccca gcatcatcca ggcccacaac ctgtgctca gcacgtctc cctgagggcc
 2221 gacgcagtgg cgcacctgga ggccggcaag gactacctgg agatcgagg gggggggcga
 2281 cggctgttct tcgtcaaggc tcacgtgcga gagagcctcc tcagcatcct cctgcgggac
 2341 tggctcgcca tgcgaaagca gatccgctcg cgga_tcccc agagcagccc cgaggaggcc
 2401 gtgctcctgg acaagcagca ggccgccatc aaggctcgtg gtaactcggg gtacgggttc
 2461 acgggagtg agcacggact cctgccgtgc ctgcacgtg ccgcgacggg gacgaccatc
 2521 ggccgcgaga tgctgctcgc gacccgcgag tacgtccacg cgcgctgggc ggccttcgaa
 2581 cagctcctgg ccgatttccc ggaggcggcc gacatgcgcg cccccgggcc ctattccatg
 2641 cgcacatct acggggacac ggactccata tttgtgctg gccgcggcct cacggccgcc
 2701 gggctgacgg ccattgggca caagatggcg agccacatct cgcgcgcgt gtttctgcc
 2761 cccatcaaac tcgagtgcga aaagacgttc accaagctgc tgctgatgc caagaaaaag
 2821 tacatggcg tcattacgg gggttaagatg ctcatcaagg gcttctatct ggtgcgcaa
 2881 acaactgcg cgtttatcaa ccgcacctcc agggccctgg tcgacctgt gttttacag
 2941 gataccgat ccggagcggc gcgcgcgta gccgagcgc ccgcagagga gtggctggcg
 3001 cgaccctgc ccgagggact gcaggcgttc ggggcccgtc tcgtagacgc ccatggcgcg
 3061 ataccgacc cggagaggga catccaggac tttgtctca ccgccgaact gagcagacac
 3121 ccgcgcgctg acaccaaaa gcgcctggcc cacctgacgg tgtattaca gctcatggcc
 3181 gcgcgcgcg aggtccgtc catcaaggac cggatccgt acgtgatgt ggcccagacc
 3241 cgcgaggtag aggagacggc gcgcggctg gccgcctcc gcgagctaga c

ภาพ 28 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 19 อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2127, 2451, 2468, 2670, 2713, 2758, 2863, 2866 และ 3288 และช่องว่างที่ขีดเส้นใต้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2375

ลำดับเบสจาก primer PR4, P1 และ P2 (overlap)

2065 accgcc ggccggcacg tggggtacca gggggccagg
 2101 gtcttgacc ccacttcggg gttcacgtg aaccccgagg tgggttcga ctttgccagc
 2161 ctgtacccca gcatcatcca ggcccacaac ctgtgctca gcacgcttc cctgagggcc
 2221 gacgcagtgg cgcacctgga ggccgggcaag gactacctgg agatcgagg gggggggcga
 2281 cggctgttct tcgtcaaggc tcacgtgcga gagagcctcc tcagcatcct cctgcgggac
 2341 tggctcgcca tgcgaaagca gatccgctcg cgga_tcccc agagcagccc cgaggaggcc
 2401 gtgctcctgg acaagcagca ggccgccatc aaggctcgtg gtaactcggg gtacgggttc
 2461 acgggagtg agcacggact cctgccgtgc ctgcacgtg ccgcgacggg gacgaccatc
 2521 ggccgcgaga tgctgctcgc gacccgcgag tacgtccacg cgcgctgggc ggccttcgaa
 2581 cagtcctgg ccgattccc ggaggcggcc gacatgcgcg cccccgggcc ctattccatg
 2641 cgcacatct acggggacac ggactccata tttgtgctg gccgcggcct cacggccgcc
 2701 gggctgacgg ccattgggca caagatggcg agccacatct cgcgcgcgt gtttctgcc
 2761 cccatcaaac tcgagtgcga aaagacgttc accaagctgc tgctgatgc caagaaaaag
 2821 tacatggcg tcattacgg gggtaaagtg ctcacaaagg gcgttgatct ggtgcgcaaa
 2881 aacatctgcg cgtttatcaa ccgtacctc agggccctgg tcgacctgct gttttacga
 2941 gataccgtat ccggagcggc gccgcgtta gccgagcgc ccgcagagga gtggctggcg
 3001 cgaccctgc ccgagggact gcaggcggtc gggggcgctc tcgtagacgc ccatcggcgc
 3061 atcaccgacc cggagaggga catccaggac tttgtctca ccgccgaact gagcagacac
 3121 ccgcgcgcgt acaccaaaa gcgcctggcc cacctgacgg tgtattaca gctcatggcc
 3181 gccgcgcgc aggtcccgtc catcaaggac cggatccgt acgtgatct gggccagacc
 3241 cgcgaggtag aggagacggg cgcgcggctg gccgcctcc gcgagctaga c

ภาพ 29 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 25 อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2127, 2451, 2468, 2670, 2713, 2758, 2865, 2885, 2904 และ 3288 และช่องว่างที่ขีดเส้นใต้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2375

7.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 2398-3291 ที่ได้จาก primer P1, P2 (overlap) กับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F

ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 11 พบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ DNA polymerase gene คือบริเวณตำแหน่งที่ 2451 (T→G), 2468 (C→T), 2670 (C→A), 2713 (G→A), 2758 (T→C), 3272 (C→G) และ 3288 (C→A) ส่วนผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก primer PR4 คือตำแหน่งที่ 2065-2390 ให้ผลการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่งคือ บริเวณตำแหน่งที่ 2127 (T→C), 2278 (C→G) และพบการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ T ในตำแหน่งที่ 2375 (ภาพ 30)

ลำดับเบสจาก primer PR4

2065 accgcc ggccggcacg tggggtacca gggggccagg
 2101 gtccctgacc ccacttcggt gtttcacgtg aaccccgtgg tgggtgtcga ctttgccagc
 2161 ctgtaccca gcatcatcca ggcccacaac ctgtgttca gcacgtctc cctgagggcc
 2221 gacgcagtgg cgcacctgga ggccgggcaag gactacctgg agatcgaggt ggggggggga
 2281 cggtgtttct tcgtcaaggc tcacgtgcga gagagcctcc tcagcatcct cctgcgggac
 2341 tggctcgcca tgcgaaagca gatccgctcg cgga_tcccc agagcagccc

ลำดับเบสจาก primer P1, P2 (overlap)

2398 gcc gtgctcctgg acaagcagca ggccgccatc aaggtcgtgt gtaactcgtt gtacgggttc
 2461 acgggaggtgc agcacggact cctgccgtgc ctgcacgttg ccgcgacggt gacgaccatc
 2521 ggccgcgaga tctgtctcgc gaccgcgcgag tacgtccacg cgcgctgggc ggcttcgaa
 2581 cagctcctgg ccgatttccc ggaggcggcc gacatgcgcg cccccgggcc ctattccatg
 2641 cgcatcatct acggggacac ggactccata tttgtgtgt gccgcggcct cacggccgcc
 2701 gggctgacgg ccattgggca caagatggcg agccacatct cgcgcgcgct gtttctgcc
 2761 cccatcaaac tcgagtgcga aaagacgttc accaagctgc tgcgtatcgc caagaaaaag
 2821 tacatcggcg tcattacgg gggtaatag ctcatcaagg gcgtggatct ggtgcgcaaa
 2881 aacaactgcg cgtttatcaa ccgcacctcc agggccctgg tcgacctgct gttttacgac
 2941 gataccgtat ccggagcggc cgccgcgtta gccgagcgcc ccgcagagga gtggctggcg
 3001 cgaccctgc ccgagggact gcaggcgttc ggggcccgtc tctagacgc ccatggcgcc
 3061 atcaccgacc cggagaggga catccaggac ttgtcctca ccgccgaact gagcagacac
 3121 ccgcgcgcgt acaccaaaa gcgcctggcc cactgacgg tgtattacaa gctcatggcc
 3181 cgccgcgcgc aggtcccgtc catcaaggac cggatcccgt acgtgatcgt ggcccagacc
 3241 cgcgaggtag aggagacggt cgcgcggctg ggcgcctcc gcgagctaga c

ภาพ 30 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 11 อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2127, 2278, 2451, 2468, 2670, 2713, 2758, 3272 และ 3288 และช่องว่างที่ขีดเส้นใต้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2375

7.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ช่วงตำแหน่งที่ 938-1609 ที่ได้จาก primer PF5 ของไวรัสตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง กับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F

7.3.1 ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A, 1B, 22, 25 และ 31 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ DNA polymerase gene ที่ตรงกันทั้ง 5 ตัวอย่าง คือ บริเวณตำแหน่งที่ 957 มีการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ A และมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 1173 (C→T), 1176 (C→T) และ 1584 (T→C) (ภาพ 31)

7.3.2 ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 11 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 1173 (C→T), 1176 (C→T) และ 1584 (T→C) และบริเวณตำแหน่งที่ 1525 มีการเพิ่มของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ T (ภาพ 32)

7.3.3 ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 19 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง คือ ในตำแหน่งที่ 1173 (C→T), 1176 (C→T) และ 1584 (T→C) (ภาพ 33)

ลำดับเบสจาก primer PF5

938 tcg gctgggtaccg tctcaa_ccg
 961 ggccgggaaca acacgctagc ccagccgcgg gccccgatgg ccttcggggac atccagcgac
 1021 gtcgagtta actgtacggc ggacaacctg gccatcgagg gggggcatgag cgacctaccg
 1081 gcatacaagc tcatgtgctt cgatatcgaa tgcaaggcgg gggggggagga cgagctggcc
 1141 ttccgggtgg ccgggcaccc ggaggacctg gttattcaga taccctgtct gctctacgac
 1201 ctgtccacca ccgccctgga gcacgtctc ctgttttcgc tcggttcctg cgacctccc
 1261 gaatcccacc tgaacgagct ggccggccagg ggccctgcca cgcccggtgt tctggaattc
 1321 gacagcgaat tcgagatgct gttggccttc atgacccttg tgaacagta cggccccgag
 1381 ttcgtgaccg ggtacaacat catcaacttc gactggccct tcttgctggc caagctgacg
 1441 gacatttaca aggtccccct ggacgggtac ggccgcatga acggccgggg cgtgtttcgc
 1501 gtgtgggaca taggccagag ccacttcag aagcgagca agataaaggt gaacggcatg
 1561 gtgaacatcg acatgtacgg gatcataacc gacaagatca agct

ภาพ 31 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 1A, 1B, 22, 25 และ 31 อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1173, 1176 และ 1584 และช่องว่างที่ขีดเส้นใต้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 957

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

ลำดับเบสจาก primer PF5

938 tcg gctggtaccg tctcaaacg
 961 ggccggaaca acacgctagc ccagccgcgg gccccgatgg ccttcgggac atccagcgac
 1021 gtcgagttta actgtacggc ggacaacctg gccatcgagg ggggcatgag cgacctaccg
 1081 gcatacaagc tcatgtgctt cgatacgaa tgcaaggcgg gggggggaggga cgagctggcc
 1141 ttccgggtgg ccgggcaccc ggaggacctg gttattcaga tatcctgtct gctctacgac
 1201 ctgtccacca ccgccctgga gcacgtctc ctgttttcgc tcggttctg cgacctcccc
 1261 gaatcccacc tgaacgagct ggccggccagg ggccctgcca cggccgtggt tctggaattc
 1321 gacagcgaat tcgagatgct gttggccttc atgacccttg tgaacagta cggccccgag
 1381 ttcgtgaccg ggtacaacat catcaacttc gactggccct tcttgctggc caagctgacg
 1441 gacatttaca aggtccccct ggacgggtac ggccgcatga acggccgggg cgtgtttcgc
 1501 gtgtgggaca taggccagag ccactttccag aagcgcagca agataaaggt gaacggcatg
 1561 gtgaacatcg acatgtacgg gatcataacc gacaagatca agct

ภาพ 32 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 11 อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1173, 1176, 1584 และอักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1525

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

ลำดับเบสจาก primer PF5

936 cttcg gctggtaccg tctcaaaccg
 961 ggccggaaca acacgctagc ccagccgcgg gccccgatgg ccttcgggac atccagcgac
 1021 gtcgagtta actgtacggc ggacaacctg gccatcgagg ggggcatgag cgacctaccg
 1081 gcatacaagc tcatgtgctt cgatategaa tgcaaggcgg ggggggagga cgagctggcc
 1141 ttccgggtgg ccgggcaccc ggaggacctg gttattcaga taccctgtct gctctacgac
 1201 ctgtccacca ccgccctgga gcacgtctc ctgttttcgc tcggttcctg cgacctcccc
 1261 gaatcccacc tgaacgagct ggccggccagg ggcccgcca cgcccggtgt tctggaattc
 1321 gacagcgaat tcgagatgct gttggccttc atgacccttg tgaacagta cggccccgag
 1381 ttcgtgaccg ggtacaacat catcaattc gactggccct tctgtctggc caagctgacg
 1441 gacattaca aggtccccct ggacgggtac ggccgcatga acggccgggg cgtgtttcgc
 1501 gtgtgggaca taggccagag ccacttcag aagcgagca agataaaggt gaacggcatg
 1561 gtgaacatcg acatgtacgg gatcataacc gacaagatca agct

ภาพ 33 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 19 อักษรตัวหนาที่ขีด
 เส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1173, 1176 และ
 1584

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

7.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ช่วงตำแหน่งที่ 938-1561 ที่ได้จาก primer PF5 กับ ไวรัสมาตรฐาน HSV-1F

ในไวรัสตัวอย่างหมายเลข 12 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่ง คือบริเวณตำแหน่งที่ 949 และ 957 มีการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ C และ A ตามลำดับ และในตำแหน่งที่ 1173 (C→T) และ 1176 (C→T) (ภาพ 34)

ลำดับเบสจาก primer PF5

938 tcg gctggtac_g tctcaa_ccg
961 ggccggaaca acacgctagc ccagccgcgg gccccgatgg ccttcgggac atccagcgac
1021 gtcgagtta actgtacggc ggacaacctg gccatcgagg ggggcatgag cgacctaccg
1081 gcatacaagc tcattgtgctt cgatatcgaa tgcaaggcgg ggggggagga cgagctggcc
1141 ttccggtgg ccgggcaccc ggaggacctg gttattcaga tatcctgtct gctctacgac
1201 ctgtccacca ccgccctgga gcacgtctc ctgttttcgc tcggttcctg cgacctcccc
1261 gaatcccacc tgaacgagct ggcggccagg ggcctgccca cgcccgtggt tctggaattc
1321 gacagcgaat tcgagatgct gttggccttc atgaccttg tgaacagta cggccccgag
1381 ttcgtgaccg ggtacaacat catcaacttc gactggccct tcttgctggc caagctgacg
1441 gacatttaca aggtccccct ggacgggtac ggccgcatga acggccgggg cgtgtttcgc
1501 gtgtgggaca taggccagag ccactccag aagcgagca agataaaggt gaacggcatg
1561 g

ภาพ 34 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 12 อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1173 และ 1176 และช่องว่างที่ขีดเส้นใต้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 949 และ 957

7.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตัวอย่างหมายเลข 5 กับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F

7.5.1 ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 5 มีผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 938-1813 ที่ได้จาก primer PF5 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่ง คือบริเวณตำแหน่งที่ 949 และ 957 มีการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ C และ A และในตำแหน่งที่ 1173 (C→T), 1176 (C→T) และ 1584 (T→C) (ภาพ 35)

7.5.2 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงตำแหน่งที่ 2065-2394 ที่ได้จาก primer PR4 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่งคือ ในตำแหน่งที่ 2127 เปลี่ยน (T→C) และมีผลการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ T ในตำแหน่งที่ 2375 (ภาพ 35)

7.5.3 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงตำแหน่งที่ 2398-2930 ที่ได้จาก primer P1 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่งคือ บริเวณตำแหน่งที่ 2451 (T→G), 2468 (C→T), 2670 (C→A), 2713 (G→A), 2758 (T→C) (ภาพ 36)

7.5.4 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงตำแหน่งที่ 2985-3291 ที่ได้จาก primer P2 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์คือ บริเวณตำแหน่งที่ 3288 (C→A) และบริเวณตำแหน่งที่ 3008 มีการเพิ่มของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ C (ภาพ 36)

ลำดับเบสจาก primer PF5

938 tcg gctggtac_g tctcaa_ccg
 961 ggccggaaca acacgctagc ccagccgcgg gccccgatgg ccttcgggac atccagcgac
 1021 gtcgagttta actgtacggc ggacaacctg gccatcgagg ggggcatgag cgacctaccg
 1081 gcatacaagc tcattgtctt cgatacgaa tgcaaggcgg gggggggaggga cgagctggcc
 1141 ttccgggtgg ccgggcaccc ggaggacctg gttattcaga tatcctgtct gctctacgac
 1201 ctgtccacca ccgccctgga gcacgtctc ctgttttgc tcggttctg cgacctcccc
 1261 gaatcccacc tgaacgagct ggccggccagg ggcccgcca cgcccggtgt tctggaattc
 1321 gacagcgaat tcgagatgct gttggccttc atgaccttg tgaacagta cggccccgag
 1381 ttcgtgaccg ggtacaacat catcaacttc gactggccct tcttgctggc caagctgacg
 1441 gacatttaca aggtccccc ctggcgggtac ggccgcatga acggccgggg cgtgtttcgc
 1501 gtgtgggaca taggccagag ccacttcag aagcgcagca agataaagg gaacggcatg
 1561 gtgaacatcg acatgtacgg gatcataacc gacaagatca agctctcgag ctacaagctc
 1621 aacgccgtgg ccgaagccgt cctgaaggac aagaagaagg acctgagcta tcgcgacatc
 1681 ccgcctact acgccgcggg gcccgcgcaa cgcgggggtga tcggcgagta ctgcatacag
 1741 gattccctgc tgggtgggcca gctgtttttt aagtttttgc cccatctgga gctctcgccc
 1801 gtcgcgcgct tgg

ลำดับเบสจาก primer PR4

2065 accgcc ggccggcacg tgggggtacca ggggggccagg
 2101 gtccttgacc ccacttcggg gtttcaagtg aaccccgtag tgggttcga ctttgccagg
 2161 ctgtaccca gcatcataa ggcccacaac ctgtgttca gcacgtctc cctgagggcc
 2221 gacgcagtg cgcacctgga ggccgggcaag gactacctg agatcgaggt gggggggcga
 2281 cggtgttct tcgtcaaggc tcactgcca gagagcctcc tcagcatcct cctgcgggac
 2341 tggctcgcca tgcgaaagca gatccgctc cgga_tcccc agagcagccc cgag

ภาพ 35 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 5 โดยใช้ Primer PF5 และ PR4 อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1173, 1176, 1584 และ 2127 และช่องว่างที่ขีดเส้นใต้ แสดงถึงตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 949, 957 และ 2375

ลำดับเบสจาก primer P1

2398 gcc gtgctcctgg acaagcagca ggccgccatc aaggtcgtgt gtaactcggg gtacgggttc
 2461 acgggagtg agcacggact cctgccgtgc ctgcacgttg ccgcgacggg gacgaccatc
 2521 ggccgcgaga tctgctcgc gacccgcgag tacgtccacg cgcgctgggc ggccttcgaa
 2581 cagctcctgg ccgatttccc ggaggcggcc gacatgcgcg ccccggggcc ctattccatg
 2641 cgcacatct acggggacac ggactccata tttgtctgt gccgcggcct cacggccgcc
 2701 gggctgacgg ccattgggca caagatggcg agccacatct cgcgcgcgt gtttctgcc
 2761 cccatcaaac tcgagtgcga aaagacgttc accaagctgc tgctgacgc caagaaaaag
 2821 tacatggcg tcactacgg gggtaatg ctcacaaagg gcgtggatct ggtgcgcaaa
 2881 acaactgcg cgttatcaa ccgcacctcc agggccctgg tcgacctgt

ลำดับเบสจาก primer P2

2985 gagga gtggctggcg
 3001 cgacccctgc ccgagggact gcaggcgttc gggggccgtc tctagacgc ccatcggcgc
 3061 atcaccgacc cggagaggga catccaggac ttgtctca ccgccgaact gagcagacac
 3121 ccgcgcgcgt acaccaaaa gcgctggcc cacctgacgg tgtattaaa gctcatggcc
 3181 cgccgcgcgc aggtccgtc catcaaggac cggatccgt acgtgacgt ggcccagacc
 3241 cgcgaggtag agggagcggg cgcgcggctg gccgcccctc gcgagctaga c

ภาพ 36 ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 5 โดยใช้ Primer P1 และ P2 อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น แสดงถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2451, 2468, 2670, 2713, 2758 และ 3288 และ อักษรตัวหนาที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้นแสดงถึงตำแหน่งที่มีการเพิ่มของลำดับเบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 3008

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

7. การเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลง

เมื่อได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ DNA polymerase gene ของไวรัสตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่างแล้ว พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างหมายเลข 1A, 1B, 12, 19, 22, 25 และ 31 มีความต่อเนื่องกัน ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 2065-3291 ส่วนตัวอย่างหมายเลข 11 พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความต่อเนื่องกันตั้งแต่ตำแหน่งที่ 2398-3291 ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดย primer ที่ใช้ในการศึกษานี้ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA polymerase gene ที่ตำแหน่ง 902-3690 และแปลรหัสกรดอะมิโนได้ 929 ตัว ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 302 ถึง 1230

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนระหว่างไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A, 1B, 12, 22 และ 31 พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 8 ตำแหน่ง ซึ่งเหมือนกันทั้ง 5 ตัวอย่าง และเมื่อแปลรหัสออกมาเป็นกรดอะมิโน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง คือ 2468, 2713 และ 2758 ที่ทำให้การแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Ala→Val, Val→Met และ Ser→Pro ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่งที่เหลือ คือตำแหน่งที่ 2127, 2375, 2451, 2670 และ 3288 ไม่ทำให้การแปลรหัสเปลี่ยนแปลง (ตาราง 10)

ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 11 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 7 ตำแหน่ง พบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่ง คือ 2468, 2713, 2758 และ 3272 ที่ทำให้การแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Ala→Val, Val→Met, Ser→Pro และ Ala→Gly ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่งที่เหลือ คือตำแหน่งที่ 2451, 2670 และ 3288 ไม่ทำให้การแปลรหัสเปลี่ยนแปลง (ตาราง 11)

ในตัวอย่างหมายเลข 19 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 10 ตำแหน่ง ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่ง คือ 2468, 2713, 2758, 2863 และ 2866 ที่ทำให้การแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Ala→Val, Val→Met, Ser→Pro, Val→Leu และ Asp→Tyr ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์อีก 5 ตำแหน่งที่เหลือ คือตำแหน่งที่ 2127, 2375, 2451, 2670 และ 3288 ไม่ทำให้การแปลรหัสเปลี่ยนแปลง (ตาราง 12)

ส่วนตัวอย่างไวรัสหมายเลข 25 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 11 ตำแหน่ง พบว่าการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่ง คือ 2468, 2713, 2758 และ 2885 ที่ทำให้การแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Ala→Val, Val→Met, Ser→Pro และ Asn→Ile ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลง

นิวคลีโอไทด์ 7 ตำแหน่งที่เหลือ คือ ตำแหน่งที่ 2127, 2375, 2451, 2670, 2865, 2904 และ 3288 ไม่ทำให้การแปลรหัสเปลี่ยนแปลง (ตาราง 13)

ตาราง 10 นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A, 1B, 12, 22 และ 31 เปรียบเทียบกับ HSV-1F

ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์	นิวคลีโอไทด์ที่ เปลี่ยนแปลง	ตำแหน่ง กรดอะมิโน	กรดอะมิโน	
			HSV-1F	1A, 1B, 12, 22, 31
2127	T → C	709	His	His
2451	T → G	817	Val	Val
2468	C → T	823	Ala	Val
2670	C → A	890	Ile	Ile
2713	G → A	905	Val	Met
2758	T → C	920	Ser	Pro
3288	C → A	1096	Leu	Leu

ตาราง 11 นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของไวรัสตัวอย่างหมายเลข 11 เปรียบเทียบกับ HSV-1F

ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์	นิวคลีโอไทด์ที่ เปลี่ยนแปลง	ตำแหน่ง กรดอะมิโน	กรดอะมิโน	
			HSV-1F	11
2451	T → G	817	Val	Val
2468	C → T	823	Ala	Val
2670	C → A	890	Ile	Ile
2713	G → A	905	Val	Met
2758	T → C	920	Ser	Pro
3272	C → G	1091	Ala	Gly
3288	C → A	1096	Leu	Leu

ตาราง 12 นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของไวรัสตัวอย่างหมายเลข 19 เปรียบเทียบกับ HSV-1F

ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์	นิวคลีโอไทด์ที่ เปลี่ยนแปลง	ตำแหน่ง กรดอะมิโน	กรดอะมิโน	
			HSV-1F	19
2127	T → C	709	His	His
2451	T → G	817	Val	Val
2468	C → T	823	Ala	Val
2670	C → A	890	Ile	Ile
2713	G → A	905	Val	Met
2758	T → C	920	Ser	Pro
2863	G → T	955	Val	Leu
2866	G → T	956	Asp	Tyr
3288	C → A	1096	Leu	Leu

ตาราง 13 นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของไวรัสตัวอย่างหมายเลข 25 เปรียบเทียบกับ HSV-1F

ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์	นิวคลีโอไทด์ที่ เปลี่ยนแปลง	ตำแหน่ง กรดอะมิโน	กรดอะมิโน	
			HSV-1F	25
2127	T → C	709	His	His
2451	T → G	817	Val	Val
2468	C → T	823	Ala	Val
2670	C → A	890	Ile	Ile
2713	G → A	905	Val	Met
2758	T → C	920	Ser	Pro
2865	G → T	955	Val	Val
2885	A → T	962	Asn	Ile
2904	C → T	968	Arg	Arg
3288	C → A	1096	Leu	Leu