

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการวิจัย	38
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	78
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	83
บรรณานุกรม	84
ภาคผนวก	90
ก อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	91
ข สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA	94
ค สารเคมีที่ใช้ใน Agarose gel electrophoresis	96
ง การแยกสกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดแยกสกัด	97
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, UK)	
ประวัติผู้เขียน	98

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	จำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR เมื่อ DNA ต้นแบบมีขนาดต่างๆ	27
2	ปริมาณไวรัสเริ่มต้นของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และไวรัสตัวอย่าง จำนวน 32 ตัวอย่าง	38
3	ความเข้มข้นยาด้านไวรัส (ACV) ในการยับยั้งเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และไวรัสตัวอย่างจำนวน 32 ตัวอย่าง ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 50%	41
4	primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน DNA polymerase gene ของ HSV-1 ด้วยเทคนิค PCR	44
5	การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่ม จำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ <i>Pfu</i> DNA polymerase ในสภาวะที่ 2.2, 2.3 และ 2.4	49
6	การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่ม จำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ <i>Pfu</i> DNA polymerase ในสภาวะที่ 2.5 และ 2.6	50
7	การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่ม จำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ <i>Pfu</i> DNA polymerase ในสภาวะที่ 2.7, 2.8 และ 2.9	51
8	การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่ม จำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ <i>Taq</i> DNA polymerase ในสภาวะที่ 3.2, 3.3 และ 3.4	54
9	การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่ม จำนวน DNA polymerase gene ของ HSV-1 โดยใช้ <i>Pfu</i> DNA polymerase ในสภาวะที่ 4.2 และ 4.3	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
10	นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของไวรัสตัวอย่าง หมายเลข 1A, 1B, 12, 22 และ 31 เปรียบเทียบกับ HSV-1F	76
11	นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของไวรัสตัวอย่าง หมายเลข 11 เปรียบเทียบกับ HSV-1F	76
12	นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของไวรัสตัวอย่าง หมายเลข 19 เปรียบเทียบกับ HSV-1F	77
13	นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของไวรัสตัวอย่าง หมายเลข 25 เปรียบเทียบกับ HSV-1F	77

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	Herpes simplex virus ภายใต้วัดกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	5
2	ส่วนประกอบของ Herpes simplex virus	5
3	กระบวนการติดเชื้อแบบแอบแฝงของ Herpes simplex virus	6
4	ลักษณะโครงสร้างยีนโนมของ herpesvirus 4 ชนิด	7
5	ลักษณะโครงสร้างยีนโนมของ HSV-1	8
6	ลักษณะยีนโนมของ HSV-1 เป็น 4 isomers	8
7	ตำแหน่ง ori ภายในยีนโนมของ HSV-1	9
8	การเพิ่มจำนวนของอนุภาคไวรัสของ HSV-1	10
9	การเพิ่มจำนวน DNA ของ HSV แบบ Rolling circle replication	11
10	สูตรโครงสร้างของยา Acyclovir	15
11	กลไกการออกฤทธิ์ของยา Acyclovir ที่มีผลต่อ HSV	16
12	บริเวณ region I-VII และ region A และตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ DNA polymerase gene ของเชื้อ HSV	21
13	กระบวนการ Polymerase chain reaction	23
14	Plaque ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F , ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A, 1B, 5, 11, 12, 19, 22, 25 และ 31	40
15	Genomic DNA ของไวรัส HSV-1F, 1B, 12 และ 22 เปรียบเทียบกับ DNA ขนาดมาตรฐาน 10 kbp	43
16	ตำแหน่งการจับของ primer P1 และ P2 บน HSV-1F DNA polymerase gene ที่มีลำดับเบสตั้งแต่ 2350-3700	45
17	ตำแหน่งของ primer PF5 และ PR4 บน HSV-1F DNA polymerase gene ตั้งแต่ 902-2430	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
18	PCR product ของHSV-1F, 1B, 12, 22 และ negative control เปรียบเทียบกับ DNAมาตรฐาน ขนาด 10 kbp	48
19	PCR product ของHSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 2.5 และPCR product ของ HSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 2.6 เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด10 kbp	51
20	PCR product ของHSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 2.8, สภาวะที่ 2.9 และสภาวะที่ 2.7 เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp	52
21	PCR product ของHSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 3.1 และ negative control เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp	54
22	PCR product ของHSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 3.2 และ negative control เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp	55
23	PCR product ของHSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 3.3, negative control , สภาวะที่ 3.4 , negative control เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp	55
24	PCR product ของHSV-1F เมื่อใช้สภาวะที่ 4.1, สภาวะที่ 4.2, สภาวะที่ 4.3 และ สภาวะที่ 4.4 เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp	59
25	PCR product ขนาด 1350 bp (ลำดับเบสตั้งแต่ 2350-3700) ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F , ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A, 1B, 5, 11, 12, 19, 22, 25 และ 31 หลังจากสกัดให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับ DNAมาตรฐานขนาด 10 kbp	60
26	PCR product ขนาด 1528 bp (ลำดับเบสตั้งแต่ 902-2430) ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F, ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 1A, 1B, 5, 11, 12, 19, 22, 25 และ 31 หลังจากสกัดให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 10 kbp	60
27	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 1A, 1B, 12, 22และ 31	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
28	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 19	63
29	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 25	64
30	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 11	66
31	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 1A, 1B, 22, 25 และ 31	68
32	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 11	69
33	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 19	70
34	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 12	71
35	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 5 โดยใช้ Primer PF5 และ PR4	73
36	ลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของตัวอย่างไวรัสหมายเลข 5 โดยใช้ Primer P1 และ P2	74

อักษรย่อและสัญลักษณ์

%	=	percentage
ACV	=	acyclovir
° C	=	celcius degree
cm	=	centrimetre
cm ²	=	square centrimetre
CPE	=	cytopathic effect
dATP	=	2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	=	2'-deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	=	2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	=	2'-deoxythymidine 5'-triphosphate
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	ethylenediamine tetra-acetic acid
gB	=	glycoprotein B
gC	=	glycoprotein C
gD	=	glycoprotein D
GMK	=	green monkey kidney cell
HSV	=	herpes simplex virus
HSV-1	=	herpes simplex virus type 1
HSV-2	=	herpes simplex virus type 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

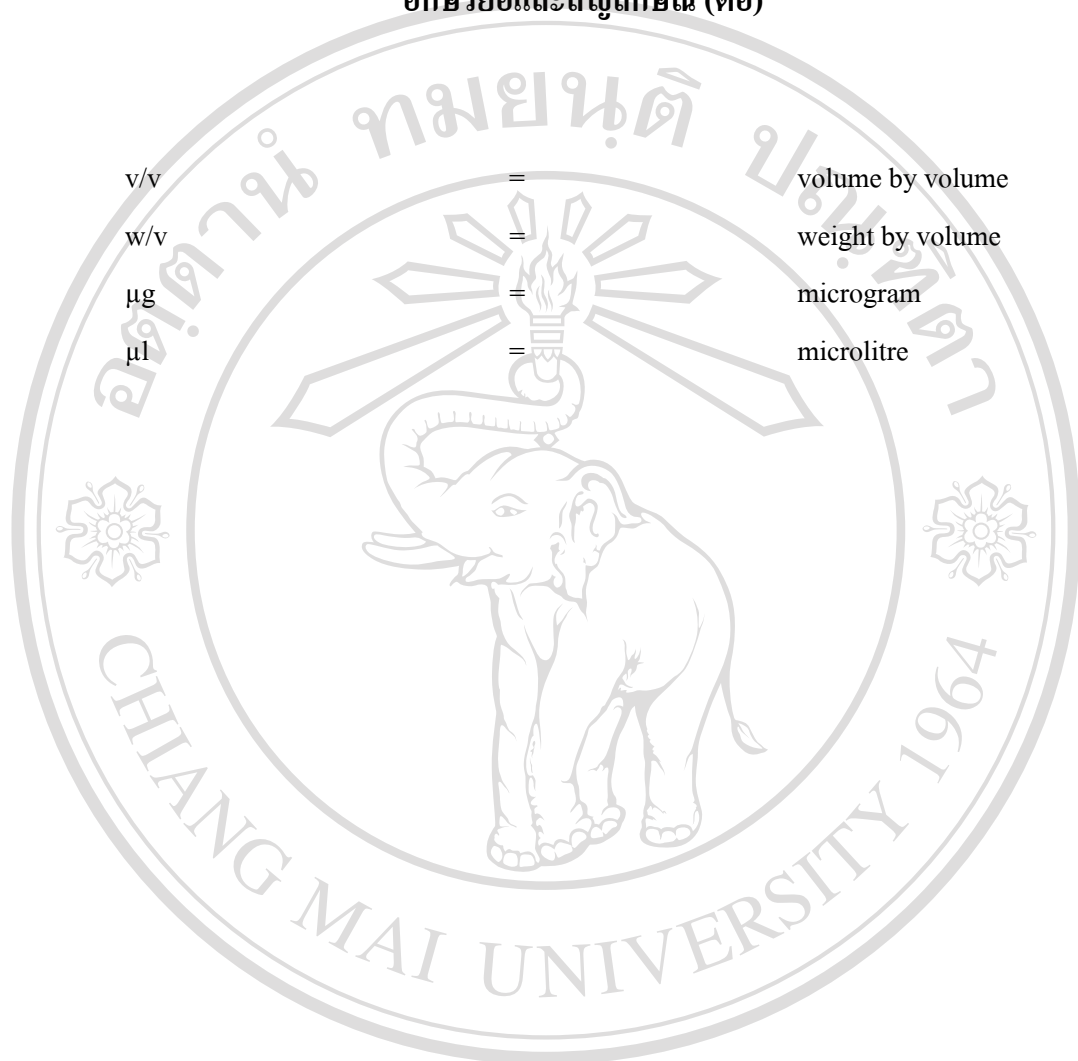
Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

อักษรย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

IRL	=	internal repeat long region
IRS	=	internal repeat short region
kb	=	kilobase pair
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mRNA	=	messenger RNA
Ori	=	origin of replication
OriL	=	origin of replication of long region
OriS	=	origin of replication of short region
PBS	=	phosphate buffer saline
PCR	=	polymerase chain reaction
PFU	=	plaque forming unit
<i>Pfu</i>	=	<i>Pyrococcus furiosus</i>
rpm	=	revolutions per minute
TAE	=	Tris-acetate buffer
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TK	=	thymidine kinase gene
T _m	=	melting temperature
UL	=	unique long region
US	=	unique short region
V	=	volt
VP	=	viral protein

อักษรย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)



v/v

=

volume by volume

w/v

=

weight by volume

μg

=

microgram

μl

=

microlitre

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved