จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

อลงกร อมรศิลป์

พฤษภาคม 2548

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

อลงกร อมรศิลป์

พฤษภาคม 2548

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปี 2547 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. สุพัชรี เนตรพันธุ์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคห้องปฏิบัติการ น.สพ. ศุภสัวสดิ์ บูรณเวช และ สพ.ญ. นวลอนงค์ ปริโยธร (นิสิตปริญญาโท ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข) และนายปิยะ วงศ์ญาณิน (นักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการหน่วยชันสูตรโรคสัตว์) ที่ให้ความช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส การแยกสกัดสารพันธุกรรม และการหาลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในงานห้องปฏิบัติการ และจัดทำรายงานวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

ชื่อผู้วิจัย ผศ. น.สพ. ดร. อลงกร อมรศิลป์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มีนาคม 2548

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็นเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคพี อาร์ อาร์ เอส ในสุกร การวิจัยครั้งนี้เป็นการหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย คือ 01NP1 เชื้อไวรัส 01NP1 นี้มีขนาด 15412 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วย 5’ UTR และ 3’ UTR ([บริเวณที่ไม่มีการสร้างโปรตีน) และยีน (ORF) จำนวน 8 ยีน คือ ORF1a ORF1b และ ORF2-7 เพื่อที่จะเปรียบเทียบ ความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของเชื้อไวรัส คณะผู้วิจัยได้เปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทยกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์จากอเมริกา (7 ตัวอย่าง) และ ยุโรป (1 ตัวอย่าง) ผลการวิจัยพบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีลำดับเบสเหมือนกับเชื้อไวรัส MLV, VR2332, และ BJ-4 เท่ากับ 99.8%, 99.7% และ 99.7% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า เชื้อ 01NP1 มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส BJ-4, MLV และ VR2332 โดยสรุปอาจกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย (01NP1) อาจมีต้นกำเนิดและมีวิวัฒนาการมาจากเชื้อไวรัสที่ใช้เป็นวัคซีน นอกจากนี้ยังผลการเปรียบเทียบลำดับเบสพบว่าบริเวณ 5’ UTR และ 3’ UTR ของเชื้อไวรัส 01NP1 มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสไม่มาก โดยบริเวณที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนมากที่สุด คือ ORF1a การวิจัยครั้งนี้เป็นรายงานแรกในประเทศไทยที่มีการรายงานลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project title The complete nucleotide sequence analysis of a Thai porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate

Name of the investigators Asst. Prof. Dr. Alongkorn Amonsin

Year March 2005

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a causative agent of a disease in swine, Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). In this study, the complete nucleotide sequences of a Thai PRRSV (01NP1) was determined. The PRRSV (01NP1) contains 15,412 nucleotides with 2 untranslated regions (5' UTR and 3' UTR) and 8 open reading frames (ORFs) designated as ORF1a, ORF1b and ORF2-7 . In order to determine the genetic variation and genetic relatedness among PRRSV isolates, the complete nucleotide sequences of 01NP1 was compared with that of 7 US isolates and 1 EU isolate. Our results showed that the 01NP1 genome shares approximately 99.8% nucleotide identity with live vaccine strain (MLV) and 99.7% nucleotide identity with 2 other US isolates, VR2332 and BJ-4. Phylogenetic analysis also showed that the 01NP1 was closely related to BJ-4, MLV and VR2332. These finding suggested that Thai PRRSV (01NP1) may has originated and evolved from vaccine virus or its derivatives. The 5' UTR and 3'UTR and all 8 ORFs were very well conserved. However amino acid differences were mostly observed in ORF1a (nonstructural gene). This report is the first report of complete nucleotide sequences of PRRSV in Thailand

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการวิจัย	5
ระยะที่ 1	
การคัดเลือกเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย	6
การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส	6
การแยกสกัด อาร์ เอ็น เอ และ การเตรียม cDNA	7
การหาลำดับเบส (DNA sequencing)	7
ระยะที่ 2	
การประกอบลำดับเบส (Genome assembly)	9
การหายีนและโปรตีน (annotation)	9
การเผยแพร่ข้อมูล (data release)	10
ระยะที่ 3	
การวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทยกับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป	10
ผลการวิจัย	
เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย	12
ลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย	13
การหาลำดับเบส (cDNA sequencing)	13
การประกอบลำดับเบส (Genome assembly)	15
ลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	18

การเผยแพร่ข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 20
การเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย กับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป 21
Untranslated regions (5' UTR และ 3' UTR) 23
Non-structural genes (ORF1a และ ORF1b) 26
Structural genes (ORF2-7) 30
การอภิปรายผล 40
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ 43
เอกสารอ้างอิง 44
ภาคผนวก 47
ภาคผนวก ก: การแยกสกัด RNA ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 48
ภาคผนวก ข: การแยกสกัด PCR product 49
ภาคผนวก ค: รายละเอียดลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส 01NP1 ที่เผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank 50
ภาคผนวก ง: รายละเอียดผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไวรัส 01NP1 กับฐานข้อมูล GenBank 57
ภาคผนวก จ: รายละเอียดของ conserved domain จากผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไวรัส 01NP1 กับฐานข้อมูล GenBank 62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดง primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	13
ตารางที่ 2	แสดงผลสรุปการประกอบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส	15
ตารางที่ 3	แสดงรายละเอียดโครงสร้างจีนโนมของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย 01NP1	19
ตารางที่ 4	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในรูปของ % nucleotide identity	21
ตารางที่ 5	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ORF1a และ ORF1b ของ เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในรูปของ % nucleotide identity และ % amino acid identity	27
ตารางที่ 6	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ORF2-7 ของ เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในรูปของ % nucleotide identity และ % amino acid identity	31

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้า
ภาพที่ 1	แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (dendrogram) ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ORF5 ด้วยวิธี phylogenetic analysis	12
ภาพที่ 2	แสดงการประกอบลำดับเบส (genome assembly) โดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในกลุ่ม DNASTAR	16-17
ภาพที่ 3	แสดงโครงสร้างจีนโนมของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย 01NP1 โดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการกำหนด ORFs	20
ภาพที่ 4	แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจากลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี phylogenetic analysis	22
ภาพที่ 5	แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสที่บริเวณ 5' UTR ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	24
ภาพที่ 6	แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสที่บริเวณ 3' UTR ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	25
ภาพที่ 7	แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF1a ที่บริเวณตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1000-1300 ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส	28
ภาพที่ 8	แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF1b ที่บริเวณตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 600-900 ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส	29
ภาพที่ 9	แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF2 ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	34
ภาพที่ 10	แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF3 ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	35
ภาพที่ 11	แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF4 ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	36
ภาพที่ 12	แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF5 ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	37
ภาพที่ 13	แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF6 ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	38
ภาพที่ 14	แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF7 ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส	39

บทนำ

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)) เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรค porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) ในสุกร ซึ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร (Albina, 1997) อาการของการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกร คือ การเกิดปัญหาในระบบสืบพันธุ์ของสุกรสาว (gilts) แม่สุกร (sows) และพ่อสุกร (boars) และปัญหาในระบบทางเดินหายใจในลูกสุกร (piglets) และสุกรขุน (growing pigs) (Christianson et al., 1993; Done and Paton, 1995; Rossow, 1998) เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ถูกพบเป็นครั้งแรกในยุโรปตอนกลาง (Wensvoort et al., 1992) และต่อมาในอเมริกาเหนือ (Collins et al., 1992) และมีการรายงานการพบครั้งแรกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2539 (Damrongwatanapokin et al., 1996)

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เป็น enveloped, positive-single-strand RNA ไวรัส จัดอยู่ในแฟมิลี่ Arteriviridae (Cavanagh, 1997) ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มสายพันธุ์หลัก ๆ ได้ 2 กลุ่มตามลักษณะความแตกต่างกันทางพันธุกรรม (genotype) คือ กลุ่มสายพันธุ์สหรัฐอเมริกา (US) และกลุ่มสายพันธุ์ยุโรป (EU) (Nelson et al., 1993) ชนิดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศไทย โดย Damrongwatanapokin และคณะ (1996) พบว่ามีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับชนิดของไวรัสที่แยกได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา ในปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ทั้งสายพันธุ์อเมริกาและยุโรปในประเทศไทย ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน (Thanawongnuwech et al., 2004)

ในปัจจุบันได้มีคณะวิจัยต่างประเทศรายงานลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์อเมริกา (VR2332) (Nelsen et al., 1999) และยุโรป (LV) (Meulenberg et al., 1993) ซึ่งจากรายงานลำดับเบสทั้งหมดพบว่าสายพันธุ์ VR2332 มีลำดับเบสทั้งหมด 15,411 bp ประกอบด้วย 8 ORFs (ORF 1a, b, ORF 2-7) ในขณะที่สายพันธุ์ยุโรปมีลำดับเบสทั้งหมด 15,101 bp จากผลการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกัน 60.3 เปอร์เซนต์ และมีการจัดเรียงตัวของยีน (gene organization) ที่คล้ายคลึงกัน (Gagnon and Dea, 1998; Nelsen et al., 1999)

ลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส เป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญที่เผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เช่น สายพันธุ์อเมริกา VR2332 (Nelson et al., 1993), 16244B (Allende et al., 1999; Nelsen et al., 1999) สายพันธุ์ยุโรป LV (Meulenberg et al., 1993) สายพันธุ์เอเชีย SP (Shen et al., 2000) ซึ่งคณะวิจัยต่าง ๆ สามารถนำข้อมูลเหล่านี้มาใช้ในการศึกษา

วิจัยแนวลึก เช่น การศึกษาด้านหน้าที่ของยีนและโปรตีน (gene functional study) การวิวัฒนาการ (evolutionary study) และพยาธิวิทยา (pathogenesis study) ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส รวมทั้งการนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาวัคซีน (vaccine development) ซึ่งจะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร และในการจดสิทธิบัตร นอกจากนี้ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการผลิตวัคซีนป้องกันโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย โดยวัคซีนที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นวัคซีนที่นำเข้าจากต่างประเทศ โดยไม่ได้รับอนุญาตจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการสร้างหรือผลิตวัคซีนจากเชื้อสายพันธุ์ไทยจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการควบคุมและป้องกันโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในอนาคต ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้หาลำดับเบสทั้งหมด (complete genome sequence) ของเชื้อสายพันธุ์ไทย เพื่อจะได้นำมาเป็นข้อมูลสำคัญในการที่จะนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยแนวลึกต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส เป็นเชื้อไวรัสที่มีขนาดเล็ก เป็น enveloped, positive sense, single-strand RNA virus เชื้อไวรัสชนิดนี้ถูกจัดอยู่ใน order *Nidovirales*, family *Arteriviridae*, genus *Arterivirus* (Cavanagh, 1997) เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส นี้ ทำให้เกิดโรค PRRS ในสุกรและมีความสำคัญมากในช่วงต้นทศวรรษ 1990 จากผลการศึกษาด้าน phylogenetic analysis สามารถแบ่งเชื้อ ไวรัสนี้เป็น 2 สายพันธุ์ใหญ่คือ สายพันธุ์อเมริกา และ สายพันธุ์ยุโรป โดยมีลำดับเบสที่เหมือนกัน (sequence identity) ประมาณ 60.3% (Allende et al., 1999; Murtaugh et al., 1995)

รายงานการศึกษาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส พบว่าเชื้อไวรัส มีขนาดของลำดับเบสทั้งหมดประมาณ 1.51 - 1.55 kb โดยมีโครงสร้างของ genome แบบ positive-sense RNA ซึ่งประกอบด้วย 5' capped leader sequence, open reading frames (ORFs) (ORF1a,b, ORF2-7) และ 3' nontranslated region (Conzelmann et al., 1993; Snijder and Meulenberg, 1998) จากการศึกษา coding regions ใน genome ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มีจำนวนทั้งสิ้น 8 ORFs ซึ่งประกอบด้วย ORF1a และ ORF1b ที่เป็นยีนที่สร้าง replicase polyprotein ซึ่งจะถูกตัดย่อยโดยขบวนการ autoproteolytic cleavage ได้เป็น non structural protein จำนวน 13 ชนิด ซึ่งมีความสำคัญต่อขบวนการ replication และ transcription ของไวรัส (Batista et al., 2002) ส่วน ORF2-ORF7 เป็นยีนที่สร้าง structural protein ของเชื้อ (Meulenberg et al., 1997) ในปัจจุบันมีรายงานการหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งสายพันธุ์อเมริกา และ สายพันธุ์ยุโรป และได้เผยแพร่ข้อมูลเหล่านี้ในฐานข้อมูล GenBank

ข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่เผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank

ผู้รายงาน	ชื่อไวรัส, สายพันธุ์	ความยาวลำดับเบส	Genbank Accesion #
Meulenberg *et al.,* 1993	Lelystad, EU	15,101	M9262
Nelson *et al.,* 1999	VR2332, US	15,411	U87392
Allede *et al.,* 1999	Michelle, US	15,428	AF046869
Shen et al.,2000	SP, Singapore	15,520	AF184212
Wootton *et al.,* 2000	PA8, Canada	15,411	AF176348

การใช้ข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส เพื่อการศึกษาวิจัยแนวลึก

Wootton *et al.,* 2000 ได้เปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้ในประเทศแคนาดากับลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกา VR2332 และ 16244B โดยพบว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์แคนาดามีความเหมือนกับสายพันธุ์อเมริกา 98-99% และบริเวณที่มีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์และโปรตีนสูง (nucleotide and amino acid difference) คือ บริเวณ non structural coding region (Nsp1) และ structural coding region (ORF5) (Wootton et al., 2000)

Yuan *et al.,* 2001 และ Nielsen *et al.,* 2003 ได้รายงานการนำข้อมูลลำดับเบสไปพัฒนาวัคซีน โดย Yuan *et al.,* 2001 รายงานลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์ที่เป็นต้นแบบ parental (VR2332) และ attenuated strain (RespPRRS) ซึ่งพบว่ามี mutation ที่เหมาะแก่การนำไปพัฒนาเป็นวัคซีน (Yuan et al., 2001) และ Nielsen *et al.,* 2003 ได้สร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส strain VR-2332 ซึ่งเป็นไวรัสที่มีความรุนแรงและทำให้เกิดโรคในสุกร ดังนั้นการสร้าง cDNA clone ของ VR2332 จะนำไปสู่การศึกษา molecular mechanism ระหว่าง virulence และ attenuation ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนา second generation หรือ genetic engineering vaccine ต่อไป (Nielsen et al., 2003; Welch et al., 2004; Yoo et al., 2004)

Plagemann 2003 ได้ใช้ข้อมูลลำดับเบสของ ORF1 และ ORF5 ในการทดสอบสมมุติฐานที่ว่าไวรัสที่ทำให้เกิดโรคมีแหล่งกำเนิด (origin) และวิวัฒนาการ (evolution) จาก mutant ของ arterivirus ของ mice (lactate dehydrogenase elevating virus) ซึ่งทำให้เกิดโรคใน intermediate host คือ หมูป่า (wild boar) ในยุโรปตอนกลาง และต่อมาได้แพร่นำเชื้อไวรัสมายังอเมริกาผ่านทางฟาร์มสุกรในมลรัฐ North Carolina หลังจากนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงและวิวัฒนาการสู่สุกรเลี้ยง (Hanada et al., 2005; Plagemann, 2003)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้ดังตัวอย่างข้างต้น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจะหาลำดับเบสทั้งหมด (the complete genome sequence) ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย เพื่อจะได้นำมาเป็นข้อมูลสำคัญในการที่จะนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยแนวลึกต่อไป

วิธีการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่า การหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย จะเป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญที่จะนำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ซึ่งจะสามารถนำข้อมูลมาใช้ในการศึกษาวิจัยด้านหน้าที่ของยีนและโปรตีน วิวัฒนาการ และพยาธิวิทยา ของเชื้อสายพันธุ์ไทยเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป รวมทั้งความเป็นไปได้ในการนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาวัคซีนจากเชื้อสายพันธุ์ไทยต่อไป ซึ่งจะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรและในการจดสิทธิบัตรในอนาคต เพื่อที่จะพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้จัดตั้งวัตถุประสงค์ 3 ข้อคือ

1. คัดเลือกและเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และใช้วิธีการสร้าง cDNA library และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบ RT-PCR เพื่อหาลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Sequencing of PRRS genome)
2. ประกอบลำดับเบส และกำหนดยีนและโปรตีนของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Genome assembly and annotation)
3. วิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทยกับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี phylogenetic analysis (Analyis and comparison of nucleotide and amino acid sequences)

วิธีดำเนินการวิจัยเพื่อที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวมี 3 ระยะสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ประกอบด้วย

ระยะที่ 1 การคัดเลือกและเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และใช้วิธีการสร้าง cDNA library และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบ RT-PCR เพื่อหาลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Sequencing of PRRS genome)

ระยะที่ 2 การประกอบลำดับเบส และกำหนดยีนและโปรตีนของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Genome assembly and annotation)

ระยะที่ 3 การวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสสายพันธุ์ไทยกับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี phylogenetic analysis (Analyis and comparison of nucleotide sequences)

ระยะที่ 1 การคัดเลือกและเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และใช้วิธีการสร้าง cDNA library และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบ RT-PCR เพื่อหาลำดับเบส ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Sequencing of PRRS genome)

การคัดเลือกเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้คัดเลือกเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยที่เรียกว่า "01NP1" สาเหตุที่เลือกเชื้อสายพันธุ์นี้เนื่องจาก เชื้อไวรัส 01NP1 เป็นเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทยที่แยกได้จากสุกร ในปี 2544 จากฟาร์มในเขตจังหวัดนครปฐม สุกรที่ป่วยมีอาการของโรค PRRS อย่างรุนแรงและชัดเจน รวมทั้งเชื้อไวรัส 01NP1 นี้ทำให้เกิดอัตราการป่วยและตายในฟาร์มสุกรสูง (virulent strain) นอกจากนี้ในปี 2546 คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส 01NP1 กับเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ จากประเทศไทย เอเชีย อเมริกาเหนือ และยุโรป โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ORF5 ซึ่งพบว่าเชื้อสายพันธุ์ 01NP1 อยู่ในกลุ่ม (clone) ที่เป็นตัวแทนของเชื้อในประเทศไทย และ เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบส (% nucleotide identity) พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาสูง

การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส

การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์เอส จะเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์ MARC-145 ให้ได้ปริมาณไวรัสไม่ต่ำกว่า 10^3 $TCID_{50}$/ul เพื่อที่จะนำมาสกัดแยก RNA ต่อไป รายละเอียดของการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Thanawongnuwech et al., 1998) ประกอบด้วย

1. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงเชื้อ โดยการเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ซึ่งเป็น african green monkey kidney cell line ด้วย minimal essential medium (MEM) (Hyclone, USA) ที่มี 5% fetal calf serum (FCS) (Hyclone, USA) ที่ อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$ ใน 5%CO_2 จากนั้นดูด MEM ออก และล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) เติม 0.00125% trypsin versene เพื่อย่อยเซลล์ หลังจากนั้นจะแบ่งเซลล์เพาะเลี้ยงลงในขวดเพาะเลี้ยงด้วย MEM ตามความเหมาะสมของปริมาณเซลล์ และปริมาตรของภาชนะ

2. เพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส โดยการเพาะเชื้อไวรัสขนาด 0.1 MOI (multiplicity of infection) ลงในเซลล์ MARC-145 ที่มีการกระจายตัวขนาด 80 % confluence จากนั้นสังเกตการลอกหลุดของเซลล์ (โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 5 วัน) การเก็บไวรัสจะทำโดยการทำให้เซลล์ MARC-145 แตก ด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 80$^{\circ}C$ สลับกับการละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง 3 รอบ จากนั้นดูด

สารละลายทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใส แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ – 80°C ซึ่งเป็นไวรัสที่พร้อมจะนำมาแยกสกัด RNA ต่อไป

การแยกสกัด อาร์ เอ็น เอ และ การเตรียม cDNA ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

การวิจัยครั้งนี้ได้แยกสกัด อาร์ เอ็น เอ ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยใช้ชุดแยกสกัด QIAamp RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) (รายละเอียดวิธีการแยกสกัด RNA ของเชื้อไวรัสได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก) จากนั้นได้เตรียม cDNA (cDNA synthesis) ซึ่งประกอบด้วยการผสม viral RNA และ 0.5 ug Random primer (Promega, Madison, WI) นำส่วนผสมมาผ่านเครื่อง thermal cycler (Hybaid limited, Ashford, Middlesex, UK) ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที และที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที หลังจากนั้นเติม 1 X Improm-II reaction buffer (Promega), 0.5 mM dNTPs (Fermentus), 2.5 mM $MgCl_2$ (Promega), 10U Rnasin Ribonuclease inhibitor (Promega) และ 1 ul Improm-II Reverse transcriptase และนำส่วนผสมมาผ่านเครื่อง thermal cycler ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที ตามด้วยที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที และที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที cDNA ที่ได้จะนำไปใช้ในการหาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

การหาลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (DNA sequencing)

โดยทั่วไปการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ในแต่ละครั้ง จะได้ความยาวของสายลำดับเบสที่มีความยาว 500-800 bp ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณภาพของตัวอย่าง (template) และสมรรถนะของเครื่องถอดรหัส (sequencer) ในการวิจัยครั้งนี้เพื่อให้ได้ลำดับเบสที่มีความน่าเชื่อถือ ได้ทำการหาลำดับเบสอย่างน้อย 4 ครั้งต่อลำดับเบส (4 fold coverage; 2 forward และ 2 reverse) การหาลำดับเบสของเชื้อ (DNA sequencing) แบ่งออกเป็น 2 วิธี

วิธีที่ 1 หาลำดับเบสจากการทำ RT-PCR และ direct sequencing

หลังจากแยกสกัด RNA ของเชื้อไวรัส และเตรียม cDNA แล้ว จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primers ที่เป็น specific primers สำหรับ 5'UTR, 3'UTR, ORF1-7 ซึ่งเป็น primers ที่ถูกออกแบบให้เหมาะกับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (รายละเอียดดังแสดงไว้ในตารางที่ 1) รายละเอียดวิธีการทำ RT-PCR โดยการเตรียมสารเคมีในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1x Eppendrof Master Mix (Eppendrof, Hamburg, Germany) และ 0.8 uM of each primers และ cDNA ในปริมาตร 1-2 ไมโคลิตร หลังจากผสมสารเคมีจะทำ RT-PCR โดยใช้เครื่อง thermal cycler ด้วยการตั้ง PCR condition ดังนี้ initial denaturation ที่

อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50-55°C นาน 45 วินาที (ขึ้นกับชนิดของ primer) extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 90 วินาที และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำ amplified PCR product ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading buffer (0.2% orange G ใน 50% glycerol) แล้วนำมาผ่าน 2% agarose gel electrophoresis (FMC Bioproducts, Rockland, ME) จากนั้นย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide (0.5 mg/ml) หลังจากย้อมนำ agarose gel มาตรวจดูขนาดของ PCR product และบันทึกภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation system (Vilber Lourmat, La Vallee, France) และตัดเจลเพื่อนำไปสกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ การสกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ จะใช้ชุดสกัด Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendrof, Humburg, Germany) (รายละเอียดวิธีแยกสกัด PCR product ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ข) หลังจากได้ purified PCR product จะนำไปหาลำดับเบสต่อไป

การหาลำดับเบส (DNA sequencing) จะส่งตัวอย่างให้ หน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) วิธีการหาลำดับเบสของเชื้อไวรัสประกอบด้วย การเตรียมตัวอย่างด้วย Big Dye Terminator V.3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction (ABI, Foster City, CA) จากนั้นจะวิเคราะห์ลำดับเบส ด้วยเครื่อง ABI-Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, CT) หรือ ABI-Prism 377 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, CT) ลำดับเบสที่ได้จะนำมาตรวจ และประกอบลำดับเบสต่อไป

วิธีที่ 2. หาลำดับเบสจากการสร้าง cDNA library

การหาลำดับเบสจากการสร้าง cDNA library จะทำโดยเฉพาะลำดับเบสในส่วนต้นและส่วนท้ายของ genome เพื่อให้ครอบคลุมลำดับเบสทั้งหมด ขั้นตอนการสร้าง cDNA library ประกอบด้วยการสร้าง cDNA และ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยวิธี RT-PCR ด้วย specific primers ที่สร้าง cDNA เฉพาะส่วนต้นและส่วนท้ายของ genome (รายละเอียดวิธี RT-PCR ได้แสดงไว้ในวิธีที่ 1 และรายละเอียด primer ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1) จากนั้นนำ PCR product มาผ่าน agarose gel electrophoresis แล้ว purify ด้วยชุดแยกสกัด Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendrof, Hamburg, Germany) หลังจากนั้น clone DNA fragments ลงใน TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) หลังจากได้ positive clone จะแยกสกัด plasmid ของ positive clone โดยใช้ QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) จากนั้นนำ plasmid ของ positive clone ไปหาลำดับเบสต่อไป

ระยะที่ 2 การประกอบลำดับเบส และกำหนดยีนและโปรตีนของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Genome assembly and annotation)

การประกอบลำดับเบส (Genome assembly)

การประกอบลำดับเบส ได้ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ PC และโปรแกรมที่ใช้ในการอ่านและประกอบลำดับเบส ซึ่งเป็นโปรแกรมในกลุ่ม DNASTAR (DNASTAR, Madison, WI) ขั้นตอนการประกอบลำดับเบสประกอบด้วย

1. อ่านและยืนยันข้อมูลลำดับเบส โดยปกติลำดับเบสที่ได้จากเครื่อง ABI automated DNA sequencer (Applied Biosystems) จะเป็น ABI file format ซึ่งจำเป็นต้องใช้โปรแกรมอ่านข้อมูลลำดับเบสจาก ABI file หรือ Text file ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม Chromas V1.45 (Griffith University, Queensland, Australia) และ BioEdit V7.00 (Tom Hall Pharmaceuticals Inc.) ในการอ่านข้อมูลลำดับเบสและยืนยันผลการอ่าน (validate) ลำดับเบสให้ถูกต้อง

2. แปลงลำดับเบสให้อยู่ใน file ที่เหมาะสมกับ assembly program ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม EditSeq (DNASTAR) ในการแปลง file ให้เหมาะสมกับ assembly program

3. ประกอบลำดับเบส (assembly) ทำให้ได้สายลำดับเบสที่ยาวขึ้น และครอบคลุมลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (complete genome) ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม BioEdit V7.00 (Tom Hall Pharmaceuticals Inc.) และ SeqMan (DNASTAR) ในการประกอบลำดับเบส (assembly program)

4. ในกรณีที่มีช่องว่างในสายลำดับเบส (gap) ได้ออกแบบ primer ที่ครอบคลุมบริเวณ gap โดยอาศัยข้อมูลจาก genome sequence ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกา VR2332 ซึ่งใกล้เคียงกับสายพันธุ์ไทย การออกแบบ primer ได้ใช้โปรแกรม Primer express (ABI) (รายละเอียด primer ที่ใช้ให้ครอบคลุม gap ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1)

การหายีนและโปรตีนของเชื้อไวรัส (annotation)

หลังจากได้ลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แล้ว ได้หายีนและโปรตีนของเชื้อไวรัสโดยใช้โปรแกรมที่เกี่ยวข้องกับการหายีนและโปรตีน (annotation) โดยใช้โปรแกรม Artemis release 7(Genome Research Limited) ในการหายีน (open reading frame; ORFs) ร่วมกับการทำ

homology search ด้วยวิธี BLASTN และ BLASTP กับฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank) รายละเอียดวิธีการหายีน (ORFs) ประกอบด้วยการใช้โปรแกรม Artemis ซึ่งโปรแกรมจะหา start และ stop codon ของ 6 Frame (+1, +2, +3 ,-1,-2,-3) และ predicted ORFs จากนั้นจะยืนยันการเลือก ORFs ด้วยการทำ homology search ทั้งในระดับนิวคลีโอไทด์ (BLASTN) และ โปรตีน (BLASTP) ผ่านทาง http://www.ncbi.nlm.nih.gov และจะเลือก ORFs ที่มี score homology สูงสุด (มีค่าใกล้ 0) เมื่อได้ ORFs ที่มีความน่าจะเป็นสูงสุดจะเปรียบเทียบ ORFs ที่ได้กับ genes ที่มีในฐานข้อมูล

การเผยแพร่ข้อมูล (data release)

การเผยแพร่ข้อมูล ทำได้โดยการส่งข้อมูลลำดับเบสทั้งหมด (complete nucleotide sequence) ไปยังฐานข้อมูล GenBank เพื่อเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.go

<u>ระยะที่ 3 การวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ไทยกับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี phylogenetic analysis</u>

การวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทยกับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป

หลังจากได้ลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส 01NP1 แล้ว ได้วิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทยกับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป ซึ่งประกอบด้วย

1. เตรียมลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย (01NP1) รวมทั้งลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา ได้แก่ เชื้อไวรัส VR2332 (U87392), 16244B (AF046869), MLV (AF066183), PA8 (AF176348), SP (AF184212), P129 (AF494042), BJ-4 (AF331831) และสายพันธุ์ยุโรป ได้แก่ เชื้อไวรัส Lylestad (Meulenberg *et al.,* 1993) ลำดับเบสของเชื้อดังกล่าวได้จากการ download ลำดับเบสผ่านทางฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

2. เปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย สายพันธุ์อเมริกา และ สายพันธุ์ยุโรป (comparison of full-length genomic sequences) ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรม MegAlign (DNASTAR) ซึ่งใช้ในการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดและแต่ละยีน (ORFs) การเปรียบเทียบลำดับเบสประกอบด้วยการหา number of polymorphic sites, nucleotide identity และ amino acid identity

รวมทั้งการเปรียบเทียบที่บริเวณ untranslated regions (5', 3' UTR) และ predicted structural genes and proteins

3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ในระดับ genome (genetic relatedness) โดยวิธี phylogenetic analysis ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ PAUP ซึ่งวิธี phylogenetic analysis จะสามารถบอกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส เป็น percentage of similarity หรือ genetic distance และสามารถนำเสนอความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram หรือ phylogenetic tree)

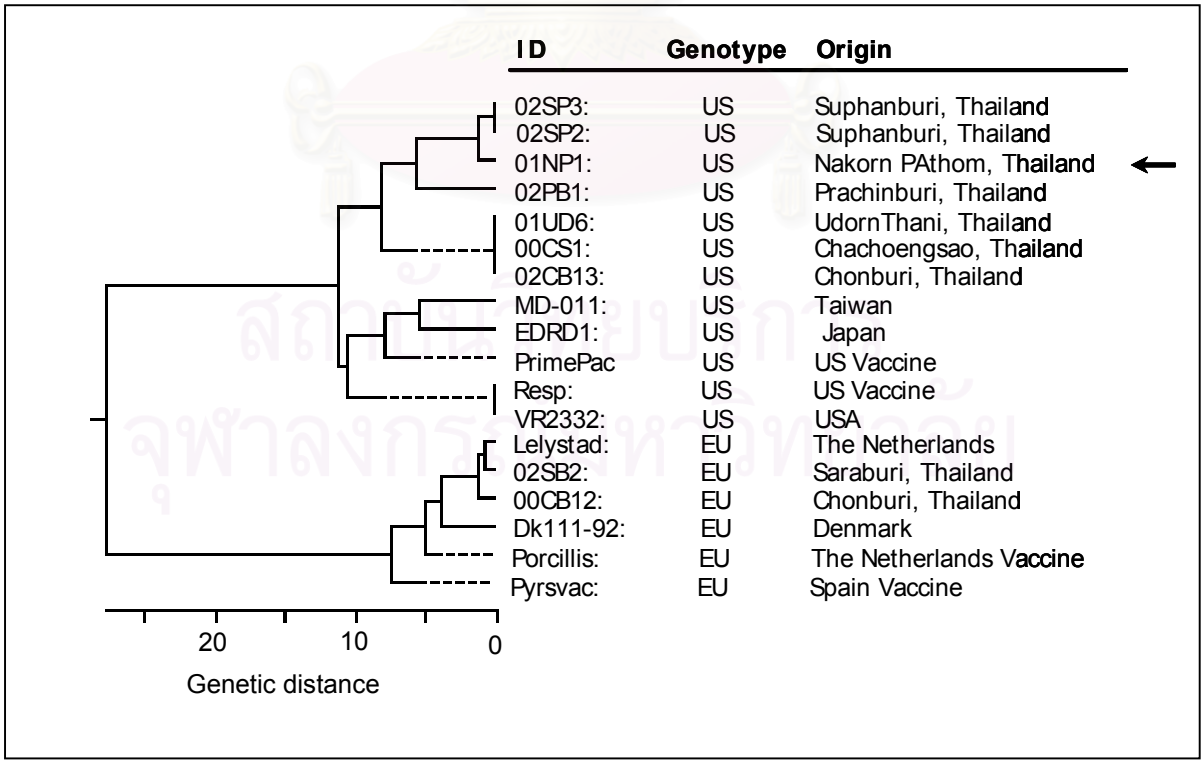
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

ในการวิจัยครั้งนี้เชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทยที่เลือกใช้คือ “01NP1” ซึ่งถือว่าเป็นตัวแทนของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย ที่มีลักษณะกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (genotype US) เนื่องจากเชื้อไวรัส 01NP1 นี้เป็นเชื้อที่แยกได้จากสุกรในจังหวัดนครปฐม และทำให้เกิดโรครุนแรงในสุกร จากการศึกษาขั้นต้นโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ยีน ORF5 พบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 นี้อยู่ในกลุ่มของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย ที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา จึงสามารถนำมาเป็นตัวแทนของเชื้อสายพันธุ์ไทยได้ ภาพที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ORF5 โดยวิธี phylogenetic analysis พบว่าเชื้อ 01NP1 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม (clone) สายพันธุ์ไทยที่มี genotype แบบ US และแยกออกจากกลุ่ม EU อย่างชัดเจน

ภาพที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (dendrogram) ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ORF5 ด้วยวิธี phylogenetic analysis



ลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

การหาลำดับเบส (cDNA sequencing)

ในการหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้สังเคราะห์ specific primers จำนวนทั้งสิ้น 24 คู่ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสสายพันธุ์อเมริกา ซึ่ง primer จำนวน 10 คู่เป็น primer ตามแบบของ Wootton และคณะ (2000) (Wootton et al., 2000) และจำนวน 12 คู่เป็น primers เพิ่มเติมเพื่อให้ครอบคลุมทั้ง genome ของเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังมี primers จำนวน 2 คู่ที่เป็น specific primers ที่จำเพาะต่อบริเวณต้น (5' UTR) และ ท้าย (3' UTR) ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส รายละเอียดของ primer ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

Fragment	Name	Sequence	bp	Expected size
Primer ชุดที่ 1 [a]				
0-1203	PRRS-1F	5'ATGCATGCTAATACGACTCACTATAG CGCCCGGGCAGGTGTTG -3'	47	1202
	PRRS-1R	5'-GCGGATCCAACTCCCTTAACGG -3'	22	
1150-2191	PRRS-2F	5'-CTAAACGGACCTATCGTCG -3'	19	1040
	PRRS-2R	5'-AGGTGTCGATTACGCGTGGC -3'	20	
2103-3212	PRRS-3F	5'-GTTTGACCTGTACCTCCGTGG -3'	21	1108
	PRRS-3R	5'-CTGCTTGATGACACGGACG -3'	19	
3135-4741	PRRS-4F	5'-GCATGAAGCTGAGGAAACC -3'	19	1605
	PRRS-4R	5'-ATGGAACAGCGGAAACCTTGACC -3'	23	
4329-6293	PRRS-5F	5'-CTGTATCTTGGCTGGAGCTTACGTGC -3'	26	1963
	PRRS-5R	5'-GCATGTCCCATCATTCTCCACAGG -3'	24	
6193-7630	PRRS-6F	5'-CTTTGTGCCTTGCTTGCTGCC -3'	21	1437
	PRRS-6R	5'-CTTTGGCAGTCAGTTCGC -3'	18	
7550-10977	PRRS-7F	5'-GAGTTCAATGGGAAGCTGC -3'	19	3426
	PRRS-7R	5'-AGTTGTGTGCGACCTTGG -3'	18	
10630-12209	PRRS-8F	5'-CATTCGATGTGGTTACATTGCATTTGCCC -3'	29	1578
	PRRS-8R	5'-CCAACCGGCGATGGTGAAGC -3'	20	
12073-14914	PRRS-9F	5'-CGGATCCATGAAATGGGGTCCATGCA -3'	26	2841
	PRRS-9R	5'-GTCTGCTTGCCGTTGTTA -3'	18	
14365-end	PRRS-10F	5'-CGGATCCCAGCGGAACAATGGGGT-3'	24	1046
	PRRS-10R	5'-TTCTAGAATTCAGCGGCCGC$(T)_{30}N_{-1}$N-3'	50	

Primer ชุดที่ 2 [b]				
1-1324	PRRS-12-F	5’-GGTGTTGGCTCTATGCCTTG -3’	20	
	PRRS-1271-R	5’-GGCTCAACCCTTATTCTGAGG -3’	21	1260
2000-3400	PRRS-2001-F	5’-CAAGTGCGCTTAGGGAAAAT -3’	20	
	PRRS-3390-R	5’-GAGAAAGCCATTCCTGCGTA -3’	20	1390
3200-4700	PRRS-3216-F	5’-TCCTTGTCCAGCGTGAGAAT -3’	20	
	PRRS-4577-R	5’-GGGTTTTTCAGAGGGTTGCT -3’	20	1362
4440-5800	PRRS-4456-F	5’-CGTCACTTATCGACCTGTGC -3’	20	
	PRRS-5743-R	5’-GTAAGGACATGTGCGGCAGT -3’	20	1288
5450-6900	PRRS-5525-F	5’-GCACCAGATGGGACCTACTT -3’	20	
	PRRS-6842-R	5’-GGAAATCCAAGTCCTCGTCA -3’	20	1318
6700-7900	PRRS-6700-F	5’-GAGGGAAAGTTGAGGGAAGG-3’	20	
	PRRS-7900-R	5’-GTGCTCAACCGCGTCTTT-3’	18	1146
7750-9000	PRRS-7750-F	5’-TGGCCAGTGAGGTTGAGCTA -3’	20	
	PRRS-9000-R	5’-TTCAGCACGTACGACGGTAG -3’	20	1251
8900-10100	PRRS-8900-F	5’-GCAATTGTCCGCTGGTTT -3’	18	
	PRRS-10100-R	5’-GCCAGTATGTTTTCCCAGCA -3’	20	1192
11100-12100	PRRS-11100-F	5’-GGTGCCGGCTATATGGTG -3’	18	
	PRRS-12100-R	5’-TCAGGCCTAAAGTTGGTTCAA -3’	21	931
11250-13150	PRRS-11250-F	5’-GCCTGAATTGAAATGAAATGG -3’	21	
	PRRS-13150-R	5’-GAGGCAAGGTGGTGTTCTG -3’	19	1104
13100-14200	PRRS-13100-F	5’-GGGCAGAACACCACCTTG -3’	18	
	PRRS-14200-R	5’-ACGGAACCATCAAGCACAAC -3’	20	1199
14100-15400	PRRS-14100-F	5’-GGCTGCGTTGACTTGCTT -3’	18	
	PRRS-15400-R	5’-GGCACAATGTCAATCAGTGC -3’	20	1198
Primer ชุดที่ 3 [C]				
5’ UTR	PRRS-1F	5’-ATGACGTATAGGTGTTGGCTCT-3’	22	400
	PRRS-400R	5’-AGCACTCAACAGTGGGGAAT-3’	20	
3’ UTR	ORF7-F	5’-CGGATCCCCTTGTCAAATATGCCAA-3’	25	565
	3’ UTR	5’-TTAATTTCGGCCGCATGGTTCT-3’	22	

[a]: specific primers ชุดที่ 1 จำนวน 10 คู่ได้สังเคราะห์ตามแบบของ Wootton *et al.,* 2000

[b]: specific primers ชุดที่ 2 จำนวน 12 คู่ได้จากการออกแบบในการวิจัยครั้งนี้ เพื่อให้ครอบคลุมทั้ง genome ของเชื้อไวรัส

[C]: specific primers ชุดที่ 3 จำนวน 2 คู่ได้จากการออกแบบในการวิจัยครั้งนี้ จากบริเวณ 5’ UTR และ 3’ UTR

การประกอบลำดับเบส (Genome assembly)

การวิจัยครั้งนี้ได้หาลำดับเบส (DNA sequencing) ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จำนวน 76 เส้น จากนั้นใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในกลุ่ม DNASTAR ซึ่งเป็นการอ่านข้อมูลลำดับเบสจาก ABI file หรือ Text file และประกอบลำดับเบส (assembly) ให้ได้สายลำดับเบสยาวขึ้น

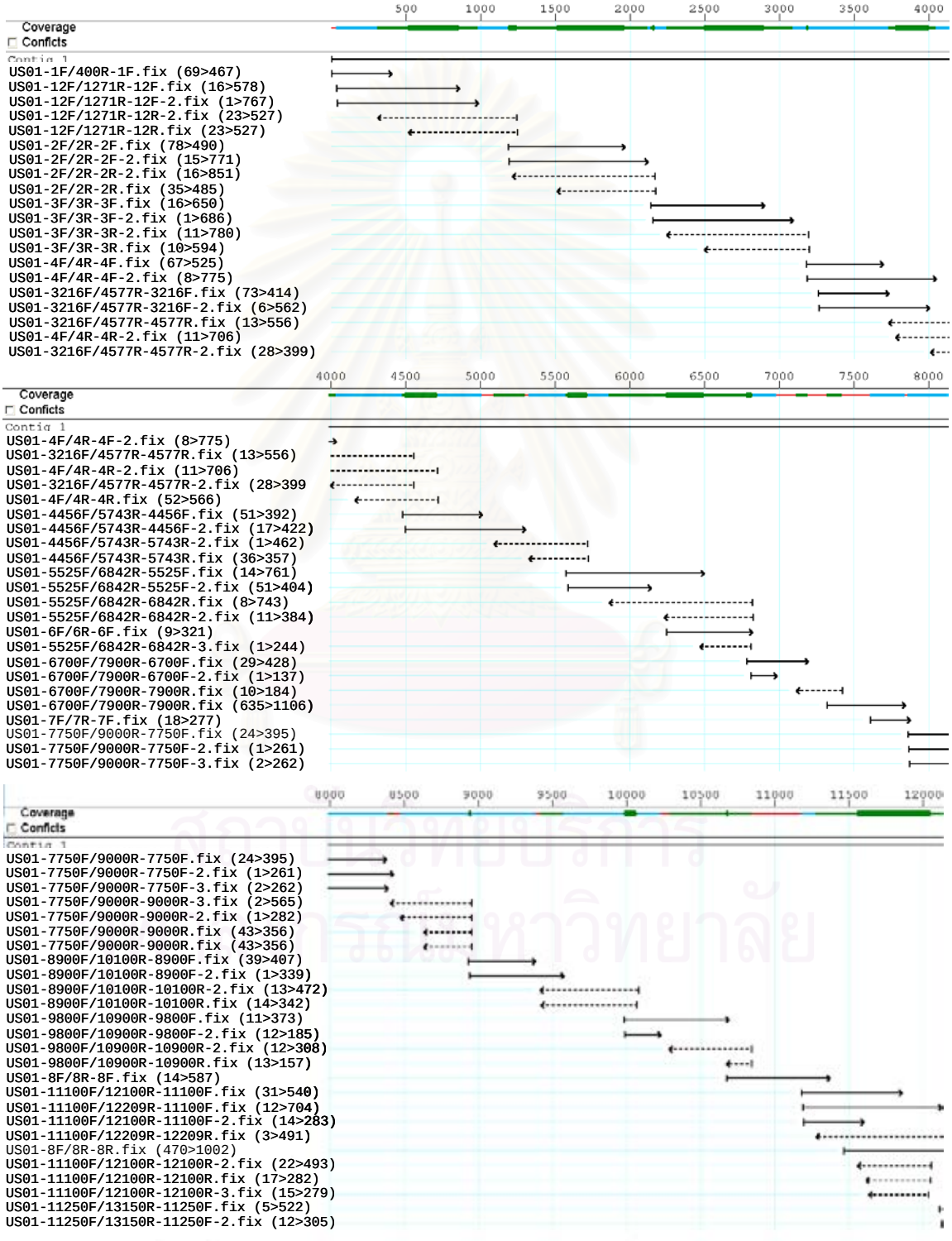
ตารางที่ 2 แสดงผลสรุปการประกอบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยได้ หาลำดับเบสทั้งสิ้นจำนวน 76 เส้น แบ่งเป็น forward sequence 40 เส้น และ reverse sequence 36 เส้น คิดเป็นจำนวนลำดับเบสที่หา (sequencing) ทั้งสิ้นจำนวน 45,399 bp หรือคิดเป็น 2.95 เท่าของลำดับเบสทั้งหมด (2.95 coverage) รายละเอียดการประกอบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลสรุปการประกอบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

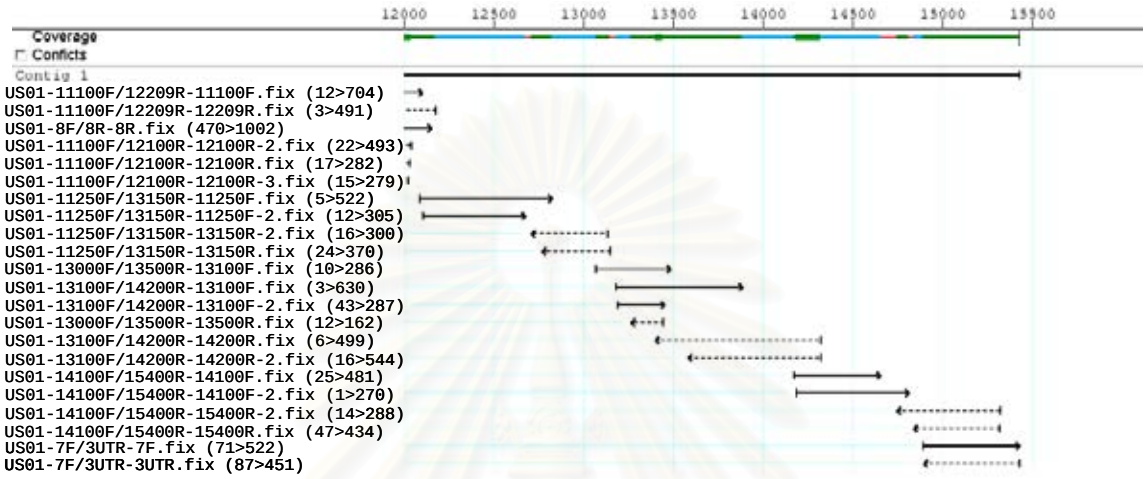
รายละเอียด	
จำนวนเส้นลำดับเบส (number of sequences)	76 sequences
Forward sequence	40 sequences
Reverse sequence	36 sequences
จำนวนลำดับเบสทั้งหมดในการประกอบ (total sequence length)	45,399 bp
จำนวนเท่าที่ครอบคลุมลำดับเบสทั้งหมด (avarage coverage)	2.95
จำนวนลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส (contig length)	15,412 bp

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 2 แสดงการประกอบลำดับเบส (genome assembly) โดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในกลุ่ม DNASTAR



ภาพที่ 2 แสดงการประกอบลำดับเบส (genome assembly) โดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในกลุ่ม DNASTAR (ต่อ)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

การวิจัยครั้งนี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทยที่รายงานลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย 01NP1 ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัสมีลำดับเบสทั้งหมดจำนวน 15412 bp ซึ่งประกอบด้วย นิวคีโอไทด์ A คิดเป็น 21.77% นิวคีโอไทด์ G คิดเป็น 26.12 % นิวคีโอไทด์ T คิดเป็น 25.46% และ นิวคีโอไทด์ C คิดเป็น 26.65% (% C+G เท่ากับ 52.76%) (รายละเอียดลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ค)

รายละเอียดโครงสร้างจีนโนม (genome organization) ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย 01NP1 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3 ซึ่งพบว่าโครงสร้างจีนโนมของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยส่วนใหญ่เหมือนกับโครงสร้างจีนโนมของเชื้อไวรัส กลุ่ม Arterivirus โดยผลการหายีนและโปรตีนของเชื้อ ไวรัสพบว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ประกอบด้วย open reading frame (ORF) จำนวน 8 ORFs คือ ORF1a และ ORF1b ซึ่งเป็นยีนขนาดใหญ่ และซ้อนกัน (overlapping ORFs) (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3) โดย ORF1a มีขนาด 7512 bp (2503 amino acids) และ ORF1b มีขนาด 4392 bp (1463 amino acids) โปรตีน (predicted amino acid) ของ ORF1a และ ORF1b เป็น replicase protein ซึ่งผลของการเปรียบเทียบลำดับโปรตีนกับฐานข้อมูล GenBank (protein BLAST) พบว่าโปรตีนของ ORF1a และ ORF1b เป็น replicase polyprotein 1ab (ORF1ab) โดย replicase polyprotein 1a (ORF1a) ประกอบด้วย Nsp1-alpha papain-like cysteine proteinase (PCP1-alpha); Nsp1-beta papain-like cysteine proteinase (PCP1-beta); Nsp2 cysteine proteinase (CP2) (CP); Nonstructural protein 3 (Nsp3); 3C-like serine proteinase (3.4.21.-) (3CLSP) (Nsp4); Nonstructural protein 5-6-7 (Nsp5-6-7); Nonstructural protein 8 (Nsp8); และ replicase polyprotein 1b (ORF1b) ประกอบด้วย RNA-directed RNA polymerase (RdRp) (Pol) (Nsp9); Helicase (Hel) (Nsp10); Nonstructural protein 11 (Nsp11); Nonstructural protein 12 (Nsp12)] รายละเอียดผลการเปรียบเทียบโปรตีน (BLASTp) ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ง

นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบโปรตีนยังพบว่า โปรตีน ORF1a มี conserved domain คือ serine peptidases ซึ่งเกี่ยวข้องกับ polyprotein processing และ โปรตีน ORF1b มี conserved domain คือ RNA dependent RNA polymerase และ viral RNA helicase (super family 1) ซึ่งเกี่ยวข้องกับหลายๆ ขั้นตอนของ viral RNA replication รายละเอียดของ conserved domain ได้แสดงไว้ในภาคผนวก จ

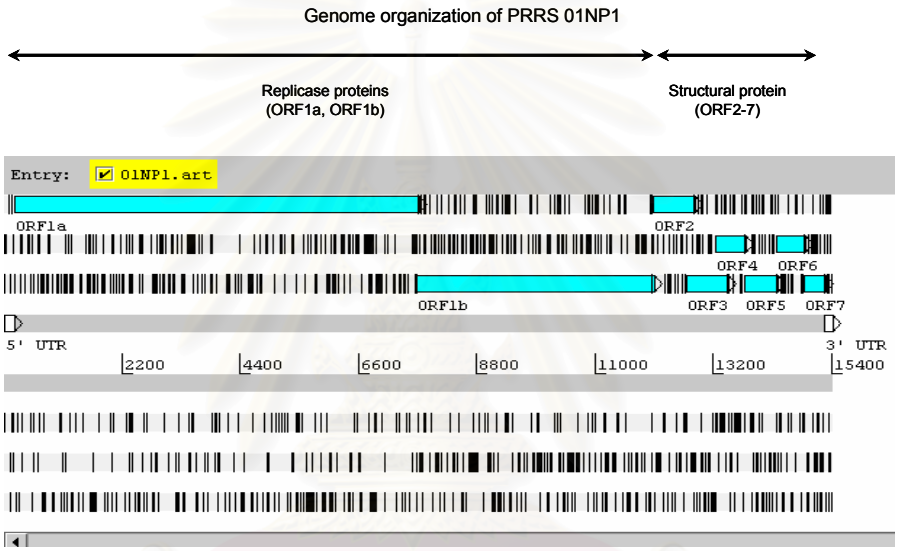
ส่วน ORF2-7 มีขนาด 771, 765, 537, 603, 525 และ 372 bp (256, 254, 178, 200, 174 และ 123 amino acids) ตามลำดับ โดยพบว่าโปรตีนของ ORF2-7 เป็น structural protein ซึ่งประกอบด้วย envelop protein (GP2-5), matrix protein (GP6) และ nucleocapsid protein (GP7) (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3)

นอกจาก ORFs แล้วพบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 ประกอบด้วย untranslated region ที่บริเวณส่วนต้นและส่วนท้ายของ genome คือ 5' UTR จำนวน 189 bp และ 3' UTR จำนวน 152 bp (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3) และมี poly A tail (ไม่ได้ศึกษาในการวิจัยนี้)

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดโครงสร้างจีนโนมของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย 01NP1

Region/ORF	Nucleotides		Amino acid		Protein*
	Position	Size	Position	Size	
5' UTR	1-189	189	-	-	-
ORF1a	190-7701	7512	NA	2503	Replicase polyprotein; Nsp1alpha, beta (Papain-like cysteine protease); Nsp2 (cystein protease); Nsp3 - 8
ORF1b	7680-12071	4392	NA	1463	RNA dependent RNA polymerase (Nsp 9 - 12)
ORF2	12073-12843	771	NA	256	GP2 envelop protein
ORF3	12696-13460	765	NA	254	GP3 envelop protein
ORF4	13241-13777	537	NA	178	GP4 envelop protein
ORF5	13788-14390	603	NA	200	GP5 envelop protein
ORF6	14375-14899	525	NA	174	Matrix protein
ORF7	14889-15260	372	NA	123	Nucleocapsid protein
3'UTR	15261-15412	152	-	-	-

ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างจีนโนมของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย 01NP1 โดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการกำหนด ORFs ของเชื้อไวรัส จากภาพแสดงโครงสร้างจีนโนมของเชื้อไวรัส ซึ่งประกอบด้วย reading frame จำนวน 6 แถว (+3, +2, +1, -1, -2, -3) โดยมีเส้นแนวตั้งที่แสดงถึง start และ stop codons ส่วน predicted ORFs แสดงโดยลูกศรสีเขียว (ปลายของลูกศร แสดงทิศทางของ ORFs)



การเผยแพร่ข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

ลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (complete nucleotide sequence) ได้นำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.go โดยเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 01NP1 มี GenBank accesion number “DQ056373” รายละเอียดของข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ค

การเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทยกับเชื้อสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป

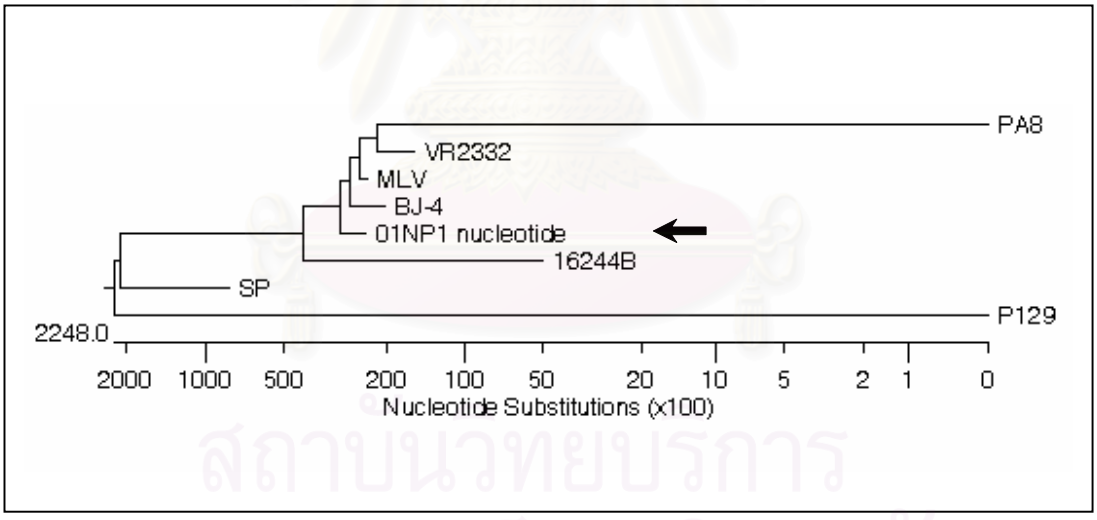
การเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย กับสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป ประกอบด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย 01NP1 (DQ056373) กับ เชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกา VR2332 (U87392), 16244B (AF046869), MLV (AF066183), PA8 (AF176348), SP (AF184212), P129 (AF494042), BJ-4 (AF331831) และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรป Lylestad (M96262) ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีความเหมือนกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกา (มากกว่า 90% nucleotide identity) โดยเฉพาะเชื้อไวรัส MLV (99.8%) VR2332 (99.7%) BJ4 (99,7%) และ 16244B (98.5%) ในขณะที่เชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทยเหมือนกับสายพันธุ์ยุโรปเพียงประมาณ 60% รายละเอียดผลการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสทั้ง 3 กลุ่ม ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในรูปของ % nucleotide identity

	เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่เปรียบเทียบ (% nucleotide identity)								
	01NP1	VR2332	16244B	MLV	PA8	SP	P129	BJ4	LV
01NP1	100	99.7	98.5	99.8	99.3	93.6	91.5	99.7	59.9
VR2332		100	98.5	99.7	99.3	93.7	91.6	99.6	59.8
16244B			100	98.5	98.1	92.8	90.9	98.4	NA
MLV				100	99.3	93.6	91.5	99.8	59.8
PA8					100	93.3	91.3	99.2	59.8
SP						100	90.8	93.5	NA
P129							100	91.4	NA
BJ4								100	NA
LV									100

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genome relatedness) โดยการวิเคราะห์ทาง phylogenetic analysis ของลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส พบว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย 01NP1 มีความใกล้ชิดกับเชื้อไวรัส BJ-4 ซึ่งเป็น เชื้อที่แยกได้จากสุกรป่วยในประเทศจีน รวมทั้งมีวิวัฒนาการมาจากเชื้อไวรัส MLV และ VR2332 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีน (MLV RespPRRS พัฒนามาจาก VR2332) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 01NP1 ที่ระบาดในประเทศไทย เป็นเชื้อที่มีต้นกำเนิดจากเชื้อไวรัสที่เป็นวัคซีน (vaccine virus) ซึ่งมีวิวัฒนาการจากเชื้อที่ไม่มีความรุนแรง (non-virulence) ไปเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงและทำให้เกิดโรค (virulence) โครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram) ที่แสดงความสัมพันธ์ในระดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ได้แสดงไว้ในภาพที่ 4

ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ในระดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจากลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส ด้วยวิธี phylogenetic analysis



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Untranslated regions (5’ UTR และ 3’ UTR)

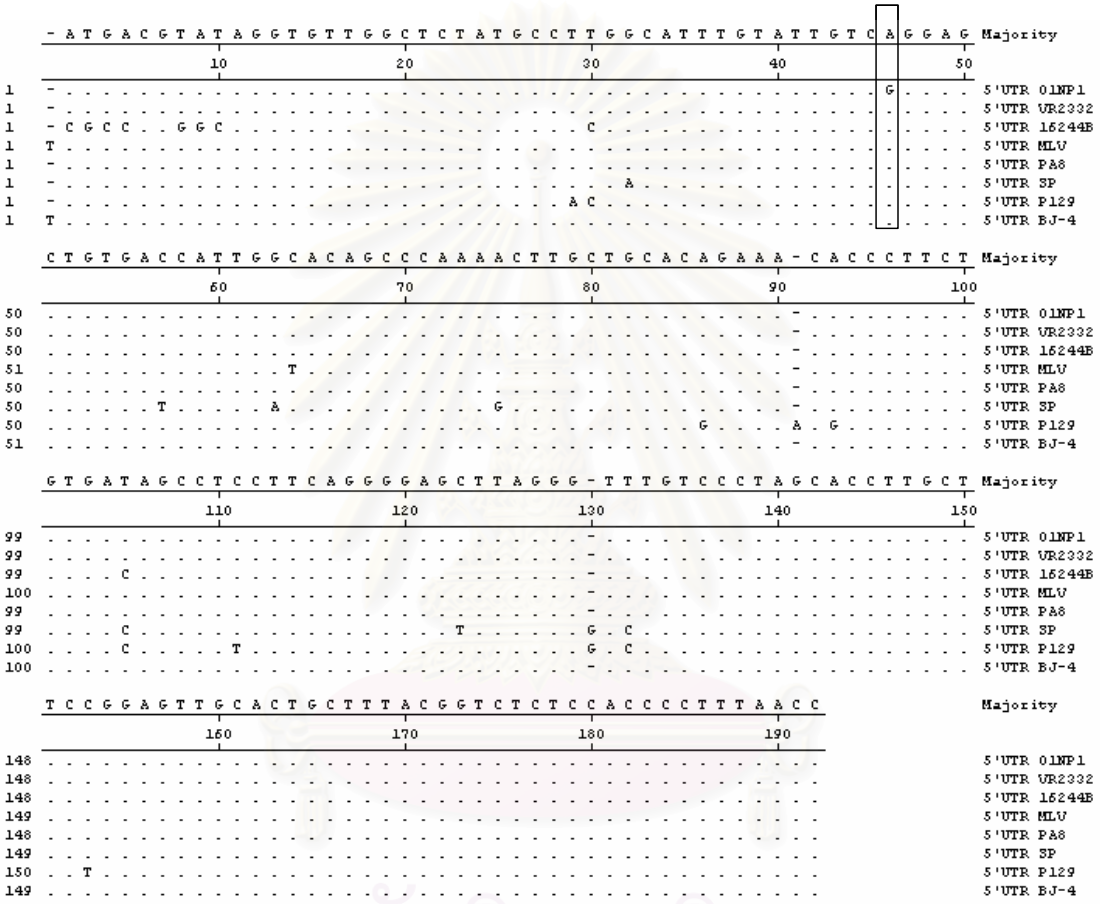
ผลการเปรียบเทียบ 5’ UTR ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย 01NP1 กับ เชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกา พบว่า 5’UTR ของเชื้อไวรัส 01NP1 เหมือนกับเชื้อไวรัส VR2332, PA8 และ BJ-4 มากที่สุด (99.5%) (ในขณะที่เชื้อไวรัส VR2332, PA8 และBJ-4 มี 5’UTR เหมือนกัน 100% nucleotide identity) และมีความเหมือนกับเชื้อไวรัส MLV (98.9%), 16244B (94.7%), SP (93.1%), และ PA8 (89.9%) ตามลำดับ

เชื้อไวรัส LV ซึ่งเป็นสายพันธุ์ยุโรปมี 5’ UTR ยาวที่สุด (221) ในขณะที่เชื้อไวรัส 01NP1 มี 5’ UTR ขนาด 189 bp ซึ่งเท่ากับขนาดของเชื้อไวรัส VR2332, PA8, BJ-4 และ 16244B จากการเปรียบเทียบลำดับเบส พบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีเพียงตำแหน่งที่แตกต่างจากเชื้อไวรัส VR2332 เพียง 1 ตำแหน่ง (polymorphic site) รายละเอียดการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 5’ UTR และตำแหน่ง polymorphic site ได้แสดงไว้ในภาพที่ 5

ผลการเปรียบเทียบ 3’ UTR ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย 01NP1 กับ เชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกา พบว่า 3’UTR ของเชื้อไวรัส 01NP1 มีขนาด 151 bp ซึ่งเหมือนกับ 3’ UTR ของเชื้อไวรัสทุกสายพันธุ์ในกลุ่มอเมริกา โดยพบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีความเหมือนกับเชื้อไวรัส VR2332, 16244, MLV และ BJ-4 (98.7%) และมีความเหมือนกับเชื้อไวรัส PA8 (97.4%), SP (96.7%), และ P129 (93.4%) ตามลำดับ (เชื้อไวรัส VR2332, 16244, MLV และ BJ-4 มี 3’UTR เหมือนกัน 100% nucleotide identity) รายละเอียดการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 3’ UTR และตำแหน่ง polymorphic site ได้แสดงไว้ในภาพที่ 6 ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีตำแหน่งที่แตกต่างจากเชื้อไวรัส VR2332 จำนวน 2 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัส LV ซึ่งเป็นสายพันธุ์ยุโรปมี 3’UTR ที่สั้นกว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกา คือ 114 bp

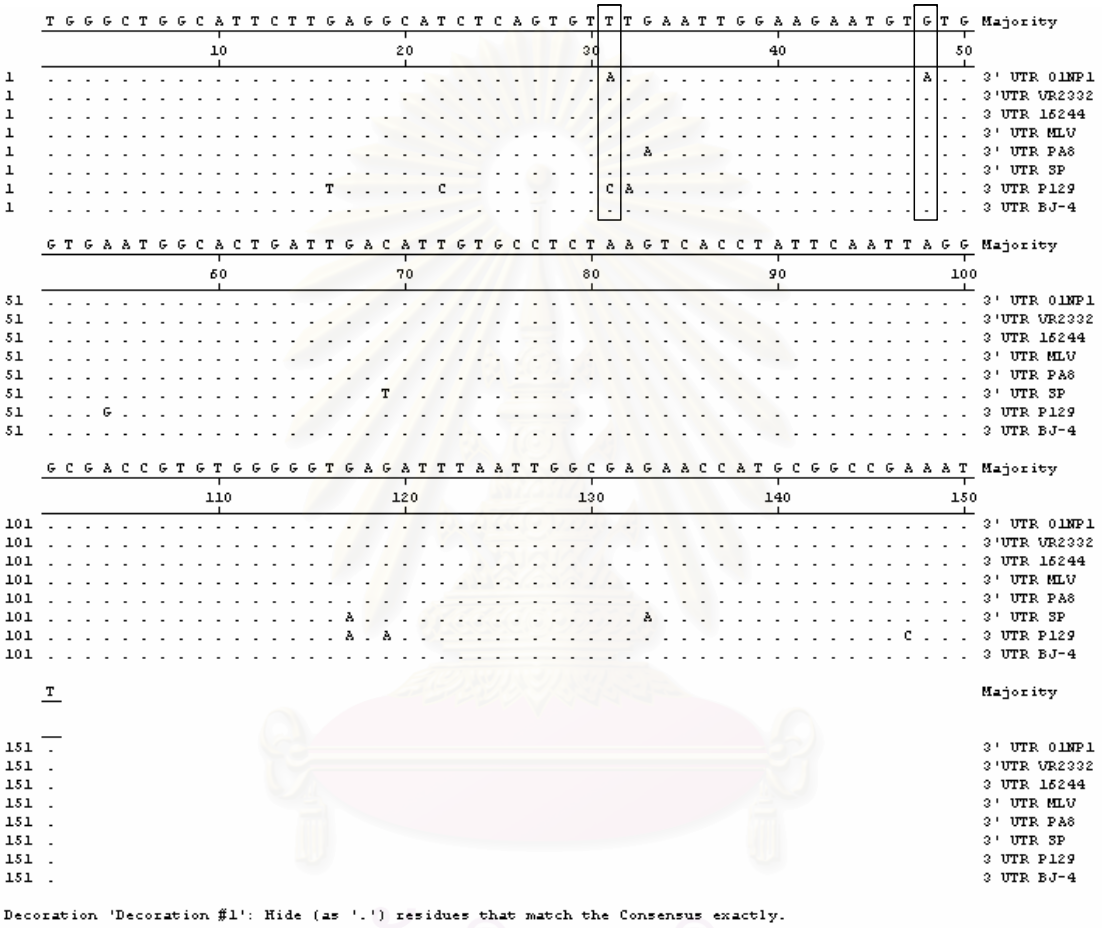
การวิจัยครั้งนี้ไม่ได้หาจำนวนของ poly (A) tail ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในการศึกษาในต่างประเทศ พบว่าความยาวของ poly (A) tail มีความยาวไม่แน่นอน เช่น 17 bp (16244B) (Allende et al., 1999), 72 bp (PA8) (Wootton et al., 2000)

ภาพที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสที่บริเวณ 5’ UTR ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่ไม่มีลำดับเบสจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash) บริเวณที่เป็น polymorphic site ของกรดอะมิโนของเชื้อไวรัส 01NP1 ได้แสดงไว้ในกรอบ (box)



หมายเหตุ: เชื้อไวรัสสายพันธุ์ LV ซึ่งเป็นสายพันธุ์ยุโรปไม่ได้นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ

ภาพที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสที่บริเวณ 3’ UTR ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่ไม่มีลำดับเบสจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash) บริเวณที่เป็น polymorphic site ของกรดอะมิโนของเชื้อไวรัส 01NP1 ได้แสดงไว้ในกรอบ (box)



หมายเหตุ: เชื้อไวรัสสายพันธุ์ LV ซึ่งเป็นสายพันธุ์ยุโรปไม่ได้นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ

Non-structural genes (ORF1a และ ORF1b)

ORF1a ของเชื้อไวรัส 01NP1 มีขนาด 7512 bp ซึ่งสร้าง (encode) โปรตีนขนาด 2503 กรดอะมิโน โดยโปรตีน ORF1a เป็น replicase polyprotein ซึ่งมี cleavage site หลายแห่ง ทำให้ได้โปรตีนย่อยจำนวน 9 ตัว ส่วน ORF1b มีขนาด 4392 bp ซึ่งสร้างโปรตีนขนาด 1463 กรดอะมิโน โดยโปรตีน ORF1b เป็น replicase polyprotein เช่นกัน และมีโปรตีนย่อยจำนวน 4 ตัว ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ORF1a และ ORF1b พบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีความเหมือนกับเชื้อสายพันธุ์กลุ่มอเมริกาทั้งในระดับนิวคิวโอไทด์และกรดอะมิโนมากกว่า 90% รายละเอียดผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ORF1a และ ORF1b ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของ ORF1a พบว่า เชื้อไวรัส 01NP1 มีความใกล้เคียงสูงกับเชื้อไวรัส MLV, VR2332, และ BJ-4 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัส SP ซึ่งเป็นสายพันธุ์วัคซีนของประเทศสิงคโปร์ มี ORF1a โปรตีนที่ยาวกว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่น (2539 amino acids) เนื่องจากมี insertion ที่บริเวณกรดอะมิโนที่ 1196-1232 (ภาพที่ 7) เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของ ORF1b พบว่า ORF1b ของเชื้อไวรัส 01NP1 มีความใกล้เคียงสูงกับเชื้อไวรัส MLV (99.9%), VR2332 (99.8%) และ BJ-4 (99.8%) (ภาพที่ 8)

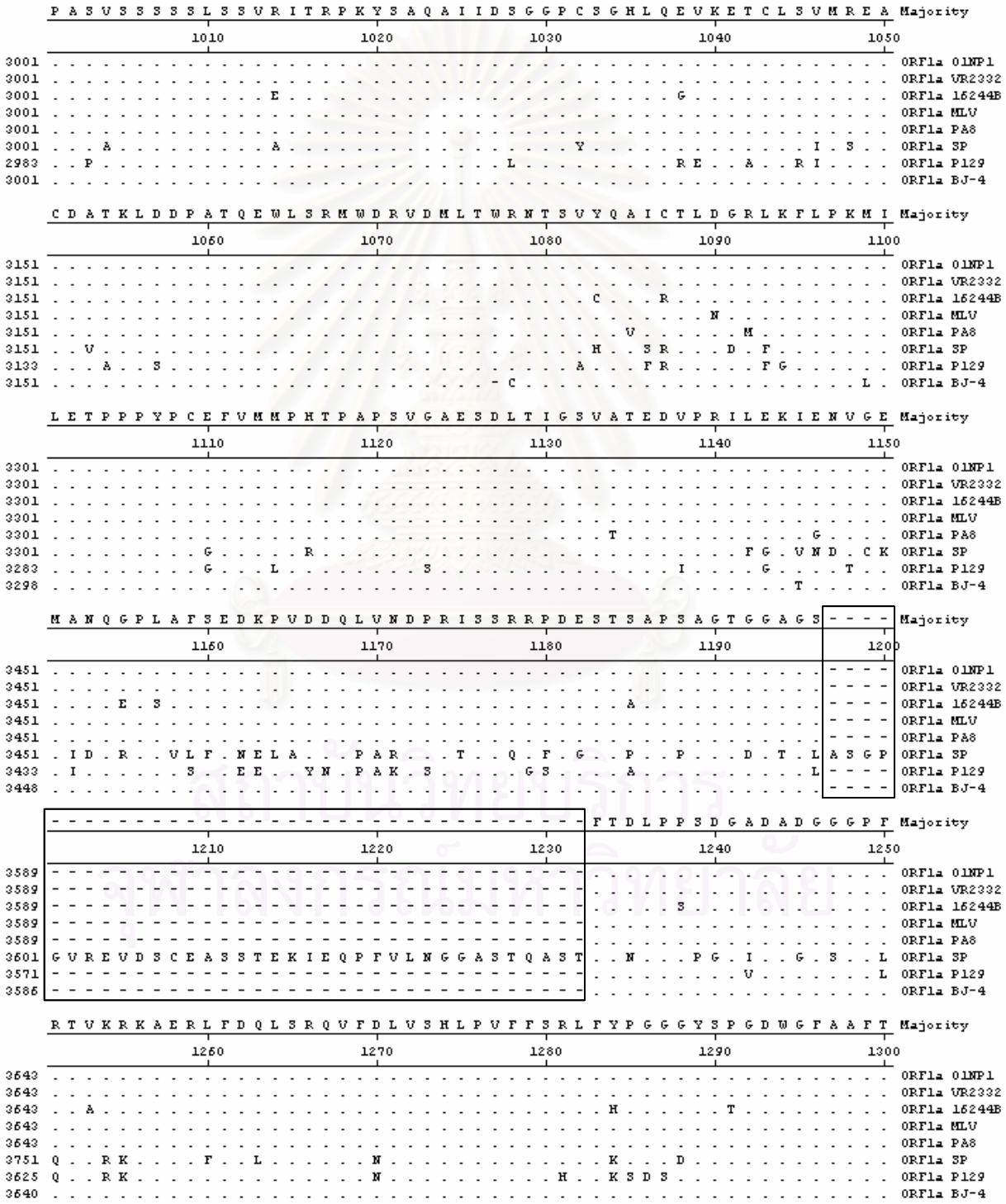
เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของ ORF1b พบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มี polymorphic site (amino acid different) ในโปรตีน ORF1b น้อยกว่าโปรตีน ORF1a (ORF1a มี 9 แห่ง และ ORF1b มี 4 แห่ง) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ORF1b มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสและกรดอะมิโนน้อยกว่า ORF1a (more conserved) แสดงถึงความคงที่ของยีน ORF1b ในขณะที่ ORF1a ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อเมริกาบางสายพันธุ์ เช่น SP มีกรดอะมิโนเพิ่ม (unique insertion) และมี polymorphic site เป็นจำนวนมาก ที่บริเวณ Nsp2 แสดงถึงความไม่คงที่ หรือการมีวิวัฒนาการของ ORF1a โดยเฉพาะบริเวณ Nsp2 รายละเอียดผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF1a และ ORF1b ได้แสดงไว้ในภาพประกอบที่ 7 และ 8

ตารางที่ 5 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ORF1a และ ORF1b ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในรูปของ % nucleotide identity และ % amino acid identity

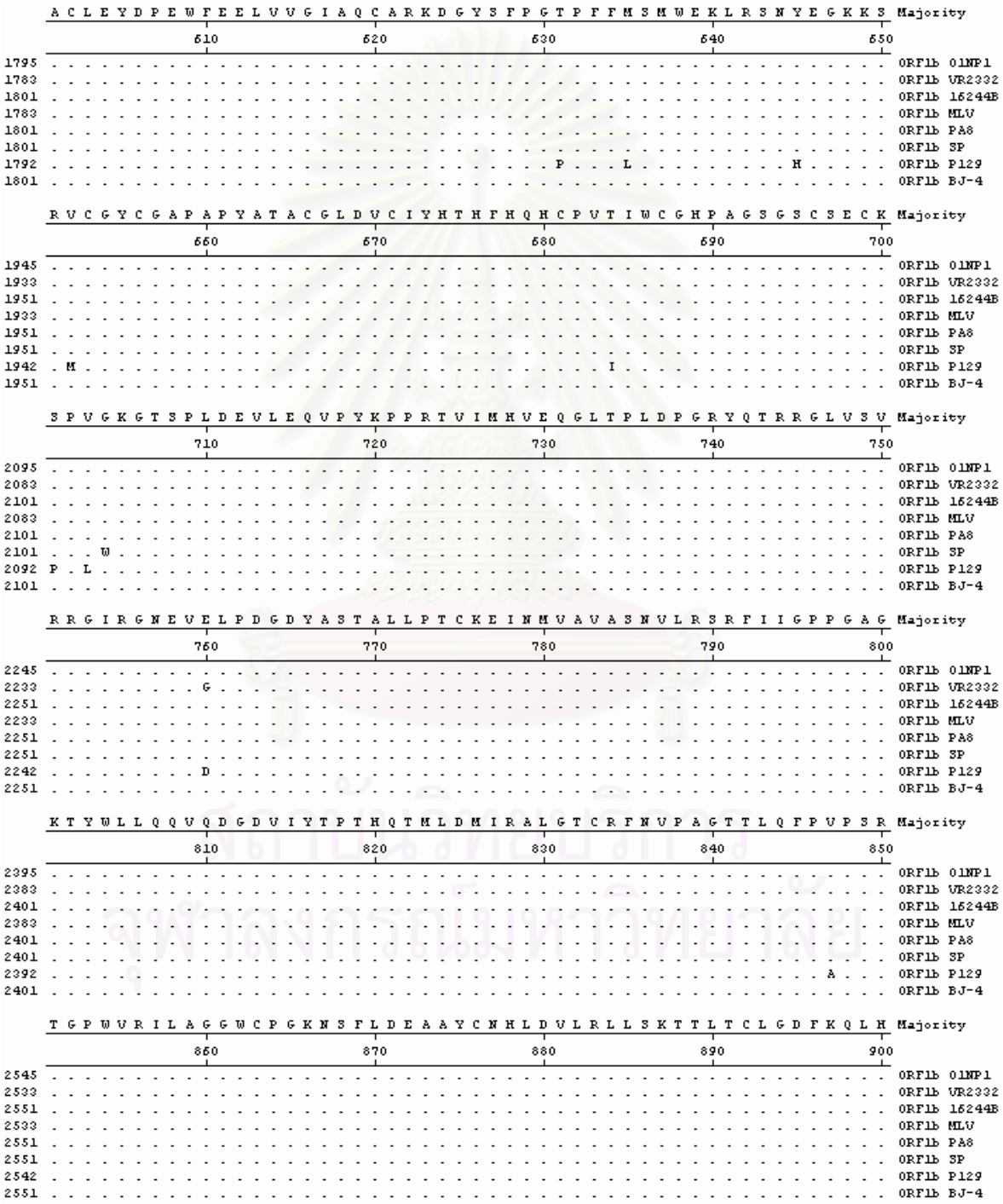
	เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่เปรียบเทียบ % nucleotide identity (% amino acid identity)							
ORF1a								
	01NP1	VR2332	16244B	MLV	PA8	SP	P129	BJ4
01NP1	100 (100)	99.8 (99.6)	98.4 (97.8)	99.9 (99.7)	99.3 (99.1)	92.2 (91.5)	89.6 (88.8)	99.5 (99.2)
VR2332		100 (100)	98.4 (97.8)	99.9 (99.6)	99.3 (99.1)	92.3 (91.7)	89.7 (89.0)	99.5 (99.1)
16244B			100 (100)	98.4 (97.8)	98.0 (97.4)	91.3 (90.8)	88.9 (88.3)	98.0 (97.3)
MLV				100 (100)	99.3 (99.1)	92.2 (91.5)	89.6 (88.8)	99.5 (99.2)
PA8					100 (100)	91.8 (91.1)	89.4 (88.7)	98.9 (98.6)
SP						100 (100)	88.6 (87.5)	91.9 (91.1)
P129							100 (100)	89.3 (88.3)
BJ4								100 (100)
ORF1b								
	01NP1	VR2332	16244B	MLV	PA8	SP	P129	BJ4
01NP1	100 (100)	99.8 (99.3)	98.8 (99.2)	99.9 (99.8)	99.4 (99.3)	96.0 (98.3)	92.8 (97.3)	99.8 (99.7)
VR2332		100 (100)	98.6 (99.1)	99.7 (99.5)	99.2 (99.2)	96.0 (98.3)	92.9 (97.3)	99.6 (99.4)
16244B			100 (100)	98.8 (99.5)	98.4 (99.1)	95.3 (98.4)	92.4 (97.3)	99.7 (99.3)
MLV				100 (100)	99.5 (99.5)	96.0 (98.5)	92.9 (97.5)	99.9 (99.9)
PA8					100 (100)	95.8 (98.1)	92.7 (97.1)	99.4 (99.4)
SP						100 (100)	92.9 (97.3)	95.9 (98.4)
P129							100 (100)	92.9 (97.3)
BJ4								100 (100)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF1a ที่บริเวณตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1000-1300 กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่ไม่มีกรดอะมิโนจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash) บริเวณที่มี insertion ของกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ SP ได้แสดงไว้ในกรอบ (box)



ภาพที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF1b ที่บริเวณตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 600-900 กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่กรดอะมิโนจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash)



Structural genes (ORF2-7)

ORF2-7 ของเชื้อไวรัส 01NP1 มีขนาดประมาณ 3 kp ซึ่งสร้าง structural protein ที่ประกอบด้วย envelop protein (ORF2-5) matrix protein (ORF6) และ nucleocapsid protein (ORF7) ORF2-5 มีขนาด 771 bp (256 aa), 765 bp (254 aa), 537 bp (178 aa) และ 603 bp (200 aa) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของ ORF2-5 พบว่า ORF2-5 ของเชื้อไวรัส 01NP1 มีความใกล้เคียงกับ ORF2-5 ของเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา รายละเอียดผลการเปรียบเทียบ
ลำดับเบสของ ORF2-5 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6

ภาพที่ 9-12 แสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF2-5 ซึ่งแสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (polymorphic site) ของเชื้อไวรัส 01NP1 กับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา โดยเฉพาะเชื้อไวรัส VR2332 และ BJ-4 ผลการวิจัยโดยส่วนใหญ่พบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีลำดับกรดอะมิโนที่เป็นกรดอะมิโนส่วนใหญ่ (consensus) ของเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา อย่างไรก็ตาม พบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มี polymorphic site ที่ ORF2 1 ตำแหน่ง (เปลี่ยนจาก L; Leucine (consensus) เป็น F; Phenylalanine) และ ORF5 1 ตำแหน่ง (เปลี่ยนจาก R; Arginine เป็น G; Glycine) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า structural protein (ORF2-5) ซึ่งในส่วนที่เป็น envelop protein มีความคงตัวและมีลักษณะของเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาสูง (conserved) โดยเฉพาะเชื้อไวรัส 01NP1 มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากและยังมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส VR2332 ซึ่งเป็นต้นแบบสายพันธุ์วัคซีน

ORF6 มีขนาด 525 bp สร้างโปรตีนขนาด 174 กรดอะมิโน ซึ่งเป็น matrix protein เชื้อไวรัส 01NP1 มีลำดับเบสของ ORF6 คล้ายกับเชื้อไวรัส BJ-4 (99.4%), MLV (99.4%) และ VR2332 (99.2%) (ตารางที่ 6) ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF6 ได้แสดงไว้ในภาพที่ 13 ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มี polymorphic site 2 ตำแหน่ง (เปลี่ยนจาก Q; Glutamine เป็น E; Glutamic acid และ เปลี่ยนจาก F; Phenylalanine เป็น C; Cysteine)

ORF7 เป็นยีนที่สร้าง nucleocapsid protein โดย ORF7 มีขนาด 372 bp (123 amino acids) ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโน พบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีลำดับเบสและกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (100% identity) กับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาหลายสายพันธุ์ เช่น VR2332, MLV และ BJ-4 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบในระดับกรดอะมิโนยังพบ 100% amino acid identity กับเชื้อไวรัส 16244B และ PA8 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนของลำดับเบสที่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนหรือสร้าง

ตารางที่ 6 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ORF2-7 ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในรูปของ % nucleotide identity และ % amino acid identity

	เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่เปรียบเทียบ % nucleotide identity (% amino acid identity)							
ORF2								
	01NP1	VR2332	16244B	MLV	PA8	SP	P129	BJ4
01NP1	100 (100)	99.6 (99.6)	98.4 (98.8)	99.4 (98.8)	99.5 (98.8)	93.6 (94.1)	95.3 (94.9)	99.7 (99.6)
VR2332		100 (100)	98.6 (99.2)	99.5 (98.4)	99.6 (99.2)	94.0 (94.5)	95.7 (94.9)	99.6 (99.2)
16244B			100 (100)	98.3 (98.4)	98.4 (98.4)	92.9 (94.1)	94.4 (94.1)	98.7 (99.2)
MLV				100 (100)	99.1 (97.7)	93.5 (93.0)	95.2 (93.8)	99.6 (99.2)
PA8					100 (100)	93.6 (93.8)	95.3 (94.1)	99.5 (98.4)
SP						100 (100)	93.3 (93.0)	93.6 (93.8)
P129							100 (100)	95.3 (94.5)
BJ4								100 (100)
ORF3								
	01NP1	VR2332	16244B	MLV	PA8	SP	P129	BJ4
01NP1	100 (100)	99.3 (98.8)	98.7 (98.0)	99.6 (99.2)	99.3 (99.6)	90.5 (87.4)	91.5 (89.8)	100 (100)
VR2332		100 (100)	98.3 (97.6)	99.5 (98.8)	99.0 (98.4)	90.3 (87.0)	91.2 (89.4)	99.3 (98.8)
16244B			100 (100)	98.3 (97.2)	98.0 (97.6)	89.2 (85.8)	91.0 (89.8)	98.7 (98.0)
MLV				100 (100)	99.2 (98.8)	90.3 (87.4)	90.8 (89.0)	99.6 (99.2)
PA8					100 (100)	89.7 (87.0)	90.7 (89.4)	99.3 (99.6)
SP						100 (100)	90.1 (89.0)	90.5 (87.4)
P129							100 (100)	91.5 (89.8)
BJ4								100 (100)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ORF2-7 ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในรูปของ % nucleotide identity และ % amino acid identity (ต่อ)

	เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่เปรียบเทียบ % nucleotide identity (% amino acid identity)							
ORF4								
	01NP1	VR2332	16244B	MLV	PA8	SP	P129	BJ4
01NP1	100 (100)	99.8 (99.4)	99.4 (99.4)	99.4 (98.3)	99.1 (98.3)	93.5 (91.0)	91.8 (91.6)	99.8 (99.4)
VR2332		100 (100)	99.3 (98.9)	99.6 (98.9)	99.3 (98.9)	93.3 (90.4)	91.6 (91.0)	99.6 (98.9)
16244B			100 (100)	98.9 (97.8)	98.9 (97.8)	92.9 (90.4)	91.4 (91.0)	99.3 (98.9)
MLV				100 (100)	98.9 (97.8)	92.9 (89.3)	91.1 (89.9)	99.3 (97.8)
PA8					100 (100)	92.4 (89.3)	90.9 (89.9)	98.9 (97.8)
SP						100 (100)	93.5 (93.3)	93.1 (90.4)
P129							100 (100)	91.6 (91.0)
BJ4								100 (100)
ORF5								
	01NP1	VR2332	16244B	MLV	PA8	SP	P129	BJ4
01NP1	100 (100)	99.5 (99.0)	97.3 (98.0)	99.8 (100)	98.8 (97.5)	89.7 (92.0)	89.9 (90.5)	99.3 (99.0)
VR2332		100 (100)	97.8 (99.0)	99.7 (99.0)	99.0 (97.5)	90.2 (93.0)	90.4 (91.5)	99.2 (98.0)
16244B			100 (100)	97.5 (98.0)	96.8 (96.5)	89.2 (93.0)	89.7 (91.5)	97.0 (97.0)
MLV				100 (100)	99.0 (97.5)	89.9 (92.0)	90.0 (90.5)	99.5 (99.0)
PA8					100 (100)	89.9 (91.5)	89.7 (90.5)	98.5 (96.5)
SP						100 (100)	92.4 (94.5)	89.4 (91.0)
P129							100 (100)	89.6 (89.5)
BJ4								100 (100)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

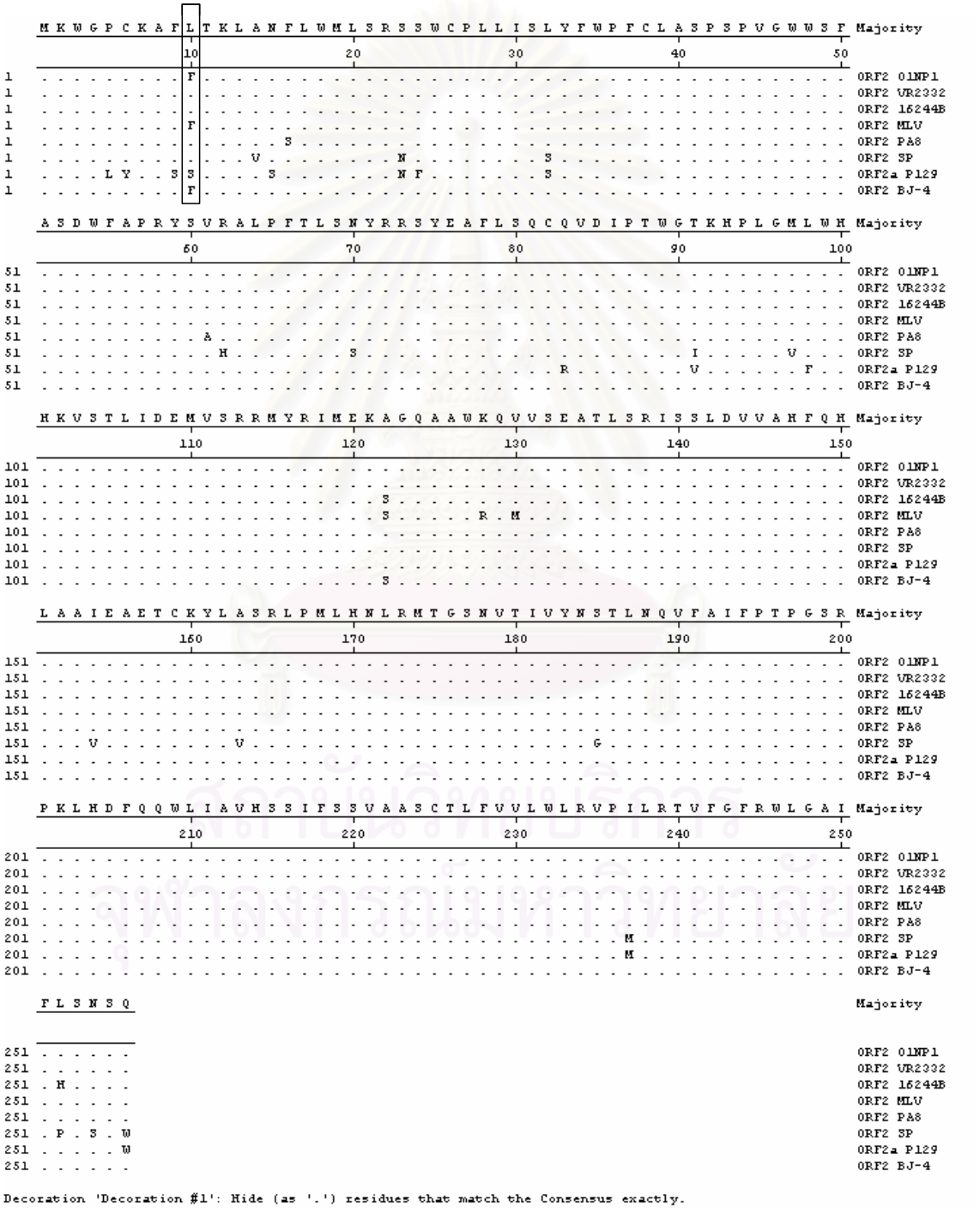
ตารางที่ 6 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ORF2-7 ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในรูปของ % nucleotide identity และ % amino acid identity (ต่อ)

	เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่เปรียบเทียบ % nucleotide identity (% amino acid identity)							
ORF6								
	01NP1	VR2332	16244B	MLV	PA8	SP	P129	BJ4
01NP1	100 (100)	99.2 (98.3)	97.9 (98.3)	99.4 (99.4)	98.9 (98.3)	93.7 (96.0)	95.2 (97.7)	99.4 (99.4)
VR2332		100 (100)	98.1 (98.9)	99.2 (98.9)	99.0 (98.9)	94.1 (96.6)	95.4 (98.3)	99.2 (98.9)
16244B			100 (100)	98.5 (98.9)	98.3 (98.9)	93.9 (96.6)	95.0 (98.9)	98.5 (98.9)
MLV				100 (100)	99.4 (98.9)	94.3 (96.6)	95.8 (98.3)	100 (100)
PA8					100 (100)	94.3 (96.6)	95.8 (98.3)	99.4 (98.9)
SP						100 (100)	93.5 (97.1)	94.3 (96.6)
P129							100 (100)	95.8 (98.3)
BJ4								100 (100)
ORF7								
	01NP1	VR2332	16244B	MLV	PA8	SP	P129	BJ4
01NP1	100 (100)	100 (100)	99.7 (100)	100 (100)	99.7 (100)	95.7 (98.4)	94.9 (96.7)	100 (100)
VR2332		100 (100)	99.7 (100)	100 (100)	99.7 (100)	95.7 (98.4)	94.9 (96.7)	100 (100)
16244B			100 (100)	99.7 (100)	99.5 (100)	95.4 (98.4)	94.6 (96.7)	99.7 (100)
MLV				100 (100)	99.7 (100)	95.7 (98.4)	94.9 (96.7)	100 (100)
PA8					100 (100)	95.2 (98.4)	94.4 (96.7)	99.7 (100)
SP						100 (100)	93.3 (96.7)	95.7 (98.4)
P129							100 (100)	94.9 (96.7)
BJ4								100 (100)

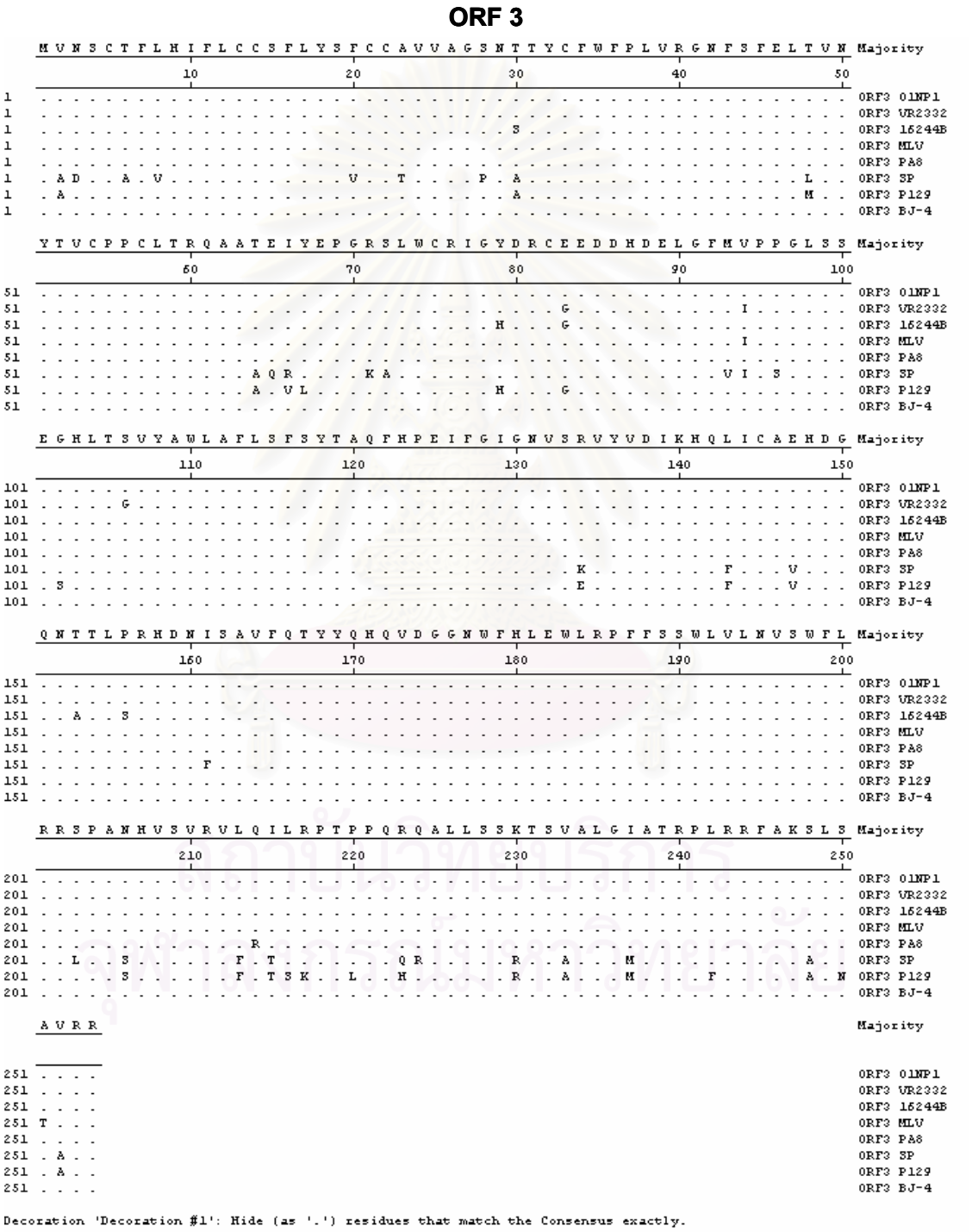
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF2 (กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่ไม่มีกรดอะมิโนจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash) บริเวณที่เป็น polymorphic site ของเชื้อไวรัส 01NP1 ได้แสดงไว้ในกรอบ (box))

ORF 2

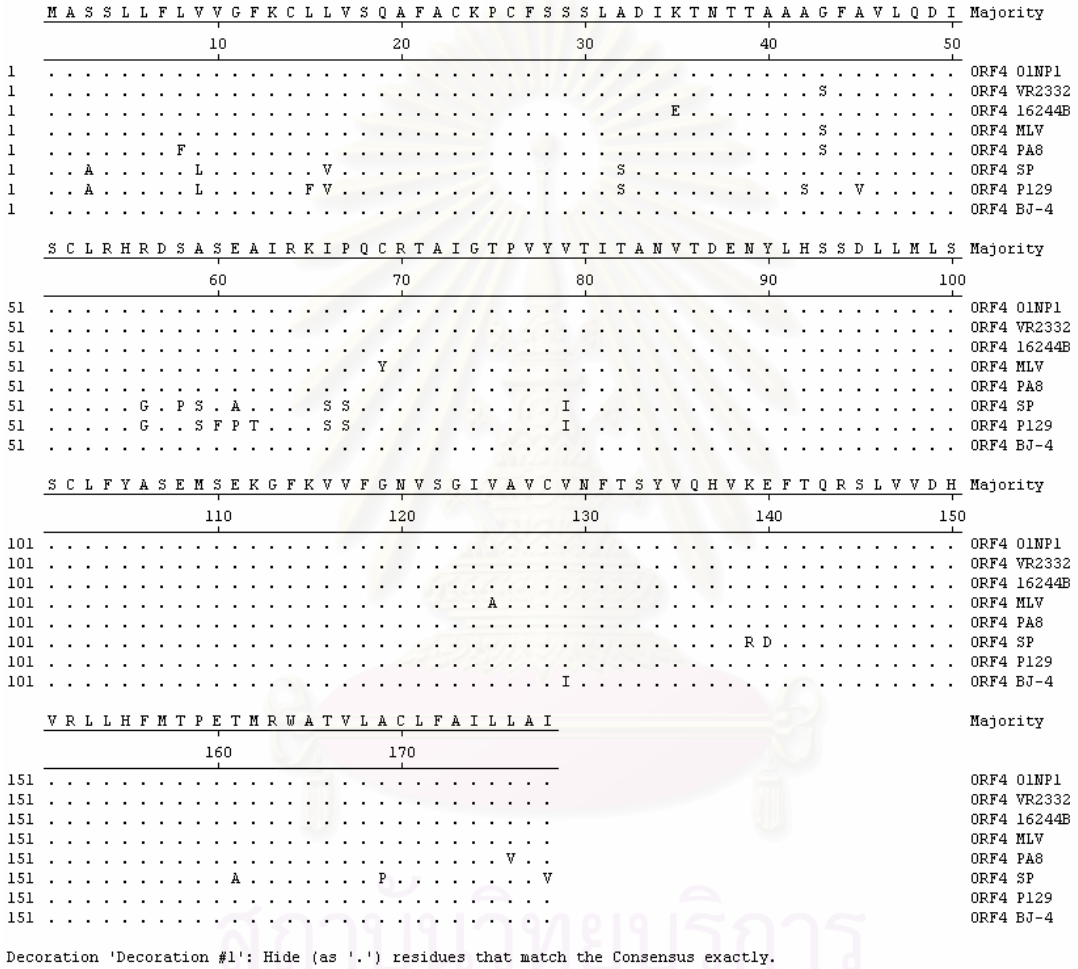


ภาพที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF3 (กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่ไม่มีกรดอะมิโนจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash) เชื้อไวรัส 01NP1 ไม่มีบริเวณที่เป็น polymorphic site

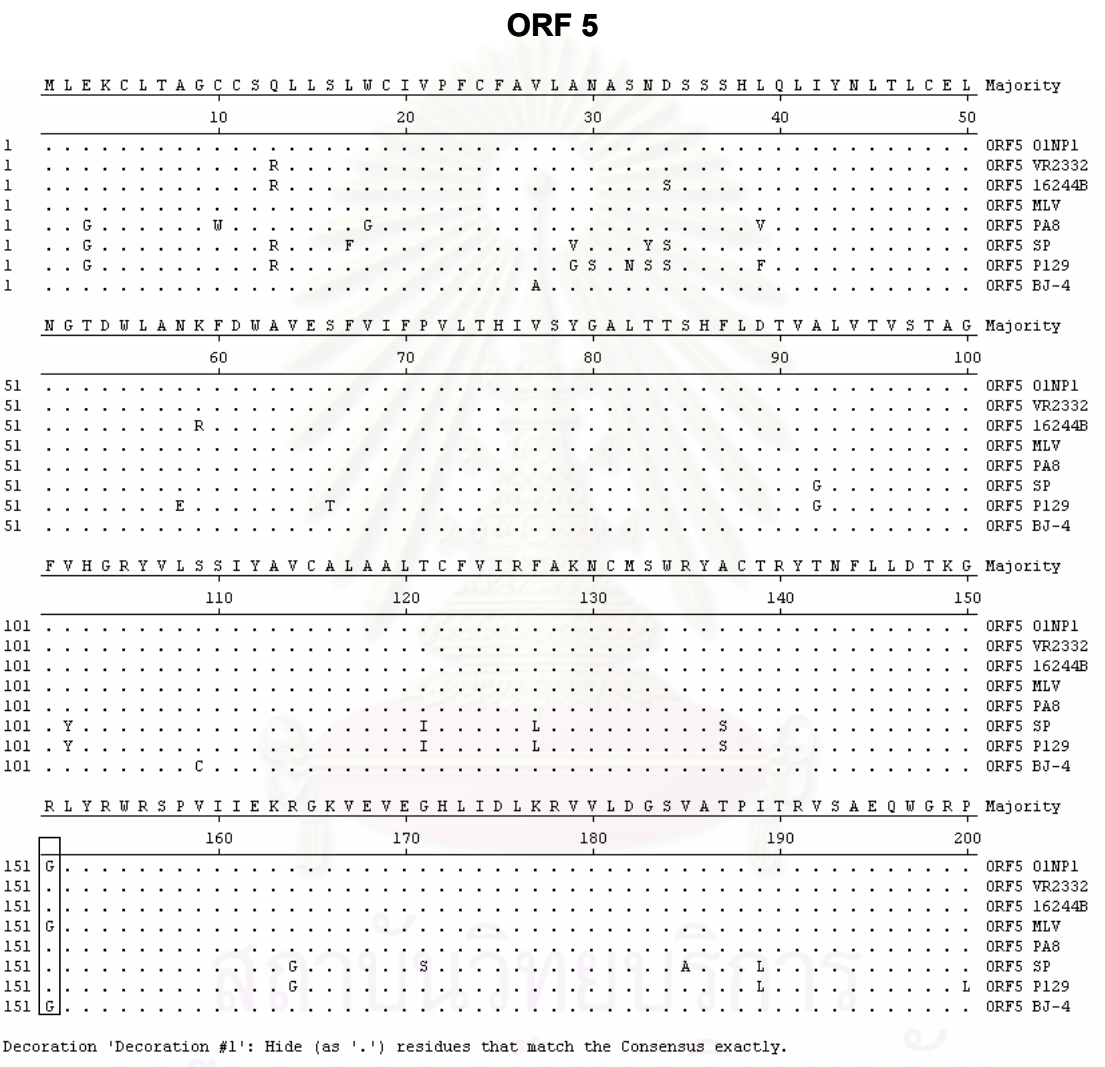


ภาพที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF4 (กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่ไม่มีกรดอะมิโนจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash) เชื้อไวรัส 01NP1 ไม่มีบริเวณที่เป็น polymorphic site

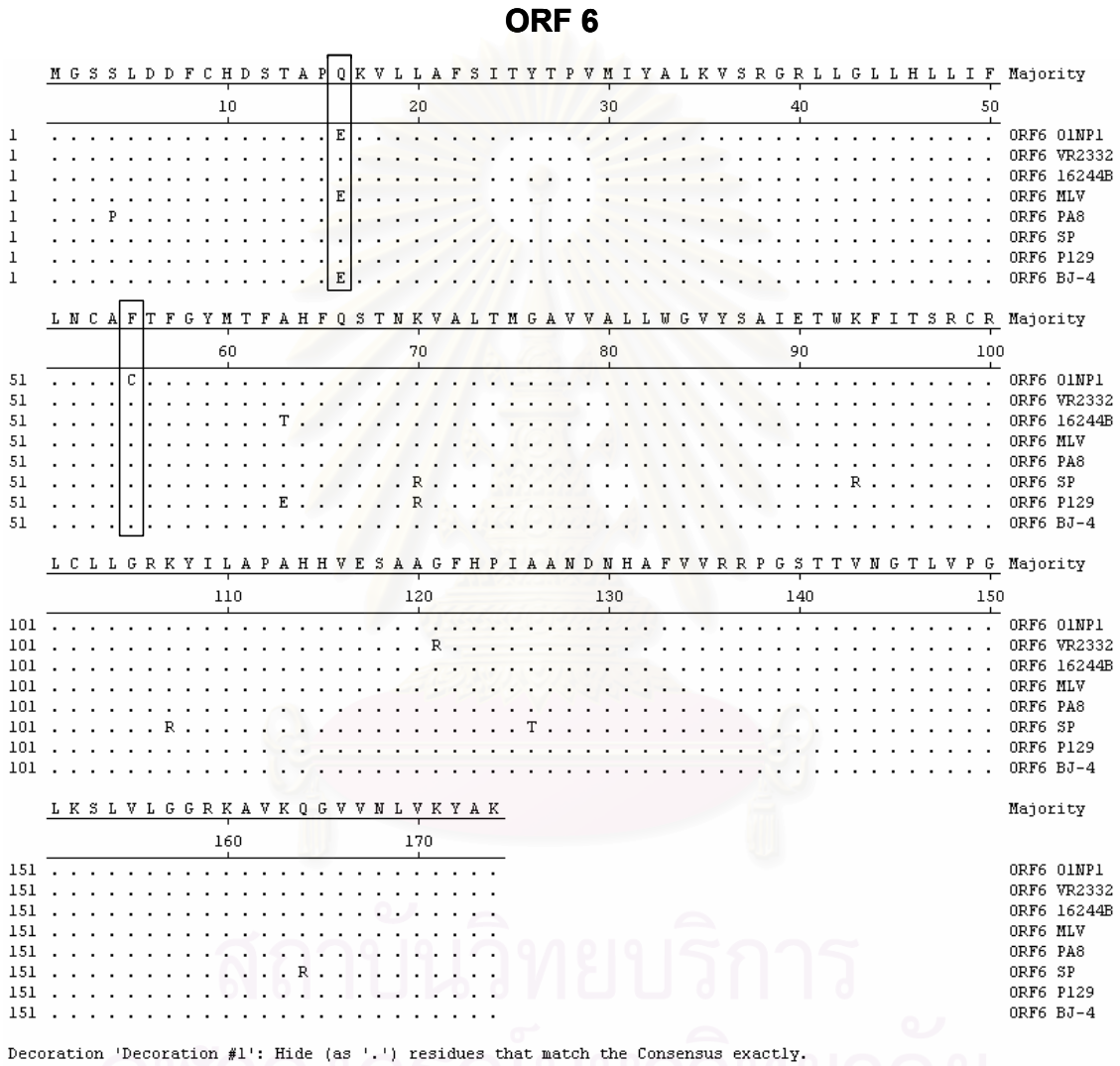
ORF 4



ภาพที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF5 (กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่ไม่มีกรดอะมิโนจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash) บริเวณที่เป็น polymorphic site ของเชื้อไวรัส 01NP1 ได้แสดงไว้ในกรอบ (box))

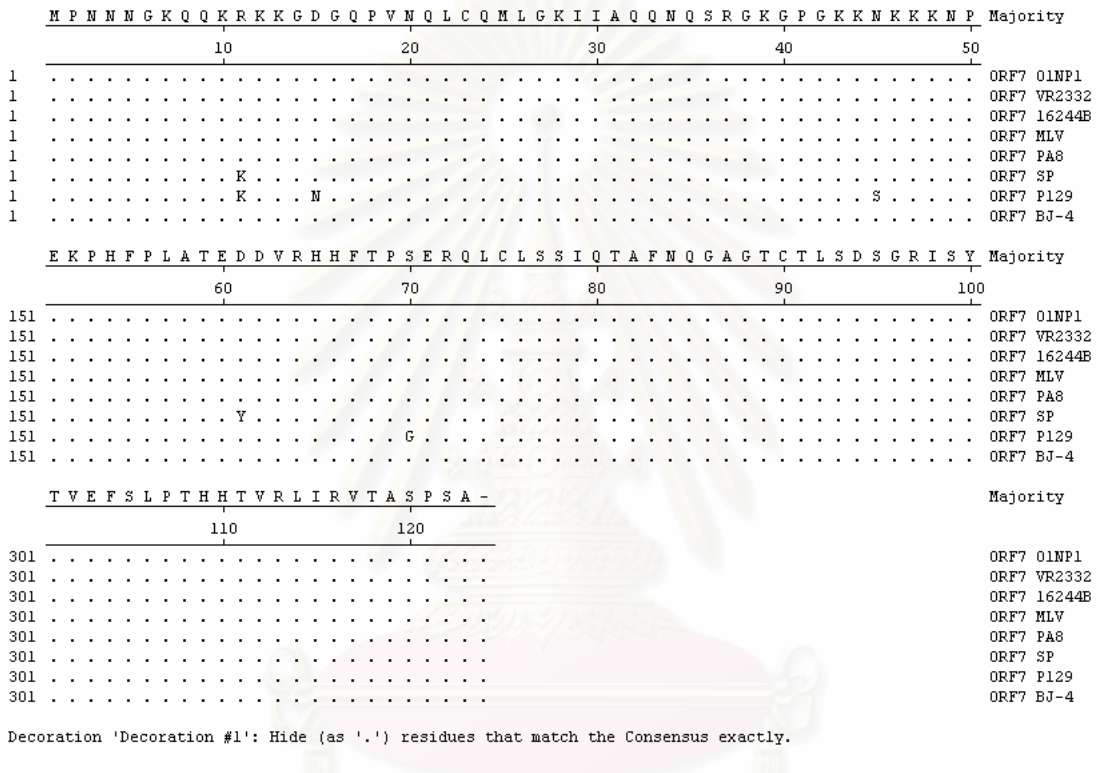


ภาพที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF6 (กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่ไม่มีกรดอะมิโนจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash) บริเวณที่เป็น polymorphic site ของเชื้อไวรัส 01NP1 ได้แสดงไว้ในกรอบ (box))



ภาพที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ ORF7 (กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันจะแสดงโดยเครื่องหมายจุด (dot) บริเวณที่ไม่มีกรดอะมิโนจะแสดงโดยเครื่องหมายขีด (dash) เชื้อไวรัส 01NP1 ไม่มีบริเวณที่เป็น polymorphic site

ORF 7



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

โรค porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โรคนี้เป็นโรคในสุกรทั้งในสุกรขุนและพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร (Done et al., 1996; Prieto and Castro, 2005; Rossow, 1998) ในประเทศไทยมีรายการการสำรวจอุบัติการณ์ของโรคพี อาร์ อาร์ เอส ในสุกร โดยพบว่าในปี ค.ศ. 1999 มีสุกรติดเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส มากถึง 80% (Thanawongnuwech et al., 2002) การวิจัยครั้งนี้ได้หาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย 01NP1 ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรครุนแรงในสุกร และนำลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส 01NP1 ที่ได้ มาศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อเหล่านี้ ผลการวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบและเข้าใจถึงลักษณะ (characterization) และวิวัฒนาการ (evolution) ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย

การวิจัยครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีรายงานลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย ซึ่งผลการหาลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย 01NP1 มีขนาด 15412 bp และได้ข้อมูลเหล่านี้นำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank (GenBank accession # DQ056373) จากการวิจัยพบว่าขนาดของเชื้อไวรัส 01NP1 ใกล้เคียงกับขนาดของเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา เช่น เชื้อไวรัส VR2332 (เชื้อต้นแบบสายพันธุ์อเมริกา) มีขนาด 15,411 bp (Nelsen et al., 1999) เชื้อไวรัส 16244B (field strain; USA) มีขนาด 15,411 bp (Allende et al., 1999) เชื้อไวรัส MLV (vaccine strain RespPRRS ที่พัฒนามาจาก VR2332) มีขนาด 15412 bp (Opriessnig et al., 2002) เชื้อไวรัส PA8 (field strain; Canada) มีขนาด 15,411 bp (Wootton et al., 2000) เชื้อไวรัส SP (vaccine strain; PRIME PAC PRRS; Singapore) มีขนาด 15,520 bp (Shen et al., 2000) เชื้อไวรัส P129 (infectious clone สำหรับพัฒนาวัคซีน; Pfizer USA) มีขนาด 15395 bp และ เชื้อไวรัส BJ-4 (field strain; China) มีขนาด 15,410 bp ในขณะที่เชื้อไวรัสสายพันธุ์กลุ่มยุโรป เช่น เชื้อไวรัส LV (เชื้อต้นแบบสายพันธุ์ยุโรป) มีขนาดสั้นกว่าคือ 15,101 bp (Meulenberg et al., 1993; Meulenberg et al., 1995)

โครงสร้างจีนโนมของเชื้อไวรัส 01NP1 ประกอบด้วย open reading frames (ORFs) จำนวน 8 ORFs คือ ORF1a และ ORF1b ซึ่งเป็นยีนขนาดใหญ่ มีขนาดรวมกันมากกว่า 70% ของลำดับเบสทั้งหมด โปรตีนของ ORF1 a/b เป็น replicase polyprotein ซึ่งแบ่งเป็นโปรตีนย่อยได้ 13 ตัว (Nsp1a/b –Nsp12) ส่วน ORF2-7 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ structural protein โดยโปรตีนของ ORF2-5

เป็น envelop protein ORF6 เป็น matrix protein และ ORF7 เป็น nucleocapsid protein การวิจัยครั้งนี้พบว่า
เชื้อไวรัส 01NP1 มีโครงสร้างจีนโนมเหมือนกับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในรายงานจากต่างประเทศ (Allende et al., 1999; Shen et al., 2000; Wootton et al., 2000; Yuan et al., 2001) อย่างไรก็ตาม บางรายงานพบว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์เอส มี ORF2b ซึ่งเป็นยีนขนาดเล็กที่มีตำแหน่งของยีนอยู่ภายใน ORF2a แต่ยังไม่สามารถระบุถึงชนิดและหน้าที่ของโปรตีนได้ (Wootton et al., 2000)

นอกจากยีนที่สร้างโปรตีนแล้ว เชื้อไวรัส 01NP1 ประกอบด้วย untranslated region ที่บริเวณส่วนต้น และส่วนท้ายของ genome คือ 5’ UTR (5’ untranslated region) ขนาด 189 bp และ 3’ UTR ขนาด 152 bp และมี poly A tail การวิจัยครั้งนี้ไม่ได้หา poly A-tail ของเชื้อไวรัส 01NP1 ในขณะที่บางรายงานในต่างประเทศได้รายงานจำนวนของ poly A-tail ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส แต่จำนวนของ poly-A tail อาจไม่แสดงถึงจำนวนของ A ที่เป็นจริงของเชื้อในธรรมชาติ (แต่แสดงถึงจำนวน A ของเชื้อขณะที่มีการติดเชื้อในร่างกาย) อย่างไรก็ตามข้อมูลของ poly-A tail จะมีประโยชน์ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานในกรณีที่มีการพัฒนาวัคซีนต่อไป เช่นการสร้าง infectious clone ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส (Nielsen et al., 2003; Wootton et al., 2000)

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส 01NP1 กับเชื้อไวรัสสายพันธุ์กลุ่มอเมริกาและยุโรป พบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา โดยเฉพาะเชื้อไวรัส MLV (99.8%) VR2332 (99.7%) และ BJ4 (99,7%) ในขณะที่มีลำดับเบสเหมือนกับเชื้อ LV เพียง 59.9% เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส 01NP1 โดยวิธี phylogenetic analysis ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 อยู่ในกลุ่ม (cluster) สายพันธุ์อเมริกา และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ BJ-4, MLV และ VR2332 ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัส 01NP1 ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสที่ทำให้เกิดโรคในสุกรในประเทศไทย เป็นเชื้อที่มีวิวัฒนาการจากเชื้อไวรัสที่เป็นวัคซีน (vaccine strain) เช่น MLV แล้วมีวิวัฒนาการจากเชื้อที่ไม่มีความรุนแรง (non-virulence) ไปเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงและทำให้เกิดโรค (virulence) ในขณะที่เดียวกันเชื้อ 01NP1 ก็มีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในภูมิภาคเดียวกันเช่น BJ-4 ซึ่งเป็น field strain จากประเทศจีน (Gao et al., 2004) ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Wootton et al., 2000 ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัส PA8 ซึ่งเป็น field strain จากประเทศแคนาดา มีวิวัฒนาการมาจากเชื้อไวรัสที่เป็นวัคซีน RespPRRS เช่นเดียวกัน (Wootton et al., 2000)

ผลการเปรียบเทียบในแต่ละส่วนของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส เช่น untranslated region (5' UTR และ 3' UTR), ORF1-7 พบว่าโดยส่วนใหญ่เชื้อไวรัส 01NP1 โดยส่วนใหญ่มีความใกล้เคียงกับเชื้อ BJ-4 ซึ่งเป็น field strain ในภูมิภาคเดียวกัน และ ใกล้เคียงกับเชื้อที่เป็นวัคซีน (MLV) หรือต้นแบบวัคซีน (VR2332) โดยสรุปผลการวิจัยโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนพบว่าเชื้อไวรัส 01NP1 มีความใกล้เคียงและไม่เปลี่ยนแปลงจากเชื้อกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา โดยมี polymorphic site (amino acid different) ไม่มาก เช่นที่ ORF2 และ ORF5 มี polymorphic site 1 แห่ง ส่วน ORF6 มี polymorphic site 2 แห่ง และ ORF1a และ ORF1b มี polymorphic site จำนวนมากกว่า (ORF1a มี 9 แห่ง และ ORF1b มี 4 แห่ง) ซึ่งจากรายงานในต่างประเทศพบว่าบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสและกรดอะมิโนสูง (variable region) คือ ORF1a (Nsp2) และ ORF5 (Shen et al., 2000; Wootton et al., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยครั้งนี้ที่พบว่าบริเวณ ORF1a เป็นบริเวณที่มี polymorphic site มากสุด โดยเฉพาะบริเวณ Nsp2 ดังนั้นการใช้ Nsp2 เป็น genetic marker ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส รวมทั้งการใช้บริเวณดังกล่าวในการตรวจพิสูจน์ที่มาของเชื้อ (differential diagnosis) (Grebennikova et al., 2004; Shen et al., 2000; Yang et al., 1998) จะช่วยในการควบคุมและป้องกันโรคพี อาร์ อาร์ เอสในสุกรต่อไปในอนาคต

โดยสรุปผลการวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย 01NP1 ทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ 01NP1 กับเชื้อในกลุ่มสายพันธุ์อเมริกาและยุโรป และทราบลักษณะทางพันธุกรรม ความเหมือน ความแตกต่างในระดับยีนของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอสในประเทศไทย จุดเด่นสำคัญของการวิจัยครั้งนี้ คือ ทราบลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป และทราบวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทยว่าน่าจะพัฒนามาจากเชื้อสายพันธุ์วัคซีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทยที่มีการรายงานลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย
2. ผลการวิจัยครั้งนี้ได้ลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์เอส สายพันธุ์ไทย “01NP1” ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากสุกรที่ป่วยเป็นโรค
3. ลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส 01NP1 มีขนาด 15,412 bp ประกอบด้วย open reading frames (ORFs) จำนวน 8 ORFs คือ ORF1a, OF1b, ORF2-7 แต่ละ ORF จะสร้างโปรตีน คือ ORF1a และ ORF1b สร้าง replicase polyprotein ส่วน ORF2-5 สร้าง envelop protein ส่วน ORF6 สร้าง matrix protein และ ORF7 สร้าง nucleocapsid protein
4. ข้อมูลลำดับเบสและโปรตีนของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์เอส สายพันธุ์ไทย “01NP1” ได้นำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อนักวิทยาศาสตร์ ในการศึกษาวิจัยเชิงลึกเกี่ยวกับเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ต่อไป (GenBank accession number: DQ056373) (ภาคผนวก ค)
5. ผลของการเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย กับเชื้อไวรัสกลุ่ม สายพันธุ์อเมริกา และยุโรป รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส พบว่า
   - เชื้อไวรัส 01NP1 ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทยมีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา (มากกว่า 90% identity) ในขณะที่มีลำดับเบสเหมือนกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ยุโรปเพียงประมาณ 60%
   - เชื้อไวรัส 01NP1 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสกลุ่มสายพันธุ์อเมริกา และจัดอยู่ในกลุ่ม (cluster) เดียวกัน โดยที่มีความใกล้เคียงกับ (closely related) กับเชื้อไวรัส BJ-4 มากที่สุดซึ่งเป็น field strain จากภูมิภาคเดียวกัน
   - เชื้อไวรัส 01NP1 น่าจะมีวิวัฒนาการมาจากเชื้อที่เป็นสายพันธุ์วัคซีน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทยมีต้นกำเนิดมาจากการใช้วัคซีนซึ่งส่งผลให้เชื้อไวรัสมีพัฒนาการจากเชื้อที่ไม่รุนแรงจนมีความรุนแรงและก่อให้เกิดโรค
   - เชื้อไวรัส 01NP1 มี ORF1a ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนมากสุด (amino acid difference) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าบริเวณ ORF1a เป็น variable region ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการพัฒนา genetic marker และชุดตรวจสอบต่อไปในอนาคต
5. ประโยชน์ของการวิจัยครั้งนี้ ทำให้ได้ข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดและทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนควบคุมป้องกันโรค และการตัดสินใจใช้วัคซีนป้องกันโรคในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

Albina, E., 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. Vet Microbiol 55, 309-316.

Allende, R., Lewis, T.L., Lu, Z., Rock, D.L., Kutish, G.F., Ali, A., Doster, A.R., Osorio, F.A., 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. J Gen Virol 80 (Pt 2), 307-315.

Batista, L., Dee, S.A., Rossow, K.D., Deen, J., Pijoan, C., 2002. Assessing the duration of persistence and shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of breeding-age gilts. Can J Vet Res 66, 196-200.

Cavanagh, D., 1997. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Arch Virol 142, 629-633.

Christianson, W.T., Choi, C.S., Collins, J.E., Molitor, T.W., Morrison, R.B., Joo, H.S., 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. Can J Vet Res 57, 262-268.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., et al., 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest 4, 117-126.

Conzelmann, K.K., Visser, N., Van Woensel, P., Thiel, H.J., 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. Virology 193, 329-339.

Damrongwatanapokin, S. , Arsayuth, K., Kongkrong, C., Parchariyanon, S., Pinyochon, W., and Tantaswasdi, U. 1996. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. J Thai. Vet Med Asscoc. 47,19-30

Done, S.H., Paton, D.J., 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. Vet Rec 136, 32-35.

Done, S.H., Paton, D.J., White, M.E., 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. Br Vet J 152, 153-174.

Gagnon, C.A., Dea, S., 1998. Differentiation between porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism of their ORFs 6 and 7 genes. Can J Vet Res 62, 110-116.

Gao, Z.Q., Guo, X., Yang, H.C., 2004. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. Arch Virol 149, 1341-1351.

Grebennikova, T.V., Clouser, D.F., Vorwald, A.C., Musienko, M.I., Mengeling, W.L., Lager, K.M., Wesley, R.D., Biketov, S.F., Zaberezhny, A.D., Aliper, T.I., Nepoklonov, E.A., 2004. Genomic characterization of virulent, attenuated, and revertant passages of a North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain. Virology 321, 383-390.

Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., Gojobori, T., 2005. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. Mol Biol Evol 22, 1024-1031.

Meulenberg, J.J., Hulst, M.M., de Meijer, E.J., Moonen, P.L., den Besten, A., de Kluyver, E.P., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1993. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology 192, 62-72.

Meulenberg, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1997. Molecular characterization of Lelystad virus. Vet Microbiol 55, 197-202.

Meulenberg, J.J., Petersen-den Besten, A., de Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., Wensvoort, G., 1995. Characterization of structural proteins of Lelystad virus. Adv Exp Med Biol 380, 271-276.

Murtaugh, M.P., Elam, M.R., Kakach, L.T., 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. Arch Virol 140, 1451-1460.

Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J Virol 73, 270-280.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E., Benfield, D.A., 1993. Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 31, 3184-3189.

Nielsen, H.S., Liu, G., Nielsen, J., Oleksiewicz, M.B., Botner, A., Storgaard, T., Faaberg, K.S., 2003. Generation of an infectious clone of VR-2332, a highly virulent North American-type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Virol 77, 3702-3711.

Opriessnig, T., Halbur, P.G., Yoon, K.J., Pogranichniy, R.M., Harmon, K.M., Evans, R., Key, K.F., Pallares, F.J., Thomas, P., Meng, X.J., 2002. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. J Virol 76, 11837-11844.

Plagemann, P.G., 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. Emerg Infect Dis 9, 903-908.

Prieto, C., Castro, J.M., 2005. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. Theriogenology 63, 1-16.

Rossow, K.D., 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. Vet Pathol 35, 1-20.

Shen, S., Kwang, J., Liu, W., Liu, D.X., 2000. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion. Arch Virol 145, 871-883.

Snijder, E.J., Meulenberg, J.J., 1998. The molecular biology of arteriviruses. J Gen Virol 79 (Pt 5), 961-979.

Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A., Damrongwatanapokin, S., 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet Microbiol 101, 9-21.

Welch, S.K., Jolie, R., Pearce, D.S., Koertje, W.D., Fuog, E., Shields, S.L., Yoo, D., Calvert, J.G., 2004. Construction and evaluation of genetically engineered replication-defective porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidates. Vet Immunol Immunopathol 102, 277-290.

Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Luijtze, E.A., den Besten, A., Harris, L., Collins, J.E., Christianson, W.T., Chladek, D., 1992. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. J Vet Diagn Invest 4, 134-138.

Wootton, S., Yoo, D., Rogan, D., 2000. Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. Arch Virol 145, 2297-2323.

Yang, S.X., Kwang, J., Laegreid, W., 1998. Comparative sequence analysis of open reading frames 2 to 7 of the modified live vaccine virus and other North American isolates of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch Virol 143, 601-612.

Yoo, D., Welch, S.K., Lee, C., Calvert, J.G., 2004. Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors. Vet Immunol Immunopathol 102, 143-154.

Yuan, S., Mickelson, D., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., 2001. Complete genome comparison of porcine reproductive and respiratory syndrome virus parental and attenuated strains. Virus Res 79, 189-200.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การแยกสกัด อาร์ เอ็น เอ ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยใช้ชุดแยกสกัด QIAamp viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)

วิธีการแยกสกัด RNA ของเชื้อไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส จากเซลล์เลี้ยงเชื้อทำได้โดย

1. เตรียมสารละลาย buffer AVL ปริมาตร 560 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติมตัวอย่าง (cell culture) ปริมาตร 140 ไมโครลิตร และผ่านเครื่องเขย่า (vortex) ประมาณ 15 วินาที
3. ทิ้งตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง (25C) นาน 10 นาที
4. เติมสารละลาย ethanol ปริมาตร 560 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง และและผ่านเครื่องเขย่า (vortex) ประมาณ 15 วินาที
5. นำส่วนผสมจากข้อ 1-4 ปริมาตร 630 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
6. นำ QIAamp spin column มาไว้ในหลอดขนาด 2.0 มิลลิลิตร ใหม่ และทำซ้ำข้อ 5
7. นำ QIAamp spin column มาไว้ในหลอดขนาด 2.0 มิลลิลิตร ใหม่
8. เติมสารละลาย Buffer AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
9. นำ QIAamp spin column มาไว้ในหลอดขนาด 2.0 มิลลิลิตร ใหม่
10. เติมสารละลาย Buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที
11. นำ QIAamp spin column มาไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่
12. เติมสารละลาย Buffer AVE หรือ molecular grade water ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
13. เก็บสารสกัด RNA ที่อยู่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ภาคผนวก ข

การแยกสกัด PCR product ด้วยชุดแยกสกัด Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendrof, Hamburg, Germany)

วิธีการแยกสกัด PCR product เพื่อทำให้สารมีความบริสุทธิ์

1 ตัดชิ้นเจลที่มี PCR product โดยตัดให้เจล มีขนาดกว้าง 0.5 x ยาว 0.5 ซม. หรือไม่เกิน 400 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2 เติมสารละสาย Binding buffer ปริมาตรเป็น 3 เท่าของชิ้นเจล
3 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 55°C นาน 10 นาที จนกระทั่งชิ้นเจลละลาย
4 เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตรเป็น 1 เท่า ผสมให้เข้ากันโดนการพลิกหลอดทดลองขึ้นลง
5 นำส่วนผสมจากข้อ 1-4 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงใน spin column จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8000x นาน 1 นาที
6 นำ spin column มาไว้ในหลอดขนาด 2.0 มิลลิลิตร ใหม่
7 เติมสารละลาย Wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8000x นาน 1 นาที
8 นำ spin column มาไว้ในหลอดขนาด 2.0 มิลลิลิตร ใหม่
9 เติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ลงใน spin column จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8000x นาน 1 นาที
10 เก็บสารสกัด ที่อยู่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

รายละเอียดลำดับเบสทั้งหมดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 01NP1 ที่เผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank (Genbank accession number DQ056373)

```
LOCUS       DQ056373              15412 bp    RNA     linear   VRL 31-MAY-2005
DEFINITION  Porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain 01NP1.2,
            complete genome.
ACCESSION   DQ056373
VERSION     DQ056373.1  GI:66735372
SOURCE      Porcine respiratory and reproductive syndrome virus
  ORGANISM  Porcine respiratory and reproductive syndrome virus
            Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Nidovirales;
            Arteriviridae; Arterivirus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 15412)
  AUTHORS   Amonsin,A., Pariyothorn,N., Puranaveja,S., Koowattananukul,C.,
            Wongyanin,P., Suradhat,S. and Thanawongnuwech,R.
  TITLE     Full-length sequence of a Thai porcine reproductive and respiratory
            syndrome virus (PRRSV) isolate
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 15412)
  AUTHORS   Amonsin,A., Pariyothorn,N., Puranaveja,S., Koowattananukul,C.,
            Wongyanin,P., Suradhat,S. and Thanawongnuwech,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (09-MAY-2005) Faculty of Veterinary Science,
            Chulalongkorn University, Henri-Dunant Road, Pratumwan, Bangkok
            10330, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..15412
                     /organism="Porcine respiratory and reproductive syndrome
                     virus"
                     /mol_type="genomic RNA"
                     /strain="01NP1.2"
                     /db_xref="taxon:28344"
                     /country="Thailand"
     gene            190..7701
                     /gene="ORF1a"
     CDS             190..7701
                     /gene="ORF1a"
                     /note="unusual cysteine protease/serine protease"
                     /codon_start=1
                     /product="ORF1a"
                     /protein_id="AAY53871.1"
                     /db_xref="GI:66735373"
                     /translation="MSGILDRCTCTPNARVFMAEGQVYCTRCLSARSLLPLNLQVSEL
                     GVLGLFYRPEEPLRWTLPRAFPTVECSPAGACWLSAIFPIARMTSGNLNFQQRMVRVA
                     AELYRAGQLTPAVLKALQVYERGCRWYPIVGPVPGVAVFANSLHVSDKPFPGATHVLT
                     NLPLPQRPKPEDFCPFECAMATVYDIGHDAVMYVAERKISWAPRGGDEVKFEAVPGEL
                     KLIANRLRTSFPPHHTVDMSKFAFTAPGCGVSMRVERQHGCLPADTVPEGNCWWSLFD
                     LLPLEVQNKEIRHANQFGYQTKHGVSGKYLQRRLQVNGLRAVTDLNGPIVVQYFFVKE
                     SWIRHLKLAGEPSYSGFEDLLRIRVEPNTSPLADKEEKIFRFGSHKWYGAGKRARKAR
                     SCATATVAGRALSVRETRQAKEHEVAGANKAEHLKHYSPPAEGNCGWHCISAIANRMV
                     NSKFETTLPERVRPPDDWATDEDLVNAIQILRLPAALDRNGACTSAKYVLKLEGEHWT
                     VTVTPGMSPSLLPLECVQGCCGHKGGLGSPDAVEVSGFDPACLDRLAEVMHLPSSAIP
                     AALAEMSGDSDRSASPVTTVWTVSQFFARHSGGNHPDQVRLGKIISLCQVIEDCCCSQ
                     NKTNRVTPEEVAAKIDLYLRGATNLEECLARLEKARPPRVIDTFFDWDVVLPGVEAAT
                     QTIKLPQVNQCRALVPVVTQKSLDNNSVPLTAFSLANYYYRAQGDEVRHRERLTAVLS
                     KLEKVVREEYGLMPTEPGPRPTLPRGLDELKAQMEEDLLKLANAQTTSDMMAWAVEQV
                     DLKTWVKNYPRWTPPPPPPKVQPRKTKPVKSLPERKPVPAPRRKVGSDCGSPVSLGGD
                     VPNSWEDLAVSSPFDLPTPPEPATPSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAPIPAPRGTV
                     SRPVTPLSEPIPVPAPRRKFQQVKRLSSAAAIPPYQNEPLDLSASSQTEYEASPPAPP
                     QSGGVLGVEGHEAEETLSEISDMSGNIKPASVSSSSSLSSVRITRPKYSAQAIIDSGG
```

```
                PCSGHLQEVKETCLSVMREACDATKLDDPATQEWLSRMWDRVDMLTWRNTSVYQAICT
                LDGRLKFLPKMILETPPPYPCEFVMMPHTPAPSVGAESDLTIGSVATEDVPRILEKIE
                NVGEMANQGPLAFSEDKPVDDQLVNDPRISSRRPDESTSAPSAGTGGAGSFTDLPPSD
                GADADGGGPFRTVKRKAERLFDQLSRQVFDLVSHLPVFFSRLFYPGGGYSPGDWGFAA
                FTLLCLFLCYSYPAFGIAPLLGVFSGSSRRVRMGVFGCWLAFAVGLFKPVSDPVGAAC
                EFDSPECRNILHSFELLKPWDPVRSLVVGPVGLGLAILGRLLGGARCIWHFLLRLGIV
                ADCILAGAYVLSQGRCKKCWGSCIRTAPNEVAFNVFPFTRATRSSLIDLCDRFCAPKG
                MDPIFLATGWRGCWAGRSPIEQPSEKPIAFAQLDEKKITARTVVAQPYDPNQAVKCLR
                VLQAGGAMVAKAVPKVVKVSAVPFRAPFFPTGVKVDPDCRVVVDPDTFTAALRSGYST
                TNLVLGVGDFAQLNGLKIRQISKPSGGGPHLMAALHVACSMALHMLAGIYVTAVGSCG
                TGTNDPWCANPFAVPGYGPGSLCTSRLCIYQHGLTLPLTALVAGFGIQEIALVVLIFV
                SIGGMAHRLSCKADMLCVLLAIASYVWVPLTWLLCVFPCWLRCFSLHPLTILWLVFFL
                ISVNMPSGILAMVLLVSLWLLGRYTNVAGLVTPYDIHHYTSGPRGVAALATAPDGTYL
                AAVRRAALTGRTMLFTPSQLGSLLEGAFRTRKPSLNTVNVIGSSMGSGGVFTIDGKVK
                CVTAAHVLTGNSARVSGVGFNQMLDFDVKGDFAIADCPNWQGAAPKTQFCTDGWTGRA
                YWLTSSGVEPGVIGKGFAFCFTACGDSGSPVITEAGELVGVHTGSNKQGGGIVTRPSG
                QFCNVAPIKLSELSEFFAGPKVPLGDVKVGSHIIKDISEVPSDLCALLAAKPELEGGL
                STVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPLVAVSFFILNEVLPAVLVRSVFSFGMFVLSWLTPWS
                AQVLMIRLLTAALNRNRWSLAFFSLGAVTGFVADLAATQGHPLQAVMNLSTYAFLPRM
                MVVTSPVPVITCGVVHLLAIILYLFKYRGLHHILVGDGVFSAAFFLRYFAEGKLREGV
                SQSCGMNHESLTGALAMRLNDEDLDFLMKWTDFKCFVSASNMRNAAGQFIEAAYAKAL
                RVELAQLVQVDKVRGTLAKLEAFADTVAPQLSPGDIVVALRHTPVGSIFDLKVGITKH
                TLQAIETRVLAGSKMTVARVVDPTPTPPPAPVPIPLPPKVLENGPNAWGDEDRLNKKK
                RRRMEALGIYVMGGKKYQKFWDKNSGDVFYEEVHNNTDEWECLRVGDPADFDPEKGTL
                CGHVTIENKAYHVYTSPSGKKFLVPVNPENGRVQWEAAKLSVEQALGMMNVDGELTAK
                ELEKLKRIIDKLQGLTKEQCLNC"
gene            <7680..12071
                /gene="ORF1b"
CDS             <7680..12071
                /gene="ORF1b"
                /note="helicase; zinc-finger protein"
                /codon_start=1
                /product="ORF1b"
                /protein_id="AAY53872.1"
                /db_xref="GI:66735374"
                /translation="GAVFKLLAASDLTRCGRGGLVVTETAVKIVKFHNRTFTLGPVNL
                KVASEVELKDAVEHNQHPVARPIDGGVVLLRSAVPSLIDVLISGADASPKLLAHHGPG
                NTGIDGTLWDFESEATKEEVALSAQIIQACDIRRGDAPEIGLPYKLHPVRGNPERVKG
                VLQNTRFGDIPYKTPSDTGSPVHAAACLTPNATPVTDGRSVLATTMPPGFELYVPTIP
                ASVLDYLDSRPDCPKLLTEHGCKDAALKDLSKYDLSTQGFVLPGVLRLVRKYLFAHVG
                KCPPVHRPSTYPAKNSMAGINGNRFPTKDIQSVPEIDVLCAQAVRENWQTVTPCTLKK
                QYCGKKKTRTILGTNNFIALAHRAVLSGVTQGFMKKAFNSPIALGKNKFKELQTPVLG
                RCLEADLASCDRSTPAIVRWFAANLLYELACAEEHLPSYVLNCCHDLLVTQSGAVTKR
                GGLSSGDPITSVSNTIYSLVIYAQHMVLSYFKSGHPHGLLFLQDQLKFEDMLKVQPLI
                VYSDDLVLYAESPTMPNYHWWVEHLNLMLGFQTDPKKTAITDSPSFLGCRIINGRQLV
                PNRDRILAALAYHMKASNVSEYYASAAAILMDSCACLEYDPEWFEELVVGIAQCARKD
                GYSFPGTPFFMSMWEKLRSNYEGKKSRVCGYCGAPAPYATACGLDVCIYHTHFHQHCP
                VTIWCGHPAGSGSCSECKSPVGKGTSPLDEVLEQVPYKPPRTVIMHVEQGLTPLDPGR
                YQTRRGLVSVRRGIRGNEVELPDGDYASTALLPTCKEINMVAVASNVLRSRFIIGPPG
                AGKTYWLLQQVQDGDVIYTPTHQTMLDMIRALGTCRFNVPAGTTLQFPVPSRTGPWVR
                ILAGGWCPGKNSFLDEAAYCNHLDVLRLLSKTTLTCLGDFKQLHPVGFDSHCYVFDIM
                PQTQLKTIWRFGQNICDAIQPDYRDKLMSMVNTTRVTHVEKPVRYGQVLTPYHRDRED
                DAITIDSSQGATFDVVTLHLPTKDSLNRQRALVAITRARHAIFVYDPHRQLQGLFDLP
                AKGTPVNLAVHRDGQLIVLDRNNKECTVAQALGNGDKFRATDKRVVDSLRAICADLEG
                SSSPLPKVAHNLGFYFSPDLTQFAKLPVELAPHWPVVTTQNNEKWPDRLVASLRPIHK
                YSRACIGAGYMVGPSVFLGTPGVVSYYLTKFVKGEAQLLPETVFSTGRIEVDCREYLD
                DREREVAASLPHAFIGDVKGTTVGGCHHVTSRYLPRVLPKESVAVVGVSSPGKAAKAL
                CTLTDVYLPDLEAYLHPETQSKCWKMMLDFKEVRLMVWKDKTAYFQLEGRYFTWYQLA
                SYASYIRVPVNSTVYLDPCMGPALCNRRVVGSTHWGADLAVTPYDYGAKIILSSAYHG
                EMPPGYKILACAEFSLDDPVKYKHTWGFESDTAYLYEFTGNGEDWEDYNDAFRARQEG
                KIYKATATSLKFYFPPGPVIEPTLGLN"
gene            12073..12843
                /gene="ORF2"
CDS             12073..12843
                /gene="ORF2"
                /note="glycosylated"
                /codon_start=1
                /product="ORF2"
                /protein_id="AAY53873.1"
```

```
                /db_xref="GI:66735375"
                /translation="MKWGPCKAFFTKLANFLWMLSRSSWCPLLISLYFWPFCLASPSP
                VGWWSFASDWFAPRYSVRALPFTLSNYRRSYEAFLSQCQVDIPTWGTKHPLGMLWHHK
                VSTLIDEMVSRRMYRIMEKAGQAAWKQVVSEATLSRISSLDVVAHFQHLAAIEAETCK
                YLASRLPMLHNLRMTGSNVTIVYNSTLNQVFAIFPTPGSRPKLHDFQQWLIAVHSSIF
                SSVAASCTLFVVLWLRVPILRTVFGFRWLGAIFLSNSQ"
gene            12696..13460
                /gene="ORF3"
CDS             12696..13460
                /gene="ORF3"
                /note="glycosylated"
                /codon_start=1
                /product="ORF3"
                /protein_id="AAY53874.1"
                /db_xref="GI:66735376"
                /translation="MVNSCTFLHIFLCCSFLYSFCCAVVAGSNTTYCFWFPLVRGNFS
                FELTVNYTVCPPCLTRQAATEIYEPGRSLWCRIGYDRCEEDDHDELGFMVPPGLSSEG
                HLTSVYAWLAFLSFSYTAQFHPEIFGIGNVSRVYVDIKHQLICAEHDGQNTTLPRHDN
                ISAVFQTYYQHQVDGGNWFHLEWLRPFFSSWLVLNVSWFLRRSPANHVSVRVLQILRP
                TPPQRQALLSSKTSVALGIATRPLRRFAKSLSAVRR"
gene            13241..13777
                /gene="ORF4"
CDS             13241..13777
                /gene="ORF4"
                /note="glycosylated"
                /codon_start=1
                /product="ORF4"
                /protein_id="AAY53875.1"
                /db_xref="GI:66735377"
                /translation="MASSLLFLVVGFKCLLVSQAFACKPCFSSSLADIKTNTTAAAGF
                AVLQDISCLRHRDSASEAIRKIPQCRTAIGTPVYVTITANVTDENYLHSSDLLMLSSC
                LFYASEMSEKGFKVVFGNVSGIVAVCVNFTSYVQHVKEFTQRSLVVDHVRLLHFMTPE
                TMRWATVLACLFAILLAI"
gene            13788..14390
                /gene="ORF5"
CDS             13788..14390
                /gene="ORF5"
                /note="glycosylated"
                /codon_start=1
                /product="ORF5"
                /protein_id="AAY53876.1"
                /db_xref="GI:66735378"
                /translation="MLEKCLTAGCCSQLLSLWCIVPFCFAVLANASNDSSSHLQLIYN
                LTLCELNGTDWLANKFDWAVESFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDTVALVTVSTAGFV
                HGRYVLSSIYAVCALAALTCFVIRFAKNCMSWRYACTRYTNFLLDTKGGLYRWRSPVI
                IEKRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSVATPITRVSAEQWGRP"
gene            14375..14899
                /gene="ORF6"
CDS             14375..14899
                /gene="ORF6"
                /codon_start=1
                /product="ORF6"
                /protein_id="AAY53877.1"
                /db_xref="GI:66735379"
                /translation="MGSSLDDFCHDSTAPEKVLLAFSITYTPVMIYALKVSRGRLLGL
                LHLLIFLNCAXTFGYMTFAHFQSTNKVALTMGAVVALLWXVYSAIETWKFITSRCRLC
                LLGRKYILAPAHHVESAAGFHPIAANDNHAFVVRRPGSTTVNGTLVPGLKSLVLGGRK
                AVKQGVVNLVKYAK"
gene            14889..15260
                /gene="ORF7"
CDS             14889..15260
                /gene="ORF7"
                /codon_start=1
                /product="ORF7"
                /protein_id="AAY53878.1"
                /db_xref="GI:66735380"
                /translation="MPNNNGKQQKRKKGDGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPGKK
                NKKKNPEKPHFPLATEDDVRHHFTPSERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLSDSGRISYTV
                EFSLPTHHTVRLIRVTASPSA"
```

```
ORIGIN
        1 atgacgtata ggtgttggct ctatgccttg gcatttgtat tgtcgggagc tgtgaccatt
       61 ggcacagccc aaaacttgct gcacagaaac accttctgt gatagcctcc ttcaggggag
      121 cttagggttt gtccctagca ccttgcttcc ggagttgcac tgctttacgg tctctccacc
      181 cctttaacca tgtctgggat acttgatcgg tgcacgtgta cccccaatgc cagggtgttt
      241 atggcggagg gccaagtcta ctgcacacga tgcctcagtg cacggtctct ccttcccctg
      301 aacctccaag tttctgagct cggggtgcta ggcctattct acaggcccga agagccactc
      361 cggtggacgt tgccacgtgc attccccact gttgagtgct cccccgccgg ggcctgctgg
      421 ctttctgcaa tctttccaat cgcacgaatg accagtggaa acctgaactt ccaacaaaga
      481 atggtacggg tcgcagctga gctttacaga gccggccagc tcacccctgc agtcttgaag
      541 gctctacaag tttatgaacg gggttgccgc tggtacccca ttgttggacc tgtccctgga
      601 gtggccgttt tcgccaattc cctacatgtg agtgataaac ctttcccggg agcaactcac
      661 gtgttgacca acctgccgct cccgcagaga cccaagcctg aagacttttg ccccttgag
      721 tgtgctatgg ctactgtcta tgacattggt catgacgccg tcatgtatgt ggccgaaagg
      781 aaaatctcct gggcccctcg tggcggggat gaagtgaaat ttgaagctgt ccccggggag
      841 ttgaagttga ttgcgaaccg gctccgcacc tccttcccgc cccaccacac agtggacatg
      901 tctaagttcg ccttcacagc ccctgggtgt ggtgtttcta tgcgggtcga acgccaacac
      961 ggctgccttc ccgctgacac tgtccctgaa ggcaactgct ggtggagctt gtttgacttg
     1021 cttccactgg aagttcagaa caaagaaatt cgccatgcta accaatttgg ctaccagacc
     1081 aagcatggtg tctctggcaa gtacctacag cggaggctgc aagttaatgg tctccgagca
     1141 gtaactgacc taaacggacc tatcgtcgta cagtacttct tcgttaagga gagttggatc
     1201 cgccatttga aactggcggg agaacccagc tactctgggt ttgaggacct cctcagaata
     1261 agggttgagc ctaacacgtc gccattggct gacaaggaag aaaaaatttt ccggtttggc
     1321 agtcacaagt ggtacggcgc tggaaagaga gcaagaaaag cacgctcttg tgcgactgct
     1381 acagtcgctg gccgcgcttt gtccgttcgt gaaacccggc aggccaagga gcacgaggtt
     1441 gccggcgcca acaaggctga gcacctcaaa cactactccc cgcctgccga agggaattgt
     1501 ggttggcact gcatttccgc catcgccaac cggatggtga attccaaatt tgaaaccacc
     1561 cttcccgaaa gagtgagacc tccagatgac tgggctactg acgaggatct tgtgaatgcc
     1621 atccaaatcc tcagactccc tgcggcctta gacaggaacg gtgcttgtac tagcgccaag
     1681 tacgtactta agctggaagg tgagcattgg actgtcactg tgacccctgg gatgtcccct
     1741 tctttgctcc ctcttgaatg tgttcagggc tgttgtgggc acaagggcgg tcttggttcc
     1801 ccagatgcag tcgaggtctc cggatttgac cctgcctgcc ttgaccggct ggctgaggtg
     1861 atgcacctgc ctagcagtgc tatcccagcc gctctggccg aaatgtctgg cgattccgat
     1921 cgttcggctt ctccggtcac caccgtgtgg actgtttcgc agttctttgc ccgtcacagc
     1981 ggagggaatc accctgacca agtgcgctta gggaaaatta tcagcctttg tcaggtgatt
     2041 gaggactgct gctgttccca gaacaaaacc aaccgggtca ccccggagga ggtcgcagca
     2101 aagattgacc tgtacctccg tggtgcaaca aatcttgaag aatgcttggc caggcttgag
     2161 aaagcgcgcc cgccacgcgt aatcgacacc ttctttgatt gggatgttgt gctccctggg
     2221 gttgaggcgg caacccagac gatcaagctg ccccaggtca accagtgtcg tgctctggtc
     2281 cctgttgtga ctcaaaagtc cttggacaac aactcggtcc ccctgaccgc cttttcactg
     2341 gctaactact actaccgtgc gcaaggtgac gaagttcgtc accgtgaaag actaaccgcc
     2401 gtgctctcca agttggaaaa ggttgttcga gaagaatatg ggctcatgcc aaccgagcct
     2461 ggtccacggc ccacactgcc acgcgggctc gacgaactca aagcccagat ggaggaggac
     2521 ttgctgaaac tggctaacgc ccagacgact tcggacatga tggcctgggc agtcgagcag
     2581 gttgacctaa aaacttgggt caagaactac ccgcggtgga caccaccacc ccctccgcca
     2641 aaagttcagc ctcgaaaaac gaagcctgtc aagagcttgc cggagagaaa gcctgtcccc
     2701 gccccgcgca ggaaggttgg gtccgattgt ggcagcccgg tttcattagg cggcgatgtc
     2761 cctaacagtt gggaagattt ggctgttagt agccccttg atctcccgac cccacctgag
     2821 ccggcaacac cttcaagtga gctggtgatt gtgtcctcac cgcaatgcat cttcaggccg
     2881 gcgacaccct tgagtgagcc ggctccaatt cccgcacctc gcggaactgt gtctcgaccg
     2941 gtgacaccct tgagtgagcc gatccctgtg cccgcaccgc ggcgtaagtt tcagcaggtg
     3001 aaaagattga gttcggcggc ggcaatccca ccgtaccaga acgagcccct ggatttgtct
     3061 gcttcctcac agactgaata tgaggcctct cccccagcac cgccgcagag cgggggcgtt
     3121 ctgggagtag aggggcatga agctgaggaa accctgagtg aaatctcgga catgtcgggt
     3181 aacattaaac ctgcgtccgt gtcatcaagc agctccttgt ccagcgtgag aatcacacgc
     3241 ccaaaatact cagctcaagc catcatcgac tcgggcgggc cctgcagtgg gcatctccaa
     3301 gaggtaaagg aaacatgcct tagtgtcatg cgcgaggcat gtgatgcgac taagcttgat
     3361 gaccctgcta cgcaggaatg gctttctcgc atgtgggatc gggtggacat gctgacttgg
     3421 cgcaacacgt ctgtttacca ggcgatttgc accttagatg gcaggttaaa gttcctccca
     3481 aaaatgatac tcgagacacc gccgccctat ccgtgtgagt ttgtgatgat gcctcacacg
     3541 cctgcacctt ccgtaggtgc ggagagcgac cttaccattg gctcagttgc tactgaagat
     3601 gttccacgca tcctcgagaa aatagaaaat gtcggcgaga tggccaacca gggacccttg
     3661 gccttctccg aggataaacc ggtagatgac caacttgtca acgacccccg gatatcgtcg
     3721 cggaggcctg acgagagcac atcagctccg tccgcaggca caggtggcgc cggctctttt
     3781 accgatttgc cgccttcaga tggcgcggat gcggacgggg gggggccgtt tcggacggta
     3841 aaaagaaaag ctgaaaggct ctttgaccaa ctgagccgtc aggtttttga cctcgtctcc
     3901 catctccctg ttttcttctc acgccttttc taccctggcg gtggttattc tccgggtgat
     3961 tggggttttg cagcttttac tctattgtgc ctctttttat gttacagtta cccagccttt
     4021 ggtattgctc ccctcttggg tgtgttttct gggtcttctc ggcgcgttcg aatgggggtt
```

```
4081 tttggctgct ggttggcttt tgctgttggt ctgttcaagc ctgtgtccga cccagtcggc
4141 gctgcttgtg agtttgactc gccagagtgt agaaacatcc ttcattcttt tgagcttctc
4201 aaaccttggg accctgttcg cagccttgtt gtgggccccg tcggtctcgg tcttgccatt
4261 cttggcaggt tactgggcgg ggcacgctgc atctggcact ttttgcttag gcttggcatt
4321 gttgcagact gtatcttggc tggagcttac gtgctttctc aaggtaggtg taaaaagtgc
4381 tggggatctt gtataagaac tgctcctaat gaggtcgctt ttaacgtgtt tcctttcaca
4441 cgtgcgacca ggtcgtcact tatcgacctg tgcgatcggt tttgtgcgcc aaaaggaatg
4501 gaccccattt ttctcgccac tgggtggcgc gggtgctggg ccggccgaag ccccattgag
4561 caaccctctg aaaaacccat cgcgtttgcc caattggatg aaaagaagat tacggctagg
4621 actgtggtcg cccagcctta tgaccccaac caagccgtaa agtgcttgcg ggtattgcag
4681 gcgggtgggg cgatggtggc taaggcggtc ccaaaagtgg tcaaggtttc cgctgttcca
4741 ttccgagccc ccttctttcc cactggagtg aaagttgacc ctgattgcag ggtcgtggtt
4801 gaccctgaca ctttcactgc agctctccgg tctggctact ccaccacaaa cctcgtcctt
4861 ggtgtagggg actttgccca gctgaatgga ttaaaaatca ggcaaatttc caagccttca
4921 gggggaggcc cacatctcat ggctgccctg catgttgcct gctcgatggc tctgcacatg
4981 cttgctggga tttatgtgac tgcggtgggt tcttgcggca ccggcaccaa cgacccgtgg
5041 tgcgctaacc cgtttgccgt ccctggctac ggacctggct ctctctgcac gtccagattg
5101 tgcatttacc aacacggcct taccctgccc ttgacagcac ttgtggcggg attcggtatt
5161 caagaaattg ccttggtcgt tttgattttt gtttccatcg gaggcatggc tcataggttg
5221 agctgtaagg ctgacatgct gtgtgttttg cttgcaattg ccagctatgt ttgggtacct
5281 cttacctggt tgctttgtgt gtttccttgc tggttgcgct gtttttcttt gcacccccctc
5341 accatcctat ggttggtgtt tttcttgatt tctgtgaata tgccttcagg aatcttggcc
5401 atggtgttgt tggtttctct ttggcttctt ggtcgttata ctaatgttgc tggccttgtc
5461 acccccctacg acattcatca ttacaccagt ggcccccgcg gtgttgccgc cttggctacc
5521 gcaccagatg ggacctactt ggccgctgtc cgccgcgctg cgttgactgg ccgcaccatg
5581 ctgtttaccc cgtcccagct tgggtctctt cttgagggtg ctttcagaac tcgaaagccc
5641 tcactgaaca ccgtcaatgt gatcgggtcc tccatgggct ctggcggggt gtttaccatc
5701 gacgggaaag tcaagtgcgt aactgccgca catgtcctta cgggcaattc agctcgggtt
5761 tccggggtcg gcttcaatca aatgcttgac tttgacgtaa agggagattt cgctatagct
5821 gattgcccga attggcaagg ggctgccccc aagacccaat tctgcacgga tggatggact
5881 ggccgtgcct attggctaac atcctctggc gtcgaacccg gcgtcattgg aaaaggattc
5941 gccttctgct tcaccgcatg tggcgattcc gggtccccag tgatcaccga ggccggtgag
6001 cttgtcggcg ttcacacggg atcgaataaa caaggggggg gcattgttac gcgcccctca
6061 ggccagtttt gtaatgtggc acccatcaag ctaagcgaat taagtgaatt ctttgctggg
6121 cctaaggtcc cgctcggtga tgtgaaggtc ggcagccaca taattaaaga cataagcgag
6181 gtgccttcag atctttgtgc cttgcttgct gccaaacctg aactggaagg aggcctctcc
6241 accgtccaac ttctttgtgt gtttttctc ctgtggagaa tgatgggaca tgcctggacg
6301 cccttggttg ctgtgagttt ctttattttg aatgaggttc tcccagccgt cctggtccgg
6361 agtgttttct cctttggaat gtttgtgctc tcctggctca cgccatggtc tgcgcaagtt
6421 ctgatgatca ggcttctaac agcagctctt aacaggaaca gatggtcact tgccttttc
6481 agcctcggtg cagtgaccgg ttttgtcgca gatcttgcgg ccactcaggg gcatccgttg
6541 caggcagtga tgaatttgag cacctatgca ttcctgcctc ggatgatggt tgtgacctca
6601 ccagtcccag tgatcacgtg tggtgtcgtg cacctacttg ccatcatttt gtacttgttt
6661 aagtaccgtg gcctgcacca tatccttgtt ggcgatggag tgttctctgc ggctttcttc
6721 ttgagatact ttgccgaggg aaagttgagg gaaggggtgt cgcaatcctg cggaatgaat
6781 catgagtctc tgactggtgc cctcgctatg agactcaatg acgaggactt ggatttcctt
6841 atgaaatgga ctgattttaa gtgctttgtt tctgcgtcca acatgaggaa tgcagcgggt
6901 caatttatcg aggctgccta tgctaaagca cttagagtag aactggccca gttggtgcag
6961 gttgataaag ttcgaggtac tttggccaaa cttgaagctt ttgctgatac cgtggcacct
7021 caactctcgc ccggtgacat tgttgtcgct ctccgccaca cgcctgtggg cagtatcttc
7081 gacctaaagg ttggtatcac caagcatacc ctccaagcca ttgagaccag agtccttgct
7141 gggtccaaaa tgaccgtggc gcgcgtcgtc gacccgaccc ccacgccccc acccgcaccc
7201 gtgcccatcc ccctcccacc gaaagttctg gagaatggcc ccaacgcttg gggggatgag
7261 gaccgtttga ataagaagaa gaggcgcagg atggaagccc tcggcatcta tgttatgggc
7321 gggaaaaagt accagaaatt ttgggacaag aattccggtg atgtgtttta tgaggaggtc
7381 cataataaca cagatgagtg ggagtgtctc agagttggcg accctgccga ctttgaccct
7441 gagaagggaa ctctgtgtgg acatgtcacc attgaaaaca aggcttacca tgtttacacc
7501 tccccatctg gtaagaagtt cttggtcccc gtcaacccag agaatggaag agttcaatgg
7561 gaagctgcaa agctttccgt ggagcaggcc ctaggtatga tgaatgtcga cggcgaactg
7621 actgccaaag aactggagaa actgaaaaga ataattgaca aactccaggg cctgactaag
7681 gagcagtgtt taaactgcta gccgccagcg actttgacccg ctgtggtcgc ggcggcttgg
7741 ttgttactga aacagcggta aaaatagtca aatttcacaa ccggaccttc accctgggac
7801 ctgtgaattt aaaagtggcc agtgaggttg agctaaaaga cgcggttgag cacaaccaac
7861 acccggttgc gagaccgatc gatggtggag ttgtgctcct gcgttccgcg gttccttcgc
7921 ttatagacgt cttgatctcc ggtgctgatg catctcccaa gttacttgcc catcacgggc
7981 cgggaaacac tgggatcgat ggcacgctct gggattttga gtccgaagcc actaaagagg
8041 aagtcgcact cagtgcgcaa ataatacagg cttgtgacat taggcgcggc gacgctcctg
8101 aaattggtct cccttacaag ctgcaccctg ttaggggtaa ccctgagcgg gtgaaaggag
8161 ttctgcagaa tacaaggttt ggagacatac cttacaaaac ccccagtgac actggaagcc
```

```
 8221 cagtgcacgc ggctgcctgc cttacgccca acgccactcc ggtgactgat gggcgctccg
 8281 tcttggccac gaccatgccc cccgggtttg agttatatgt accgaccata ccagcgtctg
 8341 tccttgatta ccttgactct aggcctgact gccctaaact gctgacagag cacggctgca
 8401 aagatgccgc actgaaagac ctctctaaat atgacttgtc cacccaaggc tttgttttac
 8461 ctggagttct tcgccttgtg cggaaatacc tgtttgccca tgtaggtaag tgcccacccg
 8521 ttcatcggcc ttctacttac cctgctaaga attctatggc tggaataaat gggaacaggt
 8581 tcccaaccaa ggacattcag agcgtccctg aaatcgacgt tctgtgcgca caggctgtgc
 8641 gagaaaactg gcaaactgtc acccccttga ctcttaagaa acagtattgc gggaagaaga
 8701 agactaggac catactcggc accaataact tcatcgcact agcccaccga gcagtgttga
 8761 gtggtgttac ccagggcttc atgaaaaagg cgtttaactc gcccatcgcc ctcggaaaga
 8821 acaagtttaa ggagctacag actccggtcc tgggcaggtg ccttgaagct gatctcgcat
 8881 cctgcgatcg atccacgcct gcaattgtcc gctggtttgc cgccaacctt ctttatgaac
 8941 ttgcctgtgc tgaagagcat ctaccgtcgt acgtgctgaa ctgctgccac gacttactgg
 9001 tcacgcagtc cggcgcagtg actaagagag gtggcctgtc gtctggcgac ccgatcacct
 9061 ctgtgtctaa caccatttat agtttggtga tctatgcaca gcatatggtg cttagttact
 9121 tcaaaagtgg tcacccccat ggccttctgt tcttacaaga ccagctaaag tttgaggaca
 9181 tgctcaaggt tcaacccctg atcgtctatt cggacgacct cgtgctgtat gccgagtctc
 9241 ccaccatgcc aaactatcac tggtgggttg aacatctgaa tttgatgctg gggtttcaga
 9301 cggacccaaa gaagacagca ataacagact cgccatcatt tctaggctgt agaataataa
 9361 atgggcgcca gctagtcccc aaccgtgaca ggatcctcgc ggccctcgcc tatcacatga
 9421 aggcgagtaa tgtttctgaa tactatgcct cagcggctgc aatactcatg gacagctgtg
 9481 cttgtttgga gtatgatcct gaatggtttg aagaacttgt agttggaata gcgcagtgcg
 9541 cccgcaagga cggctacagc tttcccggca cgccgttctt catgtccatg tgggaaaaac
 9601 tcaggtccaa ttatgagggg aagaagtcga gagtgtgcgg gtactgcggg gccccggccc
 9661 cgtacgctac tgcctgtggc ctcgacgtct gcatttacca cacccacttc caccagcatt
 9721 gtccagtcac aatctggtgt ggccatccag cgggttctgg ttcttgtagt gagtgcaaat
 9781 cccctgtagg gaaaggcaca agccctttag acgaggtgct ggaacaagtc ccgtataagc
 9841 ccccacggac cgttatcatg catgtggagc agggtctcac ccccccttgat ccaggtagat
 9901 accaaactcg ccgcggatta gtctctgtca ggcgtggaat taggggaaat gaagttgaac
 9961 taccagacgg tgattatgct agcaccgcct tgctccctac ctgcaaagag atcaacatgg
10021 tcgctgtcgc ttccaatgta ttgcgcagca ggttcatcat cggcccaccc ggtgctggga
10081 aaacatactg gctccttcaa caggtccagg atggtgatgt tatttacaca ccaactcacc
10141 agaccatgct tgacatgatt agggctttgg ggacgtgccg gttcaacgtc ccggcaggca
10201 caacgctgca attccccgtc ccctcccgca ccggtccgtg ggttcgcatc ctagccggcg
10261 gttggtgtcc tggcaagaat tccttcctag atgaagcagc gtattgcaat caccttgatg
10321 ttttgaggct tcttagtaaa actaccctca cctgtctagg agacttcaag caactccacc
10381 cagtgggttt tgattctcat tgctatgttt ttgacatcat gcctcaaact caactgaaga
10441 ccatctggag gtttggacag aatatctgtg atgccattca gccagattac agggacaaac
10501 tcatgtccat ggtcaacaca acccgtgtga cccacgtgga aaaacctgtc aggtatgggc
10561 aggtcctcac cccctaccac agggaccgag aggacgacgc catcactatt gactccagtc
10621 aaggcgccac attcgatgtg gttacattgc atttgcccac taaagattca ctcaacaggc
10681 aaagagccct tgttgccatc accagggcaa gacacgctat ctttgtgtat gacccacaca
10741 ggcagctgca gggcttgttt gatcttcctg caaaaggcac acccgtcaac ctcgcagtgc
10801 accgcgacgg gcagctgatc gtgctggata gaaataacaa agaatgcacg gttgctcagg
10861 ctctaggcaa cggggataaa tttagggcca cagataagcg tgttgtagat tctctccgcg
10921 ccatttgtgc tgatctagaa gggtcgagct ctccgctccc caaggtcgca cacaacttgg
10981 gattttattt ctcacctgat ttaacacagt ttgctaaact cccagtagaa cttgcacctc
11041 actggcccgt ggtgacaacc cagaacaatg aaaagtggcc agatcggctg gttgccagcc
11101 ttcgccctat ccataaatac agccgcgcgt gcatcggtgc cggctatatg gtgggccctt
11161 cggtgtttct aggcactcct ggggtcgtgt catactatct cacaaaattt gttaagggcg
11221 aggctcaatt gcttccggag acggttttca gcaccggccg aattgaggta gactgccggg
11281 aatatcttga tgatcgggag cgagaagttg ctgcgtccct cccacacgct ttcattggcg
11341 acgtcaaagg cactaccgtt ggaggatgtc atcatgtcac ctccagatac ctcccgcgcg
11401 tccttcccaa ggaatcagtt gcggtagtcg gggtttcaag ccccggaaaa gccgcgaaag
11461 cattgtgcac actgacagat gtgtacctcc cagatcttga agcctatctc cacccggaga
11521 cccagtccaa gtgctggaaa atgatgttgg acttcaaaga agttcgacta atggtctgga
11581 aagacaaaac agcctatttc caacttgaag gtcgctattt cacctggtat cagcttgcca
11641 gctatgcctc gtacatccgt gttcctgtca actctacggt gtacttggac ccctgcatgg
11701 gccccgccct ttgcaacagg agagtcgtcg ggtccaccca ctgggggct gacctcgcgg
11761 tcacccctta tgattacggc gctaaaatta tcctgtctag cgcgtaccat ggtgaaatgc
11821 cccccggata caaaattctg gcgtgcgcgg agttctcgtt ggatgaccca gttaagtaca
11881 aacatacctg ggggtttgaa tcggatacag cgtatctgta tgagttcacc gggaacggtg
11941 aggactggga ggattacaat gatgcgtttc gtgcgcgcca ggaagggaaa atttacaagg
12001 ccactgccac cagcttgaag ttttattttc ccccgggccc tgtcattgaa ccaactttag
12061 gcctgaattg aaatgaaatg gggtccatgc aaagcctttt ttacaaaatt ggccaacttt
12121 ttgtggatgc tttcacggag ttcttggtgt ccattgttga tatcattata tttttggcca
12181 ttttgtttgg cttcaccatc gccggttggc tggtggtctt ttgcatcaga ttggtttgct
12241 ccgcgatact ccgtacgcgc tctgccattc actctgagca attacagaag atcttatgag
12301 gcctttcttt cccagtgcca agtggacatt cccacctggg gaactaaaca tcctttgggg
```

```
12361 atgctttggc accataaggt gtcaaccctg attgatgaaa tggtgtcgcg tcgaatgtac
12421 cgcatcatgg aaaaagcagg gcaggctgcc tggaaacagg tggtgagcga ggctacgctg
12481 tctcgcatta gtagtttgga tgtggtggct cattttcagc atctagccgc cattgaagcc
12541 gagacctgta aatatttggc ctcccggctg cccatgctac acaacctgcg catgacaggt
12601 tcaaatgtaa ccatagtgta taatagcact ttgaatcagg tgtttgctat ttttccaacc
12661 cctggttccc ggccaaagct tcatgatttt cagcaatggt taatagctgt acattcctcc
12721 atattttcct ctgttgcagc ttcttgtact ctttttgttg tgctgtggtt gcgggttcca
12781 atactacgta ctgtttttgg tttccgctgg ttaggggcaa tttttctttc gaactcacag
12841 tgaattacac ggtgtgtcca ccttgcctca cccggcaagc agccacagag atctacgaac
12901 ccggtaggtc tctttggtgc aggatagggt atgaccgatg tgaggaggat gatcatgacg
12961 agctagggtt tatggtaccg cctggcctct ccagcgaagg ccacttgact agtgtttacg
13021 cctggttggc gttcttgtcc ttcagctaca cggcccagtt ccatcccgag atattcggga
13081 tagggaatgt gagtcgagtt tatgttgaca tcaaacatca actcatctgc gccgaacatg
13141 acgggcagaa caccaccttg cctcgtcatg acaacatttc agccgtgttt cagacctatt
13201 accaacatca agtcgacggc ggcaattggt ttcacctaga atggcttcgt cccttctttt
13261 cctcgtggtt ggttttaaat gtctcttggt ttctcaggcg ttcgcctgca aaccatgttt
13321 cagttcgagt cttgcagata ttaagaccaa caccaccgca gcggcaggct ttgctgtcct
13381 ccaagacatc agttgcctta ggcatcgcga ctcggcctct gaggcgattc gcaaaatccc
13441 tcagtgccgt acggcgatag ggacacccgt gtatgttacc atcacagcca atgtgacaga
13501 tgagaattat ttacattctt ctgatctcct catgctttct tcttgccttt tctatgcttc
13561 tgagatgagt gaaaagggat ttaaggtggt atttggcaat gtgtcaggca tcgtggctgt
13621 gtgtgtcaat tttaccagct acgtccaaca tgtcaaggag tttacccaac gctccctggt
13681 ggtcgaccat gtgcggttgc tccatttcat gacacctgag accatgaggt gggcaactgt
13741 tttagcctgt ctttttgcca ttctgttggc aatttgaatg tttaagtatg ttggagaaat
13801 gcttgaccgc gggctgttgc tcgcaattgc tttctttgtg gtgtatcgtg ccgttctgtt
13861 ttgctgtgct cgccaacgcc agcaacgaca gcagctccca tctacagctg atttacaact
13921 tgacgctatg tgagctgaat ggcacagact ggctagctaa caaatttgat tgggcagtgg
13981 agagttttgt catctttccc gttttgactc acattgtctc ctatggtgcc ctcactacca
14041 gccatttcct tgacacagtc gctttagtca ctgtgtctac cgccgggttt gttcacgggc
14101 ggtatgtcct aagtagcatc tacgcggtct gtgccctggc tgcgttgact tgcttcgtca
14161 ttaggtttgc aaagaattgc atgtcctggc gctacgcgtg taccagatat accaactttc
14221 ttctggacac taagggcgga ctctatcgtt ggcggtcgcc tgtcatcata gagaaaaggg
14281 gcaaagttga ggtcgaaggt catctgatcg acctcaaaag agttgtgctt gatggttccg
14341 tggcaacccc tataaccaga gtttcagcgg aacaatgggg tcgtccttag atgacttctg
14401 tcatgatagc acggctccag aaaaggtgct tttggcgttt tctattacct acacgccagt
14461 gatgatatat gccctaaagg tgagtcgcgg ccgactgcta gggcttctgc acctttgat
14521 cttcctgaat tgtgcttkca ccttcgggta catgactttc gcgcactttc agagtacaaa
14581 taaggtcgcg ctcactatgg gagcagtagt tgcactcctt tggkgggtgt actcagccat
14641 agaaacctgg aaattcatca cctccagatg ccgtttgtgc ttgctaggcc gcaagtacat
14701 tctggcccct gcccaccacg ttgaaagtgc cgcagggttt catccgattg cggcaaatga
14761 taaccacgca tttgtcgtcc ggcgtcccgg ctccactacg gtcaacggca cattggtgcc
14821 cgggttaaaa agcctcgtgt tgggtggcag aaaagctgtt aaacagggag tggtaaacct
14881 tgtcaaatat gccaaataac aacggcaagc agcagaagag aaagaagggg gatggccagc
14941 cagtcaatca gctgtgccag atgctgggta agatcatcgc tcagcaaaac cagtccagag
15001 gcaagggacc gggaaagaaa aataagaaga aaaacccgga gaagccccat tttcctctag
15061 cgactgaaga tgatgtcaga catcacttta cccctagtga gcggcaattg tgtctgtcgt
15121 caatccagac cgcctttaat caaggcgctg ggacttgcac cctgtcagat tcagggagga
15181 taagttacac tgtggagttt agtttgccta cgcatcatac tgtgcgcctg atccgcgtca
15241 cagcatcacc ctcagcatga tgggctggca ttcttgaggc atctcagtgt atgaattgga
15301 agaatgtatg gtgaatggca ctgattgaca ttgtgcctct aagtcaccta ttcaattagg
15361 gcgaccgtgt gggggtgaga tttaattggc gagaaccatg cggccgaaat ta
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

รายละเอียดผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 01NP1 กับฐานข้อมูล GenBank

---

ผลการเปรียบเทียบโปรตีน ORF1a

```
>gi|62511056|sp|Q8B912|RPOA_PRRSB
          Replicase polyprotein 1ab (ORF1ab polyprotein) [Includes: Replicase
          polyprotein 1a (ORF1a)] [Contains: Nsp1-alpha papain-like
          cysteine proteinase (PCP1-alpha); Nsp1-beta papain-like
          cysteine proteinase (PCP1-beta); Nsp2 cysteine proteinase (CP2)
          (CP); Nonstructural protein 3 (Nsp3); 3C-like serine proteinase
          (3.4.21.-) (3CLSP) (Nsp4); Nonstructural protein 5-6-7
          (Nsp5-6-7); Nonstructural protein 8 (Nsp8); RNA-directed
          RNA polymerase (RdRp) (Pol) (Nsp9); Helicase (Hel) (Nsp10);
          Nonstructural protein 11 (Nsp11); Nonstructural protein 12
          (Nsp12)]
          Length=3963

 Score = 4157 bits (10780),  Expect = 0.0
 Identities = 2166/2503 (86%), Positives = 2264/2503 (90%), Gaps = 0/2503 (0%)

Query  1     MSGILDRCTCTPNARVFMAEGQVYCTRCLSARSLLPLNLQVSELGVLGLFYRPEEPLRWT  60
             MSGILDRCTCTPNARVF+AEGQVYCTRCLSARSLLPLNLQV ELGVLGLFYRPEEPLRWT
Sbjct  1     MSGILDRCTCTPNARVFVAEGQVYCTRCLSARSLLPLNLQVPELGVLGLFYRPEEPLRWT  60

Query  61    LPRAFPTVECSPAGACWLSAIFPIARMTSGNLNFQQRMVRVAAELYRAGQLTPAVLKALQ  120
             LPRAFPTVECSP GACWLSAIFPIARMTSGNLNFQQRMVRVA E+YRAGQLTP VLK +Q
Sbjct  61    LPRAFPTVECSPTGACWLSAIFPIARMTSGNLNFQQRMVRVAGEIYRAGQLTPTVLKTIQ  120

Query  121   VYERGCRWYPIVGPVPGVAVFANSLHVSDKPFPGATHVLTNLPLPQRPKPEDFCPFECAM  180
             VYERGCRWYPIVGPVPGV V+ANSLHVSDKPFPGATHVLTNLPLPQRPKPEDFCPFECAM
Sbjct  121   VYERGCRWYPIVGPVPGVGVYANSLHVSDKPFPGATHVLTNLPLPQRPKPEDFCPFECAM  180

Query  181   ATVYDIGHDAVMYVAERKISWAPRGGDEVKFEAVPGELKLIANRLRTSFPPHHTVDMSKF  240
             A VYDIG  AVMYVA  K+SWAPRGGDEVKFE VP ELKL+ANRL TSFPPHH VDMSKF
Sbjct  181   ADVYDIGRGAVMYVAGGKVSWAPRGGDEVKFEPVPKELKLVANRLHTSFPPHHVVDMSKF  240

Query  241   AFTAPGCGVSMRVERQHGCLPADTVPEGNCWWSLFDLLPLEVQNKEIRHANQFGYQTKHG  300
              F  PG GVSMRVE Q+GCLPADTVPEGNCWW LFDLLP EVQNKEIRHANQFGYQTKHG
Sbjct  241   TFMTPGSGVSMRVEYQYGCLPADTVPEGNCWWRLFDLLPPEVQNKEIRHANQFGYQTKHG  300

Query  301   VSGKYLQRRLQVNGLRAVTDLNGPIVVQYFFVKESWIRHLKLAGEPSYSGFEDLLRIRVE  360
             V GKYLQRRLQVNGLRAVTD +GPIV+QYF VKESWIRHLK   EPS  GFEDLLRIRVE
Sbjct  301   VPGKYLQRRLQVNGLRAVTDTHGPIVIQYFSVKESWIRHLKPVEEPSLPGFEDLLRIRVE  360

Query  361   PNTSPLADKEEKIFRFGSHKWYGAGKRARKARSCATATVAGRALSVRETRQAKEHEVAGA  420
             PNTSPLA K EKIFRFGSHKWYGAGKRARKARS AT  VA RA S  ETRQA +HE AGA
Sbjct  361   PNTSPLAGKNEKIFRFGSHKWYGAGKRARKARSGATTMVAHRASSAHETRQATKHEGAGA  420

Query  421   NKAEHLKHYSPPAEGNCGWHCISAIANRMVNSKFETTLPERVRPPDDWATDEDLVNAIQI  480
             NKAEHLK YSPPAEGNCGWHCISAI NRMVNS FETTLPERVRPPDDWATDEDLVN IQI
Sbjct  421   NKAEHLKLYSPPAEGNCGWHCISAIVNRMVNSNFETTLPERVRPPDDWATDEDLVNTIQI  480

Query  481   LRLPAALDRNGACTSAKYVLKLEGEHWTVTVTPGMSPSLLPLECVQGCCGHKGGLGSPDA  540
             LRLPAALDRNGAC  AKYVLKLEGEHWTV+V PGMSPSLLPLECVQGCC HKGGLGSPDA
Sbjct  481   LRLPAALDRNGACGGAKYVLKLEGEHWTVSVNPGMSPSLLPLECVQGCCEHKGGLGSPDA  540
```

```
Query  541   VEVSGFDPACLDRLAEVMHLPSSAIPAALAEMSGDSDRSASPVTTVWTVSQFFARHSGGN  600
             VEVSGFDPACLDRL +VMHLPSS IPAALAE+S DS+R  SP    WTVSQ +ARH GGN
Sbjct  541   VEVSGFDPACLDRLLQVMHLPSSTIPAALAELSDDSNRPVSPAAATWTVSQSYARHRGGN  600

Query  601   HPDQVRLGKIISLCQVIEDCCCSQNKTNRVTPEEVAAKIDLYLRGATNLEECLARLEKAR  660
             H DQV LGKIISLCQVIEDCCC QNKTNR TPEEVAAKID YLRGAT+LEECLA+LE+
Sbjct  601   HHDQVCLGKIISLCQVIEDCCCHQNKTNRATPEEVAAKIDQYLRGATSLEECLAKLERVS  660

Query  661   PPRVIDTFFDWDVVLPGVEAATQTIKLPQVNQCRALVPVVTQKSLDNNSVPLTAFSLANY  720
             PP   DT FDW+VVLPGVEAA QT +   VN CR LVP VTQ+ L  +SVPLTAFSL+N
Sbjct  661   PPGAADTSFDWNVVLPGVEAAHQTTEQLHVNPCRTLVPPVTQEPLGKDSVPLTAFSLSNC  720

Query  721   YYRAQGDEVRHRERLTAVLSKLEKVVREEYGLMPTEPGPRPTLPRGLDELKAQMEEDLLK  780
             YY AQG+EVRHRERL +VLSKLE+VV EEYGLM T  GPRP LP GLDELK QMEEDLLK
Sbjct  721   YYPAQGNEVRHRERLNSVLSKLEEVVLEEYGLMSTGLGPRPVLPSGLDELKDQMEEDLLK  780

Query  781   LANAQTTSDMMAWAVEQVDLKTWVKNYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXSLPERKPVPAPR  840
             LAN Q TS+MMAWA EQVDLK WVK+YPRWTPPPPPP+VQPRKTK VKSLPE KPVPAPR
Sbjct  781   LANTQATSEMMAWAAEQVDLKAWVKSYPRWTPPPPPPRVQPRKTKSVKSLPEDKPVPAPR  840

Query  841   RKVGSDCGSPVSLGGDVPNSWEDLAVSSPFDXXXXXXXXXXXXXXVIVSSPQCIFRPATP  900
             RKV S CGSPV +G +VPN  EDL V  P + PTP EP TP SE V+  + Q + +  TP
Sbjct  841   RKVRSGCGSPVLMGDNVPNGSEDLTVGGPLNFPTPSEPMTPMSEPVLTPALQRVPKLMTP  900

Query  901   LSEPAPIPAPRGTVSRPVTPLSEPIPVPAPRRKFQQVKRLSSAAAIPPYQNEPLDLSASS  960
             L   AP+PAPR TVSRP+TPLSEPI + APR KFQQV+  + A     +QNEPLDLSASS
Sbjct  901   LDGSAPVPAPRRTVSRPMTPLSEPIFLSAPRHKFQQVEEANPATTTLTHQNEPLDLSASS  960

Query  961   QTEYEASPPAPPQSGGVLGVEGHEAEETLSEISDMSGNIKPAXXXXXXXXXXXRITRPKY  1020
             QTEYEASP A  Q+  +L   G EAEE LSEISD+  +  PA VSSSSSLSSV+ITRPKY
Sbjct  961   QTEYEASPLASSQNMSILEAGGQEAEEVLSEISDILNDTSPAPVSSSSSLSSVKITRPKY  1020

Query  1021  SAQAIIDSGGPCSGHLQEVKETCLSVMREACDATKLDDPATQEWLSRMWDRVDMLTWRNT  1080
             SAQAIIDSGGPCSGHLQ+ KE CLS+MREACDA+KL DPATQEWLSRMWDRVDMLTWRNT
Sbjct  1021  SAQAIIDSGGPCSGHLQKEKEACLSIMREACDASKLSDPATQEWLSRMWDRVDMLTWRNT  1080

Query  1081  SVYQAICTLDGRLKFLPKMILETPPPYPCEFVMMPHTPAPSVGAESDLTIGSVATEDVPR  1140
             S YQA  TL+GR +FLPKMILETPPP+PC FVM+PHTPAPSV AESDLTIGSVATEDVPR
Sbjct  1081  SAYQAFRTLNGRFEFLPKMILETPPPHPCGFVMLPHTPAPSVSAESDLTIGSVATEDVPR  1140

Query  1141  ILEKIENVGEMANQGPLAFSEDKPVDDQLVNDPRISSRRPDEXXXXXXXXXXXXXXXXDL  1200
             IL KI + GE+ NQGP A  +  PV DQ   + R+S R  DES  AP A TGGAGSFTDL
Sbjct  1141  ILGKIGDTGELLNQGPSAPFKGGPVCDQPAKNSRMSPRESDESIIAPPADTGGAGSFTDL  1200

Query  1201  PPSXXXXXXXXXPFRTVKRKAERLFDQLSRQVFDLVSHLPVFFSRLFYPGGGYSPGDWGX  1260
             P SD  DA+GGGP RTVK KA RL DQLS QVF LVSHLPVFFS LF    GYSPGDWGF
Sbjct  1201  PSSDSVDANGGGPLRTVKTKAGRLLDQLSCQVFSLVSHLPVFFSHLFKSDSGYSPGDWGF  1260

Query  1261  XXXXXXXXXXXYSYPAFGIAPLLGVFSGSSRRVRMGVFGCWLAFAVGLFKPVSDPVGAAC  1320
             AAFTL CLFLCYSYP FG APLLGVFSGSSRRVRMGVFGCWLAFAVGLFKPVSDPVG AC
Sbjct  1261  AAFTLFCLFLCYSYPFFGFAPLLGVFSGSSRRVRMGVFGCWLAFAVGLFKPVSDPVGTAC  1320

Query  1321  EFDSPECRNILHSFELLKPWDPVRSLVVGPVXXXXXXXXXXXXXXXXCIWHFLLRLGIVAD  1380
             EFDSPECRN+LHSFELLKPWDPVRSLVVGPVGLGLAILGRLLGGAR +WHFLLR GIVAD
Sbjct  1321  EFDSPECRNVLHSFELLKPWDPVRSLVVGPVGLGLAILGRLLGGARYVWHFLLRFGIVAD  1380

Query  1381  CILAGAYVLSQGRCKKCWGSCIRTAPNEVAFNVFPFTRATRSSLIDLCDRFCAPKGMDPI  1440
             CILAGAYVLSQGRCKKCWGSC+RTAPNE+AFNVFPFTRATRSSLIDLCDRFCAPKGMDPI
Sbjct  1381  CILAGAYVLSQGRCKKCWGSCVRTAPNEIAFNVFPFTRATRSSLIDLCDRFCAPKGMDPI  1440

Query  1441  FLATGWRGCWAGRSPIEQPSEKPIAFAQLDEKKITARTVVAQPYDPNQAVKCLRVLQAGG  1500
             FLAT WRGCW GRSPIEQPSEKPIAFAQLDEK+ITARTVVAQPYDPNQAVKCLRVLQAGG
Sbjct  1441  FLATVWRGCWTGRSPIEQPSEKPIAFAQLDEKRITARTVVAQPYDPNQAVKCLRVLQAGG  1500

Query  1501  AMXXXXXXXXXXXXXXXFRAPFFPTGXXXXXXXXXXXXXXTFTAALRSGYSTTNLVLGVG  1560
             AMVA+AVPKVVKVSA+PFRAPFFP GVKVDP+CR+VVDPDTFT ALRSGYSTTNLVLG+G
Sbjct  1501  AMVAEAVPKVVKVSAIPFRAPFFPAGVKVDPECRIVVDPDTFTTALRSGYSTTNLVLGMG  1560
```

```
Query  1561  DFAQLNGLKIRQISKPSGGGPHLMAALHVACSMALHMLAGIYVTAVGSCGTGTNDPWCAN  1620
             DFAQLNGLKIRQISKPSGGG HL+AALHVACSMALHMLAG+YVTAVGSCGTGTNDPWC N
Sbjct  1561  DFAQLNGLKIRQISKPSGGGSHLVAALHVACSMALHMLAGVYVTAVGSCGTGTNDPWCTN  1620

Query  1621  PFAVPGYGPGSLCTSRLCIYQHGLTLPLTALVAGFGIQEIALVVLIFVSIGGMAHRLSCK  1680
             PFA PGYGPGSLCTSRLCI QHGLTLPLTALVAGFG+QEIALVVLIFVS+GGMAHRLSCK
Sbjct  1621  PFAAPGYGPGSLCTSRLCISQHGLTLPLTALVAGFGLQEIALVVLIFVSMGGMAHRLSCK  1680

Query  1681  ADMLCVLLAIASYVWVPLTWLLCVFPCWLRCFSLHPLTILWLVFFLISVNMPSGIXXXXX  1740
             ADMLC+LLAIASYVWVPLTWLLCVFPCWLR FSLHPLTILWLVFFLISVN+PSGILA+VL
Sbjct  1681  ADMLCILLAIASYVWVPLTWLLCVFPCWLRWFSLHPLTILWLVFFLISVNIPSGILAVVL  1740

Query  1741  XXXXXXXGRYTNVAGLVTPYDIHHYTSGPRGVAALATAPDGTYLAAVRRAALTGRTMLFT  1800
             LVSLWLLGRYTN+AGLVTPYDIHHYTSGPRGVAALATAPDGTYLAAVRRAALTGRTMLFT
Sbjct  1741  LVSLWLLGRYTNIAGLVTPYDIHHYTSGPRGVAALATAPDGTYLAAVRRAALTGRTMLFT  1800

Query  1801  PSQLGSLLEGAFRTRKPSLNTVNVIGSSMGSGGVFTIDGKVKCVTAAHVLTGNSARVSGV  1860
             PSQLGSLLEGAFRT+KPSLNTVNV+GSSMGSGGVFTIDGK+KCVTAAHVLTGNSARVSGV
Sbjct  1801  PSQLGSLLEGAFRTQKPSLNTVNVVGSSMGSGGVFTIDGKIKCVTAAHVLTGNSARVSGV  1860

Query  1861  GFNQMLDFDVKGDFAIADCPNWQGAAPKTQFCTDGWTGRAYWLTSSGVEPGVIGKGFAFC  1920
             GFNQMLDFDVKGDFAIADCPNWQGAAPK QFC DGWTGRAYWLTSSGVEPGVIG GFAFC
Sbjct  1861  GFNQMLDFDVKGDFAIADCPNWQGAAPKAQFCEDGWTGRAYWLTSSGVEPGVIGNGFAFC  1920

Query  1921  FTACGDSGSPVITEAGELVGVHTGSNKQGGGIVTRPSGQFCNVAPIKLSELSEFFAGPKV  1980
             FTACGDSGSPVITEAGELVGVHTGSNKQGGGIVTRPSGQFCNV PIKLSELSEFFAGPKV
Sbjct  1921  FTACGDSGSPVITEAGELVGVHTGSNKQGGGIVTRPSGQFCNVTPIKLSELSEFFAGPKV  1980

Query  1981  PLGDVKVGSHIIKDISEVPSDLCALLAAKPELEGGLSTVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPLV  2040
             PLGDVK+GSHIIKD  EVPSDLCALLAAKPELEGGLSTVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPLV
Sbjct  1981  PLGDVKIGSHIIKDTCEVPSDLCALLAAKPELEGGLSTVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPLV  2040

Query  2041  AVSFFILNEVLPAVLVRSVFSFGMFVLSWLTPWSAQVLMIRLLTAALNRNRWSLAFFSLG  2100
             AV FFILNE+LPAVLVRSVFSFGMFVLSWLTPWSAQVLMIRLLTAALNRNR SL F+SLG
Sbjct  2041  AVGFFILNEILPAVLVRSVFSFGMFVLSWLTPWSAQVLMIRLLTAALNRNRLSLGFYSLG  2100

Query  2101  AVTGFVADLAATQGHPLQAVMNLSTYAFLPRMMVVTSPVPVITCGVVHLLAIILYLFKYR  2160
             AVT FVADLA TQGHPLQ VMNLSTYAFLPRMMVVTSPVPVI CGVVHLLAIILYLFKYR
Sbjct  2101  AVTSFVADLAVTQGHPLQVVMNLSTYAFLPRMMVVTSPVPVIACGVVHLLAIILYLFKYR  2160

Query  2161  GLHHILVGDGVFSAAFFLRYFAEGKLREGVSQSCGMNHESLTGALAMRLNDEDLDFLMKW  2220
              LH++LVGDGVFS+AFFLRYFAEGKLREGVSQSCGM+HESLTGALAMRL DEDLDFL KW
Sbjct  2161  CLHYVLVGDGVFSSAFFLRYFAEGKLREGVSQSCGMSHESLTGALAMRLTDEDLDFLTKW  2220

Query  2221  TDFKCFVSASNMRNAAGQFIEAAYAKALRVELAQLVQVDKVRGTLAKLEAFADTVAPQLS  2280
             TDFKCFVSASNMRNAAGQFIEAAYAKALR+ELAQLVQVDKVRGTLAKLEAFADTVAPQLS
Sbjct  2221  TDFKCFVSASNMRNAAGQFIEAAYAKALRIELAQLVQVDKVRGTLAKLEAFADTVAPQLS  2280

Query  2281  PGDIVVALRHTPVGSIFDLKVGITKHTLQAIETRVLAGSKMXXXXXXXXXXXXXXXXXX  2340
             PGDIVVAL HTPVGSIFDLKVG TKHTLQAIETRVLAGSKMTVARVVDPTP PPP PVPI
Sbjct  2281  PGDIVVALGHTPVGSIFDLKVGSTKHTLQAIETRVLAGSKMTVARVVDPTPAPPPVPVPI  2340

Query  2341  XXXXXXLENGPNAWGDEDRLNKKKRRRMEALGIYVMGGKKYQKFWDKNSGDVFYEEVHNN  2400
             PLPPKVLENGPNAWGDEDRLNKKKRRRMEA+GI+VM GKKYQKFWDKNSGDVFYEEVHN+
Sbjct  2341  PLPPKVLENGPNAWGDEDRLNKKKRRRMEAVGIFVMDGKKYQKFWDKNSGDVFYEEVHNS  2400

Query  2401  TDEWECLRVGDPADFDPEKGTLCGHVTIENKAYHVYTSPSGKKFLVPVNPENGRVQWEAA  2460
             TDEWECLR GDPADFDPE G  CGH+TIE++ Y+V+TSPSG+KFLVP NPEN R QWEAA
Sbjct  2401  TDEWECLRAGDPADFDPETGVQCGHITIEDRVYNVFTSPSGRKFLVPANPENRRAQWEAA  2460

Query  2461  KLSVEQALGMMNVDGELTAKELEKLKRIIDKLQGLTKEQCLNC  2503
             KLSVEQALGMMNVDGELTAKELEKLK IIDKLQGLTKEQCLNC
Sbjct  2461  KLSVEQALGMMNVDGELTAKELEKLKGIIDKLQGLTKEQCLNC  2503
```

ผลการเปรียบเทียบโปรตีน ORF1b

```
>gi|62511097|sp|Q9YN02|RPOA_PRRS1  Replicase polyprotein 1ab (ORF1ab polyprotein)
              [Includes: Replicase polyprotein 1a (ORF1a)]
              [Contains: Nsp1-alpha papain-like cysteine proteinase (PCP1-alpha); Nsp1-beta
              papain-like cysteine proteinase (PCP1-beta); Nsp2 cysteine proteinase
              (CP2)(CP); Nonstructural protein 3 (Nsp3); 3C-like serine proteinase (3.4.21.-
              )(3CLSP) (Nsp4); Nonstructural protein 5-6-7 Nsp5-6-7); Nonstructural protein
              8 (Nsp8); RNA-directed RNA polymerase (RdRp) (Pol) (Nsp9); Helicase (Hel)
              (Nsp10); Nonstructural protein 11 (Nsp11); Nonstructural protein 12
              (Nsp12)]Length=3966

 Score = 2996 bits (7767),  Expect = 0.0
 Identities = 1450/1461 (99%), Positives = 1457/1461 (99%), Gaps = 0/1461 (0%)

Query  1     VFKLLAASDLTRCGRGGLVVTETAVKIVKFHNRTFTLGPVNLKVASEVELKDAVEHNQHP  60
             VFKLLAAS LTRCGRGGLVVTETAVKIVKFHNRTFTLGPVNLKVASEVELKDAVEHNQHP
Sbjct  2506  VFKLLAASGLTRCGRGGLVVTETAVKIVKFHNRTFTLGPVNLKVASEVELKDAVEHNQHP  2565

Query  61    VARPIDGGVVLLRSAVPSLIDVLISGADASPKLLAHHGPGNTGIDGTLWDFESEATKEEV  120
             VARPIDGGVVLLRSAVPSLIDVLISGADASPKLLAHHGPGNTGIDGTLWDFESEATKEEV
Sbjct  2566  VARPIDGGVVLLRSAVPSLIDVLISGADASPKLLAHHGPGNTGIDGTLWDFESEATKEEV  2625

Query  121   ALSAQIIQACDIRRGDAPEIGLPYKLHPVRGNPERVKGVLQNTRFGDIPYKTPSDTGSPV  180
             ALSAQIIQACDIRRGDAP+IGLPYKL+PVRGNPERVKGVLQNTRFGDIPYKTPSDTGSPV
Sbjct  2626  ALSAQIIQACDIRRGDAPKIGLPYKLYPVRGNPERVKGVLQNTRFGDIPYKTPSDTGSPV  2685

Query  181   HAAACLTPNATPVTDGRSVLATTMPPGFELYVPTIPASVLDYLDSRPDCPKLLTEHGCKD  240
             HAAACLTPNATPVTDGRSVLATTMPPGFELYVPTIPASVLDYLDSRPDCPK LTEHGC+D
Sbjct  2686  HAAACLTPNATPVTDGRSVLATTMPPGFELYVPTIPASVLDYLDSRPDCPKQLTEHGCED  2745

Query  241   AALKDLSKYDLSTQGFVLPGVLRLVRKYLFAHVGKCPPVHRPSTYPAKNSMAGINGNRFP  300
             AALKDLSKYDLSTQGFVLPGVLRLVRKYLFAHVGKCPPVHRPSTYPAKNSMAGINGNRFP
Sbjct  2746  AALKDLSKYDLSTQGFVLPGVLRLVRKYLFAHVGKCPPVHRPSTYPAKNSMAGINGNRFP  2805

Query  301   TKDIQSVPEIDVLCAQAVRENWQTVTPCTLKKQYCGKKKTRTILGTNNFIALAHRAVLSG  360
             TKDIQSVPEIDVLCAQAVRENWQTVTPCTLKKQYCGKKKTRTILGTNNFIALAHRA LSG
Sbjct  2806  TKDIQSVPEIDVLCAQAVRENWQTVTPCTLKKQYCGKKKTRTILGTNNFIALAHRAALSG  2865

Query  361   VTQGFMKKAFNSPIALGKNKFKELQTPVLGRCLEADLASCDRSTPAIVRWFAANLLYELA  420
             VTQGFMKKAFNSPIALGKNKFKELQT VLGRCLEADLASCDRSTPAIVRWFAANLLYELA
Sbjct  2866  VTQGFMKKAFNSPIALGKNKFKELQTSVLGRCLEADLASCDRSTPAIVRWFAANLLYELA  2925

Query  421   CAEEHLPSYVLNCCHDLLVTQSGAVTKRGGLSSGDPITSVSNTIYSLVIYAQHMVLSYFK  480
             CAEEHLPSYVLNCCHDLLVTQSGAVTKRGGLSSGDPITSVSNTIYSLVIYAQHMVLSYFK
Sbjct  2926  CAEEHLPSYVLNCCHDLLVTQSGAVTKRGGLSSGDPITSVSNTIYSLVIYAQHMVLSYFK  2985

Query  481   SGHPHGLLFLQDQLKFEDMLKVQPLIVYSDDLVLYAESPTMPNYHWWVEHLNLMLGFQTD  540
             SGHPHGLLFLQDQLKFEDMLKVQPLIVYSDDLVLYAESPTMPNYHWWVEHLNLMLGFQTD
Sbjct  2986  SGHPHGLLFLQDQLKFEDMLKVQPLIVYSDDLVLYAESPTMPNYHWWVEHLNLMLGFQTD  3045

Query  541   PKKTAITDSPSFLGCRIINGRQLVPNRDRILAALAYHMKASNVSEYYASAAAILMDSCAC  600
             PKKTAITDSPSFLGCRIINGRQLVPNRDRILAALAYHMKASNVSEYYASAAAILMDSCAC
Sbjct  3046  PKKTAITDSPSFLGCRIINGRQLVPNRDRILAALAYHMKASNVSEYYASAAAILMDSCAC  3105

Query  601   LEYDPEWFEELVVGIAQCARKDGYSFPGTPFFMSMWEKLRSNYEGKKSRVCGYCGAPAPY  660
             LEYDPEWFEELVVGIAQCARKDGYSFPGTPFFMSMWEKLRSNYEGKKSRVCGYCGAPAPY
Sbjct  3106  LEYDPEWFEELVVGIAQCARKDGYSFPGTPFFMSMWEKLRSNYEGKKSRVCGYCGAPAPY  3165

Query  661   ATACGLDVCIYHTHFHQHCPVTIWCGHPAGSGSCSECKSPVGKGTSPLDEVLEQVPYKPP  720
             ATACGLDVCIYHTHFHQHCPVTIWCGHPAGSGSCSECKSPVGKGTSPLDEVLEQVPYKPP
Sbjct  3166  ATACGLDVCIYHTHFHQHCPVTIWCGHPAGSGSCSECKSPVGKGTSPLDEVLEQVPYKPP  3225

Query  721   RTVIMHVEQGLTPLDPGRYQTRRGLVSVRRGIRGNEVELPDGDYASTALLPTCKEINMVA  780
             RTVIMHVEQGLTPLDPGRYQTRRGLVSVRRGIRGNEVELPDGDYASTALLPTCKEINMVA
Sbjct  3226  RTVIMHVEQGLTPLDPGRYQTRRGLVSVRRGIRGNEVELPDGDYASTALLPTCKEINMVA  3285

Query  781   VASNVLRSRFIIGPPGAGKTYWLLQQVQDGDVIYTPTHQTMLDMIRALGTCRFNVPAGTT  840
             VASNVLRSRFIIGPPGAGKTYWLLQQVQDGDVIYTPTHQTMLDMIRALGTCRFNVPAGTT
```

```
Sbjct  3286  VASNVLRSRFIIGPPGAGKTYWLLQQVQDGDVIYTPTHQTMLDMIRALGTCRFNVPAGTT  3345

Query  841   LQFPVPSRTGPWVRILAGGWCPGKNSFLDEAAYCNHLDVLRLLSKTTLTCLGDFKQLHPV  900
             LQFPVPSRTGPWVRILAGGWCPGKNSFLDEAAYCNHLDVLRLLSKTTLTCLGDFKQLHPV
Sbjct  3346  LQFPVPSRTGPWVRILAGGWCPGKNSFLDEAAYCNHLDVLRLLSKTTLTCLGDFKQLHPV  3405

Query  901   GFDSHCYVFDIMPQTQLKTIWRFGQNICDAIQPDYRDKLMSMVNTTRVTHVEKPVRYGQV  960
             GFDSHCYVFDIMPQTQLKTIWRFGQNICDAIQPDYRDKLMSMVNTTRVT+VEKPVRYGQV
Sbjct  3406  GFDSHCYVFDIMPQTQLKTIWRFGQNICDAIQPDYRDKLMSMVNTTRVTYVEKPVRYGQV  3465

Query  961   LTPYHRDREDDAITIDSSQGATFDVVTLHLPTKDSLNRQRALVAITRARHAIFVYDPHRQ  1020
             LTPYHRDREDDAITIDSSQGATFDVVTLHLPTKDSLNRQRALVAITRARHAIFVYDPHRQ
Sbjct  3466  LTPYHRDREDDAITIDSSQGATFDVVTLHLPTKDSLNRQRALVAITRARHAIFVYDPHRQ  3525

Query  1021  LQGLFDLPAKGTPVNLAVHRDGQLIVLDRNNKECTVAQALGNGDKFRATDKRVVDSLRAI  1080
             LQGLFDLPAKGTPVNLAVHRDGQLIVLDRNNKECTVAQALGNGDKFRATDKRVVDSLRAI
Sbjct  3526  LQGLFDLPAKGTPVNLAVHRDGQLIVLDRNNKECTVAQALGNGDKFRATDKRVVDSLRAI  3585

Query  1081  CADLEGSSSPLPKVAHNLGFYFSPDLTQFAKLPVELAPHWPVVTTQNNEKWPDRLVASLR  1140
             CADLEGSSSPLPKVAHNLGFYFSPDLTQFAKLPVELAPHWPVVTTQNNEKWPDRLVASLR
Sbjct  3586  CADLEGSSSPLPKVAHNLGFYFSPDLTQFAKLPVELAPHWPVVTTQNNEKWPDRLVASLR  3645

Query  1141  PIHKYSRACIGAGYMVGPSVFLGTPGVVSYYLTKFVKGEAQLLPETVFSTGRIEVDCREY  1200
             PIHKYSRACIGAGYMVGPSVFLGTPGVVSYYLTKFVKGEAQLLPETVFSTGRIEVDCREY
Sbjct  3646  PIHKYSRACIGAGYMVGPSVFLGTPGVVSYYLTKFVKGEAQLLPETVFSTGRIEVDCREY  3705

Query  1201  LDDREREVAASLPHAFIGDVKGTTVGGCHHVTSRYLPRVLPKESVAVVGVSSPGKAAKAL  1260
             LDDREREVAASLPHAFIGDVKGTTVGGCHHVTSRYLPRVLPKESVAVVGVSSPGKAAKAL
Sbjct  3706  LDDREREVAASLPHAFIGDVKGTTVGGCHHVTSRYLPRVLPKESVAVVGVSSPGKAAKAL  3765

Query  1261  CTLTDVYLPDLEAYLHPETQSKCWKMMLDFKEVRLMVWKDKTAYFQLEGRYFTWYQLASY  1320
             CTLTDVYLPDLEAYLHPETQSKCWKMMLDFKEVRLMVW+DKTAYFQLEGRYFTWYQLASY
Sbjct  3766  CTLTDVYLPDLEAYLHPETQSKCWKMMLDFKEVRLMVWRDKTAYFQLEGRYFTWYQLASY  3825

Query  1321  ASYIRVPVNSTVYLDPCMGPALCNRRVVGSTHWGADLAVTPYDYGAKIILSSAYHGEMPP  1380
             ASYIRVPVNSTVYLDPCMGPALCNRRVVGSTHWGADLAVTPYDYGAKIILSSAYHGEMPP
Sbjct  3826  ASYIRVPVNSTVYLDPCMGPALCNRRVVGSTHWGADLAVTPYDYGAKIILSSAYHGEMPP  3885

Query  1381  GYKILACAEFSLDDPVKYKHTWGFESDTAYLYEFTGNGEDWEDYNDAFRARQEGKIYKAT  1440
             GYKILACAEFSLDDPV+YKHTWGFESDTAYLYEFTGNGEDWEDYNDAFRARQEGKIYKAT
Sbjct  3886  GYKILACAEFSLDDPVRYKHTWGFESDTAYLYEFTGNGEDWEDYNDAFRARQEGKIYKAT  3945

Query  1441  ATSLKFYFPPGPVIEPTLGLN  1461
             ATSLKF+FPPGPVIEPTLGLN
Sbjct  3946  ATSLKFHFPPGPVIEPTLGLN  3966
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

รายละเอียดของ conserved domain จากผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ 01NP1 กับฐานข้อมูล GenBank

---

Conserved domain ของโปรตีน ORF1a

Show Domain Relatives

PSSMs producing significant alignments	Score (bits)	E value
gnl|CDD|23803 pfam05579, Peptidase_S32, Equine arteritis virus serine endope...	686	0.0

---

gnl|CDD|23803 pfam05579, Peptidase_S32, Equine arteritis virus serine endopeptidase S32. Serine peptidases involved in processing nidovirus polyprotein..

```
CD-Length = 423 residues, 100.0% aligned
Score =  686 bits (1771), Expect = 0.0

Query:  1832  GGVFTIDGKVKCVTAAHVLTGNSARVSGVGFNQMLDFDVKGDFAIADCPNWQGAAPKTQF  1891
Sbjct:  1     GGVFTINGNVVVVTASHVLGGNKARVSGVGFNQMLTFKTNGDYAFAVVPEWPGAAPKLKF  60

Query:  1892  CTDGWTGRAYWLTSSGVEPGVIGKGFAFCFTACGDSGSPVITEAGELVGVHTGSNKQGGG  1951
Sbjct:  61    AQRT-TGRAYWCTSTGVEPGLLGKGFAFCFTKCGDSGSPVVTEDGNLVGVHTGSNKRGSG  119

Query:  1952  IVTRPSGQFCNVAPIKLSELSEFFAGPKVPLGDVKVGSHIIKDISEVPSDLCALLAAKPE  2011
Sbjct:  120   MVTTPSGKTLGMAPVKLSELSKHFAGPGVPVGDVKLPKNIIVDVEAVPSDLAALLESLPN  179

Query:  2012  LEGGLSTVQLLCVFFLLWRMMGHAWTPLVAVSFFILNEVLPAVLVRSVFSFGMFVLSWLT  2071
Sbjct:  180   LEGGLSTVQLLCVFFFLWRYMGHAWTPVVAVAFFLLNEILPKVLVRLVFSFALFLLAWFT  239

Query:  2072  PWSAQVLMIRLLTAALNRNRWSLAFFSLGAVTGFVADLAATQGHPLQAVMNLSTYAFLPR  2131
Sbjct:  240   PLSAQVLLIPLVTAALNRNVISLAFYALGAGTGFLAELWFGG--RLEALRFLSTYLFLPR  297

Query:  2132  MMVVTSPVPVITCGVVHLLAIILYLFKYRGLHHILVGDGVFSAAFFLRYFAEGKLREGVS  2191
Sbjct:  298   VLVVTSPIPFITIGAVHVLALLLSLFKYPLLADVLVGDGSFDAAFFLKYFAEGNLREGVS  357

Query:  2192  QSCGMNHESLTGALAMRLNDEDLDFLMKWTDFKCFVSASNMRNAAGQFIEAAYAKALRVE  2251
Sbjct:  358   QSCGMTPESLTAALACTLSDDDLDFLSRHTDFKCFVSASNMRNAAGQFIEAAYAKALRAS  417

Query:  2252  LAQLVQ  2257
Sbjct:  418   LAQVDQ  423
```

Conserved domain ของโปรตีน ORF1b

Show Domain Relatives

PSSMs producing significant alignments	Score (bits)	E value
gnl|CDD|7718 pfam00680, RNA_dep_RNA_pol, RNA dependent RNA polymerase..	55.3	5e-08
gnl|CDD|7997 pfam01443, Viral_helicase1, Viral (Superfamily 1) RNA helicase...	54.7	7e-08
gnl|CDD|10378 COG0507, RecD, ATP-dependent exoDNAse (exonuclease V), alpha s...	46.6	2e-05

---

gnl|CDD|7718 pfam00680, RNA_dep_RNA_pol, RNA dependent RNA polymerase..

```
CD-Length = 483 residues, only  38.3% aligned
Score = 55.3 bits (133), Expect = 5e-08

Query:  337   KKKTRTI----LGTNNFIALAHRAVLSGVTQGFMKKAFNSPIALGKNKFKELQTPVLGRC  392
Sbjct:  177   AGKTRLFTAAPLETL----LLGRVCFGDFNNFFYANPGKLGSAVGIDPDSRGWSKLLRRL  232

Query:  393   LEADLA-SCDRS------TPAIVRWFAANLLYELACAEEHLPSYVLNCCHDLLVTQSGAV  445
Sbjct:  233   PGGWVYCDADYSQFDSSLSPQVFNAVLEMIMEDFGGFSQMLTNLLTEICYSIHLPDGTVY  292

Query:  446   TKRGGLSSGDPITSVSNTIYSLVIYAQHMVLSYFKSGHPHGLLFLQDQLKFEDMLKVQPL  505
Sbjct:  293   KVEGGLPSGCPSTVVDNSIMNNLL----IRYALLKLYKNSEVIIDLDSFF---------I  339

Query:  506   IVYSDDLVLYAESPTMPNYHWWVEHL  531
Sbjct:  340   NAYGDDNLI----SVNPEIDPYLDAL  361
```

---

gnl|CDD|7997 pfam01443, Viral_helicase1, Viral (Superfamily 1) RNA helicase. Helicase activity for this family has been demonstrated and NTPase activity. This helicase has multiple roles at different stages of viral RNA replication, as dissected by mutational analysis..

```
CD-Length = 225 residues,  98.2% aligned
Score = 54.7 bits (131), Expect = 7e-08

Query:  793   GPPGAGKTYWLLQQVQDGDVIYTPTHQTMLDMIRALGTCRFNVPAGTTLQFPVPSRTGPW  852
Sbjct:  5     GVPGCGKSTLIQKLLRTLTVIRPTA---------ELRTEGKPDL---------PNLNVRT  46

Query:  853   VR--ILAGGWCPGKNSFLDE---AAYCNHLDVLRLLSKTTLTCLGDFKQLHPVGFDSHCY  907
Sbjct:  47    VDTFLMALLKPTGKILILDEYTLLPPGYILLLAAISGAKLVILFGDPLQIPYHSRAPSFL  106

Query:  908   VFDIMPQTQLKTIWRFGQNICDAIQPDYRDKLMSMVNTTRVTHVEKPVRY-------GQV  960
Sbjct:  107   I----PHFPSSLSHRVGRRTTYLLPSLRAPILSAKGFEVVVERSGEYVDYDPNGQPVLVY  162
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย