

การทำแผนที่โพลีโกลนิกลิโอโทคส์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่

นางสาวยุพกนิษฐ์ บุระดิษ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


พ.ศ. 2536

ISBN 974-582-217-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018774 111369104

Oligonucleotide Mapping of Influenza Viruses



Miss Yupakanit Buranadis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School


Chulalongkorn University

1993

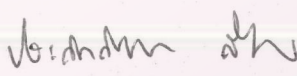
ISBN 974-582-217-5

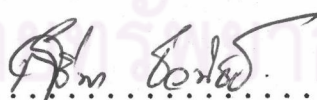
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การหาแผนที่เรอลิกรนิวคลีรเอด์ของไวรัสหวัดใหญ่
โดย นางสาวยุพกนิษฐ์ บุรณะดิษ
ภาควิชา จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ขวณิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นายสัตวแพทย์สุวิชา คูประด็นันท์


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

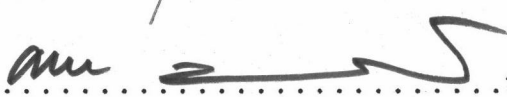

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรากัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์ดีสิน สีहनนท์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ขวณิชย์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(นายสัตวแพทย์สุวิชา คูประด็นันท์)


.....กรรมการ
(นายแพทย์ครรชิต ลิ้มปกาณจนรัตน์)



พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ยุพกนิษฐ์ บุรณะดิษ : การทำแผนที่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่
(OLIGONUCLEOTIDE MAPPING OF INFLUENZA VIRUSES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุรีนา
ชวณิชย์, น.ส.พ.สุวิชา คุประตินิกัณฑ์, 111 หน้า. ISBN 974-582-217-5

แยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ จำนวน 4 สายพันธุ์ จากตัวอย่างน้ำกัวคอกและการป้ายเชื้อจาก
คอของผู้ป่วยในช่วง ปี พ.ศ.2532-2533 ด้วยวิธีฮีมแอกกลูตินเนชัน อินฮิบิชัน (hemagglutination
inhibition) และนิวรามินิเดส อินฮิบิชัน (neuraminidase inhibition) และศึกษาลักษณะของ
สายพันธุ์ ด้วยวิธีฟิงเกอร์พริ้นติง (fingerprinting) สองสายพันธุ์ที่แยกได้ในปี 2532 คือ
A/Bangkok/1/89 (H1N1) และ A/Bangkok/2/89 (H1N1) มีแอนติเจนผิว ที่ไม่แตกต่างกันเห็นชัด
จาก A/Taiwan/1/86 (H1N1) ส่วนอีกสองสายพันธุ์ที่แยกได้ในปี 2533 คือ A/Bangkok/3/90
(H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2) มีลักษณะใกล้เคียงกับ A/Hokkaido/20/89 (H3N2) และ
A/Sichuan/2/89 (H3N2) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางเจเนติก ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจล
อิเล็กโตรโฟรีซิสสองทิศทางในการศึกษารูปแบบของแผนที่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (Oligonucleotide
mapping) พบว่าสายพันธุ์ A/Bangkok/1/89 (H1N1) ไม่มีความแตกต่างอย่างเห็นชัดจากสายพันธุ์
A/Bangkok/2/89 (H1N1) โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเบส (base change) 1.5 เบอ์เซนต์ ส่วน
สายพันธุ์ A/Bangkok/3/90 (H3N2) มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย จากสายพันธุ์ A/Bangkok/4/90
(H3N2) ด้วยการเปลี่ยนแปลงของเบส 12.5 เบอ์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2535

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C125864 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: INFLUENZA VIRUS/OLIGONUCLEOTIDE MAPPING

YUPAKANIT BURANADIS : OLIGONUCLEOTIDE MAPPING OF INFLUENZA VIRUSES.
THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.SURINA CHAVANICH, D.Agr., SUWICHA
KUPRADINONTH Vet.Sc., 111 PP. ISBN 974-582-217-5

Four strains of Influenza Viruses type A were isolated from throat washings and throat swabs of patients in 1989-1990 by hemagglutination inhibition, neuraminidase inhibition and the strains were characterized by fingerprinting technique. Among thesis isolates two strains of them, A/Bangkok/1/89 (H1N1) and A/Bangkok/2/89 (H1N1) which were isolated in 1989 possessed surface antigens indistinguishable from A/Taiwan/1/86 (H1N1). Another two strains A viruses isolated in 1990, A/Bangkok/3/90 (H3N2) and A/Bangkok/4/90 (H3N2) were closely related to A/Hokkaido/20/89 (H3N2) and A/Sichuan/2/89 (H3N2) respectively. From Genetic analysis by two dimensions polyacrylamide gel electrophoresis showed that the oligonucleotide patterns produced by A/Bangkok/1/89 (H1N1) were indistinguishable from that of A/Bangkok/2/89 (H1N1). All spots in fingerprint pattern migrated identically and percent of base change was 1.5. The oligonucleotide maps of A/Bangkok/3/90 (H3N2) and A/Bangkok/4/90 (H3N2) showed spots migration profiles were slightly different and percent of base change was 12.5.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... จุลชีววิทยา
สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา..... 2535

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ขวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อ นายสัตวแพทย์สุวิชา คุประตินันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณา เป็นผู้ควบคุมการวิจัยและให้คำแนะนำจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สินี สีหนนนท์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำในด้านต่าง ๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณนายแพทย์ครรชิต ลิ้มปกาณจนรัตน์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อ พญ.ชื่นฤดี ไชยวสุ สพ.ญ. เยาวภา พงษ์สุวรรณ ดร.เค เนโรเม ดร.โยชิโรกะ และ นพ.ไพจิตร วราชิต

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชา จุลชีววิทยา ที่ได้ให้ความกรุณาและคำชี้แนะตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณพี่ ๆ และเจ้าหน้าที่ทุกคนที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและกองวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จ.นนทบุรี ที่ช่วยเป็นกำลังใจให้กับผู้เขียนตลอดมา

ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	22
3 ผลการทดลอง	39
4 บทวิจารณ์	69
5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	75
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	86
ประวัติผู้เขียน	111

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สรุปรเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2522 - พ.ศ.2531.....	4
2. ยีนส์และผลิตภัณฑ์จากยีนนาไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A.....	12
3. สารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโพรสิสทิศทางแรก.....	35
4. สารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโพรสิสทิศทางที่สอง.....	37
5. ชนิดและอัตราผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ.2532.	46
6. ชนิดและอัตราผู้ป่วยด้วยโรคไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ.2533.	47
7. สายพันธุ์ไข้หวัดใหญ่ชนิด A ชนิดย่อย H3N2 ที่ระบาดในปี พ.ศ.2533.....	50
8. ผลการทดสอบปฏิกิริยาฮีโมแอกกลูตินิน อินฮิบิชั่นของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ.2532.....	51
9. ผลการทดสอบปฏิกิริยาฮีโมแอกกลูตินิน อินฮิบิชั่นของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ.2533.....	55
10. ผลการทดสอบปฏิกิริยา นิวรามินิเดส อินฮิบิชั่น ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้ 4 ตัวอย่าง.....	58
11. ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอและค่าการดูดกลืนแสง 260:280 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้ 4 ตัวอย่าง.....	59
12. เปรียบเทียบแบบพิมพ์ลายนิ้วมือของโพลีโรนิวคลีโอไทด์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ตัวอย่างหลังการทำอิเล็กโตรโพรสิสทิศทางที่สอง.....	60

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ชนิดและจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ.2532...	48
2. ชนิดและจำนวนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในปี พ.ศ.2533...	49
3. รูปแบบโพลีเปปไทด์ จากการย่อยอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNase T1 ในโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโพรซิซของไวรัส ตัวอย่างกลุ่ม A/H1.....	61
4. รูปแบบโพลีเปปไทด์ จากการย่อยอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNase T1 ในโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโพรซิซของไวรัส ตัวอย่างกลุ่ม A/H3.....	62
5. แผนที่โรลิกอนิวคลีโอไทด์ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/1/89 (H1N1).....	63
6. แผนที่โรลิกอนิวคลีโอไทด์ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/2/89 (H1N1).....	64
7. แผนที่ร่วมโรลิกอนิวคลีโอไทด์ ระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/1/89 (H1N1) และ A/Bangkok/2/89 (H1N1)	65
8. แผนที่โรลิกอนิวคลีโอไทด์ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/3/90 (H3N2).....	66
9. แผนที่โรลิกอนิวคลีโอไทด์ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/4/90 (H3N2).....	67
10. แผนที่ร่วมโรลิกอนิวคลีโอไทด์ ระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/Bangkok/3/90 (H3N2) และ A/Bangkok/4/90 (H3N2)	68

สัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	absorbance
Ab	=	antibody
Ag	=	antigen
BSA	=	bovine serum albumin
HA	=	hemagglutinin antigen
HA titer	=	hemagglutination titer
HI titer	=	hemagglutination inhibition titer
M	=	matrix protein
NA	=	neuraminidase antigen
NI titer	=	neuraminidase inhibition titer
NP	=	nucleoprotein
NS	=	nonstructure protein
P	=	polymerase
RNA	=	ribonucleic acid
α	=	alpha
γ	=	gamma
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ซม.	=	เซนติเมตร
%	=	เปอร์เซ็นต์