

บทที่ 4

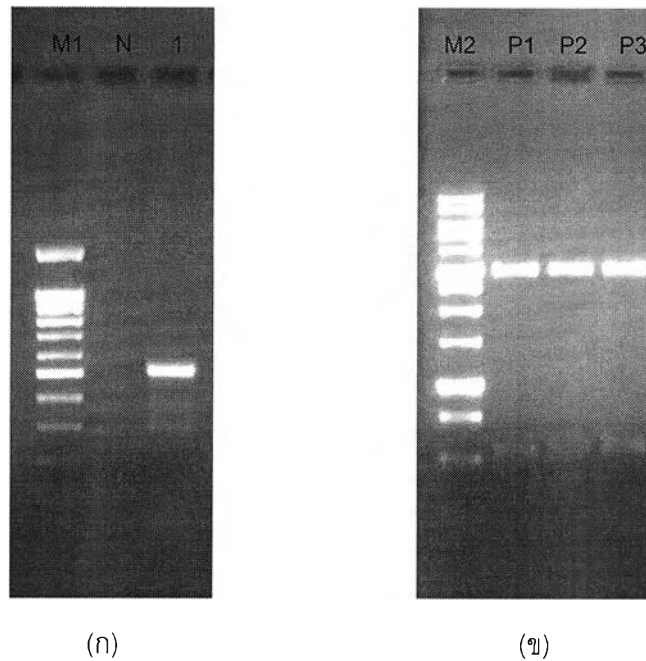
ผลการทดลอง

4.1 ผลการหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ

จากการทดลองข้อ 3.5 เมื่อนำ DNA ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ มาทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอน แล้วนำมาวิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 510 คู่เบส ดังรูปที่ 4.1 (ก) หลังจากนั้นทำการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่พลาสมิด แล้วจึงทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว 3 โคโลนี นำไปสกัดพลาสมิด และตรวจ recombinant พลาสมิด โดยการนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และนำไปตรวจสอบขนาดของ DNA ที่ตัดได้ ซึ่งถ้าเป็น recombinant พลาสมิด จะสามารถตัดได้ DNA 2 ขนาดคือ 3,000 คู่เบส และ 510 คู่เบส ดังรูปที่ 4.1 (ข)

เมื่อพบว่าพลาสมิดที่คัดเลือกมาเป็น recombinant พลาสมิด จึงทำการส่งตรวจหาลำดับเบส ได้ข้อมูลลำดับเบส ดังตารางที่ 4.1 และนำข้อมูลลำดับเบสส่วนที่เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 510 คู่เบส มาทำการ alignment กับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อ *T. evansi* 2 ข้อมูล (accession number U75507 และ D89527) และ *T. brucei* 1 ข้อมูล (accession number AE017168) โดยใช้โปรแกรม clustalW ดังตารางที่ 4.2 และสามารถนำมาสรุปเป็นรูปแบบ genotype ของเชื้อได้ทั้งหมด 9 genotypes และเฉพาะเชื้อ *T. evansi* isolate ที่ได้ทำการศึกษามี 7 genotypes ดังตารางที่ 4.3 พบว่า เชื้อ *T. brucei* accession number AE017168 และ *T. evansi* accession number U75507 มีรูปแบบ genotype เหมือนกันคือ genotype a ในขณะที่ *T. evansi* accession number D89527 มีรูปแบบ genotype b ส่วนเชื้อ *T. evansi* isolate ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มี genotype ดังนี้ Npl8/2_1 Npl8/2_2 และ Npl8/2_3 มีรูปแบบ genotype คือ c d และ e ตามลำดับ VPh03 มี 2 genotype คือ VPh03_1 และ VPh03_3 มีรูปแบบ genotype f และ VPh03_2 มีรูปแบบ genotype g VPs มีข้อมูลลำดับเบสเหมือนกันหมดทั้ง 3 พลาสมิด คือ genotype h VPd03G มี 2 genotype คือ VPd03G_1 มีรูปแบบ genotype i และ VPd03G_2 และ VPd03G_3 มีรูปแบบ genotype f และ VPd03R มี 2 genotype คือ VPd03R_1 และ VPd03R_2 มีรูปแบบ genotype f และ VPd03R_3 มีรูปแบบ genotype g

และได้นำเอาข้อมูลลำดับเบสที่ผ่านการ alignment มาแล้วมาสร้างเป็น phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA version 3 ด้วยวิธี Neighbor-Joining ดังรูปที่ 4.3 นอกจากนั้นยังได้นำข้อมูลมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Likelihood กำหนด bootstrap 1,000 replicates ดังแสดงในภาคผนวก ข



รูปที่ 4.1 : (ก) ผลจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR โดยการใส่ primer 18S-F และ 18S-R ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 510 คู่เบส

(ข) ผลจากการวิเคราะห์ผลการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จะได้ DNA 2 ขนาดคือ 3,000 คู่เบส และ 510 คู่เบส

lane M1 : 100 bp DNA ladder

lane M2 : 1 Kb DNA ladder

lane N : น้ำกลั่นบริสุทธิ์

lane 1 : เชื้อ *T. evansi*

lane P1, P2, P3 : พลาสมิดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ ที่นำมาศึกษา

<p>Npl 8/2 พลาสมิดที่ 1 (Npl8/2_1) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACGAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTCTACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAAT AACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTAT ATATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGG CTCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTGTTGAAG AACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTG CCCAATCTTT</p>
<p>Npl 8/2 พลาสมิดที่ 2 (Npl8/2_2) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACGAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAAT AACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTAT ATATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGG CTCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTGTTGAAG AACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTG CCCAATCTTT</p>
<p>Npl 8/2 พลาสมิดที่ 3 (Npl8/2_3) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTAAACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAAT AACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTAT ATATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGG CTCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTGTTGAAG AACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTG CCCAATCTTT</p>

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

<p>VPs พลาสมิดที่ 1 (VPs_1) (510 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATA TGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGGG ATGTTATATATAGTTCTGTTATTTTCTAATATGTATGTGTGTTAGAGTGTCT GTGTTAATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTGATAA CAAAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATTTTATGTATAT ATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCT CCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA CGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTATTGCC CAATCTTT</p>
<p>VPs พลาสมิดที่ 2 (VPs_2) (510 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATA TGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGGG ATGTTATATATAGTTCTGTTATTTTCTAATATGTATGTGTGTTAGAGTGTCT GTGTTAATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTGATAA CAAAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATTTTATGTATAT ATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCT CCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA CGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTATTGCC CAATCTTT</p>
<p>VPs พลาสมิดที่ 3 (VPs_3) (510 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATA TGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGGG ATGTTATATATAGTTCTGTTATTTTCTAATATGTATGTGTGTTAGAGTGTCT GTGTTAATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTGATAA CAAAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATTTTATGTATAT ATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCT CCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAA CGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTATTGCC CAATCTTT</p>

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

VPh03 พลาสมิดที่ 1 (VPh03_1) (511 คู่เบส)	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT
VPh03 พลาสมิดที่ 2 (VPh03_2) (511 คู่เบส)	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT
VPh03 พลาสมิดที่ 3 (VPh03_3) (511 คู่เบส)	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

<p>VPd03G พลาสมิดที่ 1 (VPd03G_1) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTTGATATCCATTATACAAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATATATAGTTCTGTTATTTTCTATTATGTATGTGTGTTAGGGTGC TGTGTTAATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATAA CACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATAT ATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCT CCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGAA CGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGCC CAATCTTT</p>
<p>VPd03G พลาสมิดที่ 2 (VPd03G_2) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>
<p>VPd03G พลาสมิดที่ 3 (VPd03G_3) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

<p>VPd03R พลาสมิดที่ 1 (VPd03R_1) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>
<p>VPd03R พลาสมิดที่ 2 (VPd03R_2) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>
<p>VPd03R พลาสมิดที่ 3 (VPd03R_3) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>

ตารางที่ 4.2 ผลการ alignment ของ small subunit rRNA gene ด้วยโปรแกรม ClustalW ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆที่ทำการศึกษา และ *T. evansi* และ *T. brucei* ที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank

<i>T. brucei</i> AE017168	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
<i>T. evansi</i> U75507	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
<i>T. evansi</i> D89527	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
NPI8/2_1	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
NPI8/2_2	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
NPI8/2_3	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPs_1	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPs_2	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPs_3	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPh03_1	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPh03_2	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPh03_3	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPd03G_1	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPD03G_2	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPd03G_3	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPd03R_1	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPd03R_2	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPd03R_3	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60

<i>T. brucei</i> AE017168	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAA-T	119
<i>T. evansi</i> U75507	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAA-T	119
<i>T. evansi</i> D89527	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
NPI8/2_1	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACGAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
NPI8/2_2	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACGAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
NPI8/2_3	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPs_1	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAA-T	119
VPs_2	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAA-T	119
VPs_3	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAA-T	119
VPh03_1	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPh03_2	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPh03_3	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPd03G_1	CTGGATCATTTTTTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPD03G_2	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPd03G_3	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPd03R_1	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPd03R_2	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPd03R_3	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120

<i>T. brucei</i> AE017168	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGCTTCTATATGCC	179
<i>T. evansi</i> U75507	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGCTTCTATATGCC	179
<i>T. evansi</i> D89527	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
NPI8/2_1	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
NPI8/2_2	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
NPI8/2_3	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
VPs_1	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	179
VPs_2	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	179
VPs_3	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	179
VPh03_1	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
VPh03_2	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
VPh03_3	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
VPd03G_1	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
VPD03G_2	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
VPd03G_3	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
VPd03R_1	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
VPd03R_2	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180
VPd03R_3	TGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATATATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCC	180

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

<i>T. brucei</i> AE017168	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGTTATATATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	239
<i>T. evansi</i> U75507	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGTTATATATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	239
<i>T. evansi</i> D89527	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
NPI8/2_1	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTCTACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
NPI8/2_2	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
NPI8/2_3	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTAAACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPs_1	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGTTATATATAGTTCTGTTATTTTCTAATATGTATGTG	239
VPs_2	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGTTATATATAGTTCTGTTATTTTCTAATATGTATGTG	239
VPs_3	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGTTATATATAGTTCTGTTATTTTCTAATATGTATGTG	239
VPh03_1	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPh03_2	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPh03_3	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPd03G_1	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATATATAGTTCTGTTATTTTCTATTATGTATGTG	240
VPD03G_2	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPd03G_3	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPd03R_1	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPd03R_2	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPd03R_3	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240

<i>T. brucei</i> AE017168	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	299
<i>T. evansi</i> U75507	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	299
<i>T. evansi</i> D89527	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
NPI8/2_1	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
NPI8/2_2	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
NPI8/2_3	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPs_1	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTG	299
VPs_2	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTG	299
VPs_3	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTG	299
VPh03_1	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPh03_2	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPh03_3	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPd03G_1	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPD03G_2	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPd03G_3	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPd03R_1	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPd03R_2	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPd03R_3	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300

<i>T. brucei</i> AE017168	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATATATGCT	359
<i>T. evansi</i> U75507	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATATATGCT	359
<i>T. evansi</i> D89527	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATATATGCT	360
NPI8/2_1	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATATATGCT	360
NPI8/2_2	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATATATGCT	360
NPI8/2_3	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATATATGCT	360
VPs_1	ATAACAAAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	359
VPs_2	ATAACAAAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	359
VPs_3	ATAACAAAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	359
VPh03_1	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
VPh03_2	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATATATGCT	360
VPh03_3	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
VPd03G_1	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATATATGCT	360
VPD03G_2	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
VPd03G_3	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
VPd03R_1	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
VPd03R_2	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
VPd03R_3	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATATATGCT	360

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

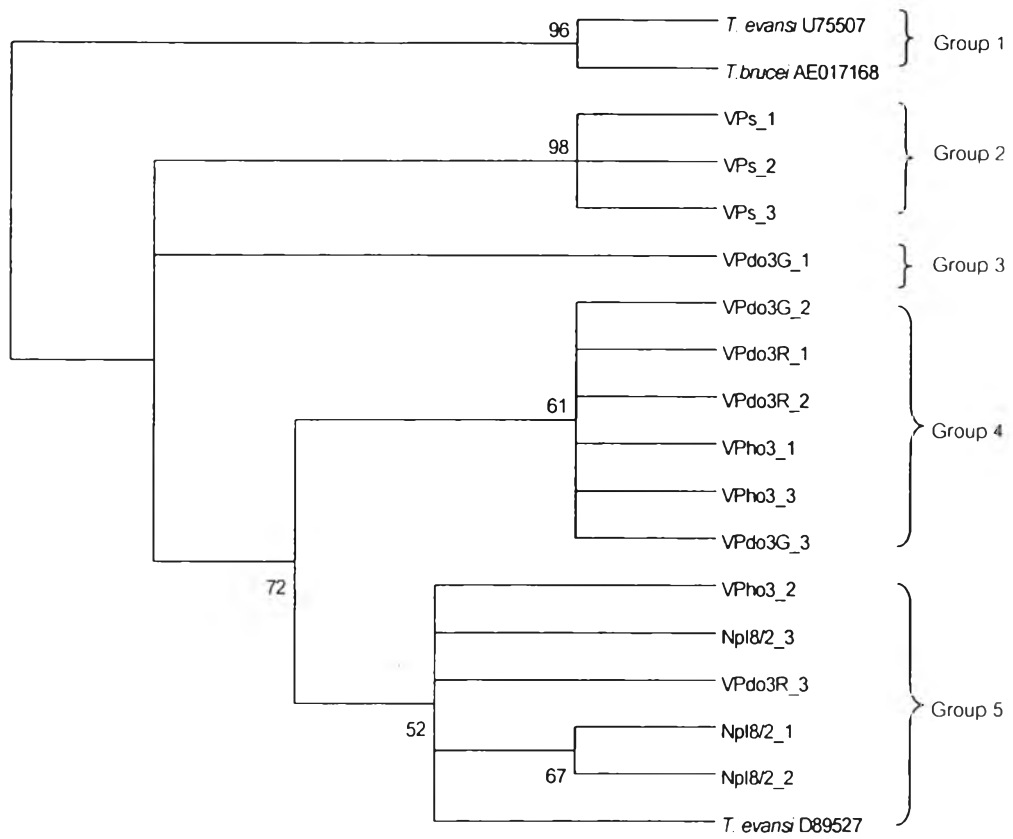
<i>T. brucei</i> AE017168	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	417
<i>T. evansi</i> U75507	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	417
<i>T. evansi</i> D89527	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	420
NPI8/2_1	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
NPI8/2_2	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
NPI8/2_3	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
VPs_1	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	417
VPs_2	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	417
VPs_3	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	417
VPh03_1	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
VPh03_2	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
VPh03_3	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
VPd03G_1	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
VPD03G_2	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
VPd03G_3	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
VPd03R_1	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
VPd03R_2	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418
VPd03R_3	ATGTGT--ATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTC	418

<i>T. brucei</i> AE017168	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	477
<i>T. evansi</i> U75507	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	477
<i>T. evansi</i> D89527	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	480
NPI8/2_1	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
NPI8/2_2	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
NPI8/2_3	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
VPs_1	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	477
VPs_2	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	477
VPs_3	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	477
VPh03_1	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
VPh03_2	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
VPh03_3	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
VPd03G_1	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
VPD03G_2	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
VPd03G_3	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
VPd03R_1	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
VPd03R_2	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478
VPd03R_3	GCGATGGATGACTTGGCTTCCATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGGGTAAGTGGA	478

<i>T. brucei</i> AE017168	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	510
<i>T. evansi</i> U75507	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	510
<i>T. evansi</i> D89527	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	513
NPI8/2_1	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
NPI8/2_2	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
NPI8/2_3	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPs_1	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	510
VPs_2	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	510
VPs_3	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	510
VPh03_1	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPh03_2	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPh03_3	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPd03G_1	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPD03G_2	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPd03G_3	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPd03R_1	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPd03R_2	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPd03R_3	TCAATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511

ตารางที่ 4.3 รูปแบบ genotype ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆที่ทำการศึกษา และ *T. evansi* และ *T. brucei* ที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank

เชื้อ trypanosomes	โคลินี้ที่	ตำแหน่งของ nucleotide ที่มีการเปลี่ยนแปลง																	genotype
		73	89	119	169	205	207	208	210	230	231	247	300	307	339	367	368	471	
<i>T. brucei</i> AE017168	-	C	A	-	C	T	A	T	T	T	C	A	A	C	T	-	-	G	a
<i>T. evansi</i> U75507	-	C	A	-	C	T	A	T	T	T	C	A	A	C	T	-	-	G	a
<i>T. evansi</i> D89527	-	C	A	A	T	C	A	T	C	T	C	A	A	C	T	G	T	A	b
Npl 8/2	1	C	G	A	T	C	C	T	C	T	C	A	A	C	T	-	-	A	c
	2	C	G	A	T	C	A	A	C	T	C	A	A	C	T	-	-	A	d
	3	C	A	A	T	C	A	T	C	T	C	A	A	C	T	-	-	A	e
VPho3	1,3	C	A	A	T	C	A	T	C	T	C	A	A	C	C	-	-	A	f
	2	C	A	A	T	C	A	T	C	T	C	A	A	C	T	-	-	A	g
VPs	1,2,3	C	A	-	T	T	A	T	T	A	T	A	G	A	C	-	-	A	h
VPd03G	1	T	A	A	T	C	A	T	T	T	C	G	A	C	T	-	-	A	i
	2,3	C	A	A	T	C	A	T	C	T	C	A	A	C	C	-	-	A	f
VPd03R	1,2	C	A	A	T	C	A	T	C	T	C	A	A	C	C	-	-	A	f
	3	C	A	A	T	C	A	T	C	T	C	A	A	C	T	-	-	A	g



รูปที่ 4.2 phylogenetic tree ของ small subunit rRNA gene ที่สร้างด้วยวิธี Neighbor-joining ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆที่ทำการศึกษา และ *T. evansi* และ *T. brucei* ที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank

4.2 ผลการหาความแตกต่างของ minisatellite ด้วยวิธี PCR

นำเอา DNA ของเชื้อ *T. evansi* ทุก isolate ที่สกัดได้จากการทดลองข้อ 3.4 มาทำปฏิกิริยา PCR ตามการทดลองข้อ 3.5 โดยใช้ primer 2 คู่ ได้แก่ NV4 และ NV5 และ 122-2 และ 122-3

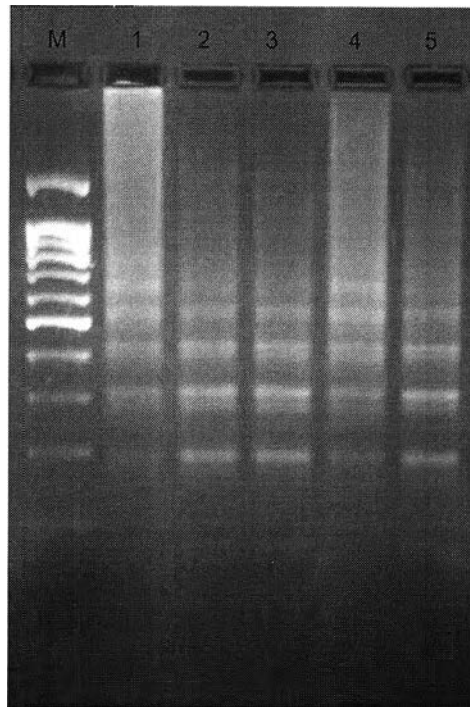
4.2.1 primer NV4 และ NV5

ผลจากนำเอาผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อแต่ละ isolate ที่ใช้ primer NV4 และ NV5 ในปฏิกิริยามาวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าเชื้อแต่ละ isolate ไม่มีความแตกต่างกันของ band ที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.3 แสดงว่า primer NV4 และ NV5 ไม่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างเชื้อแต่ละ isolate ได้

4.2.2 primer 122-2 และ 122-3

ผลจากนำเอาผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อแต่ละ isolate และ negative control ซึ่งได้แก่ DNA ของ หนู mice, สุนัข, ม้า, สุนัข, วัว, กระบือ และแกะ ที่ติดเชื้อ *T. evansi* ในกระแสเลือด ที่ใช้ primer 122-2 และ 122-3 ในปฏิกิริยา มาวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าเชื้อทุก isolate มี band อยู่ระหว่างประมาณ 200-2,500 คู่เบส และพบความแตกต่างกันของขนาดและจำนวนของ band ส่วน negative control ไม่มี band ของ DNA เกิดขึ้นเลย ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ

จากการนับจำนวน band ที่ได้ของเชื้อแต่ละ isolate และนำมาคำนวณหาค่า similarity coefficient (F) (Nei and Li, 1979) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อ isolate ที่ทำการศึกษาทั้งหมด 5 isolates พบว่า isolate Npl 8/2 และ isolate VPh03 (F=0.86) มีความคล้ายกันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ isolate VPh03 กับเชื้อ isolate อื่นๆ พบว่ามีความคล้ายกับเชื้อ isolate VPd03G และ VPd03R มากที่สุด (F=0.89) เชื้อ isolate VPs มีความคล้ายกับ VPh03 มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ isolate อื่น (F=0.76) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ isolate VPs มีความคล้ายกับ isolate อื่น น้อยที่สุด และเชื้อ isolate VPd03G และ VPd03R มีค่าเท่ากับ 1 หมายความว่าเชื้อทั้ง 2 isolate มีความเหมือนกัน ดังตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ผลจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer NV4 และ NV5 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

lane M : 100 base pair DNA ladder

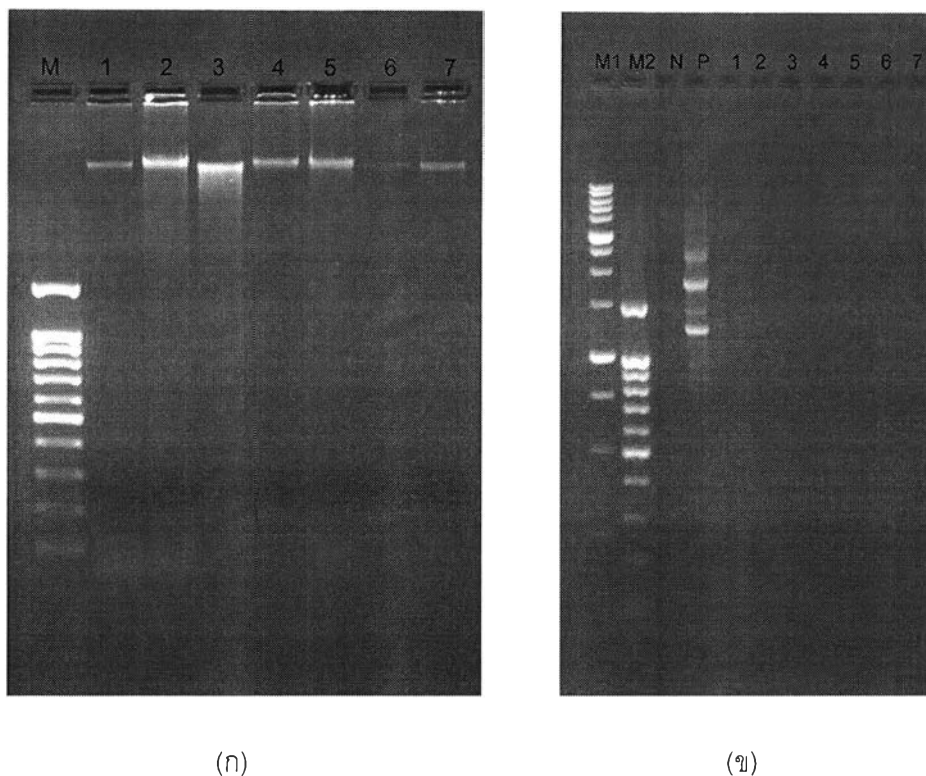
lane 1 : isolate Npl 8/2

lane 2 : isolate VPs

lane 3 : isolate VPh03

lane 4 : isolate VPd03G

lane 5 : isolate VPd03R



รูปที่ 4.4 : (ก) การตรวจหา DNA ของสัตว์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

(ข) ผลจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer 122-2 และ 122-3 ด้วยวิธี

agarose gel electrophoresis

lane M และ M2 : 100 base pair DNA ladder

lane M1 : 1 Kb DNA ladder

lane N : น้ำกลั่นบริสุทธิ์

lane P : เชื้อ isolate Npl 8/2

lane 1 : DNA หนู mice

lane 2 : DNA สุนัข

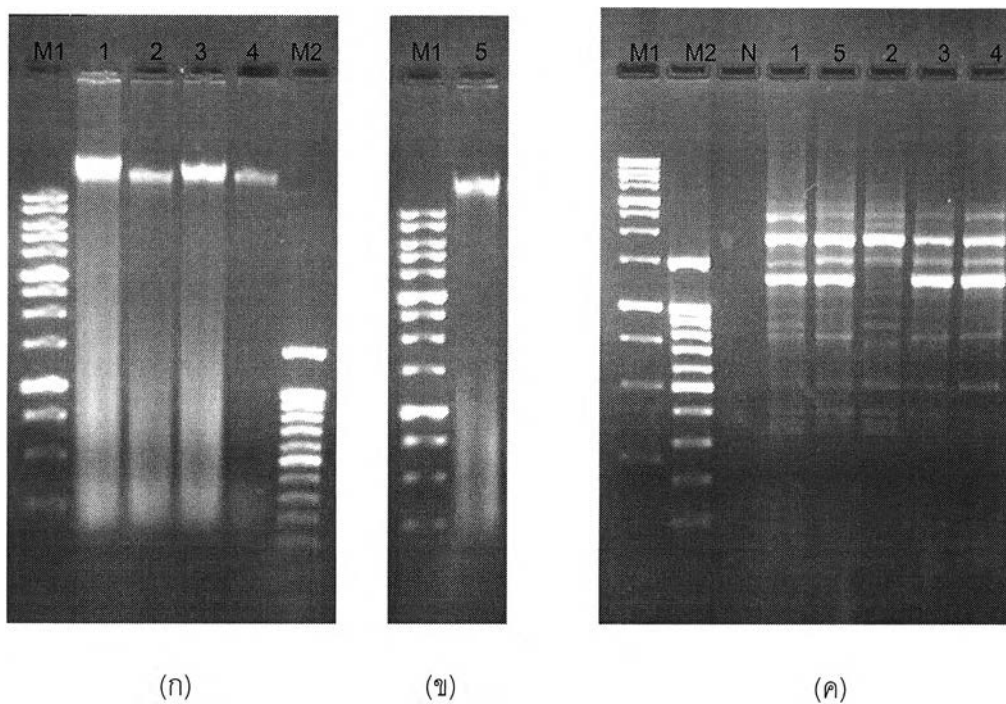
lane 3 : DNA ม้า

lane 4 : DNA สุนัข

lane 5 : DNA วัว

lane 6 : DNA กระบือ

lane 7 : DNA แกะ



รูปที่ 4.5 : (ก) และ (ข) การตรวจหา DNA ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

(ค) ผลจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer 122-2 และ 122-3 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

lane M1 : 1 Kb DNA ladder

lane M2 : 100 bp DNA ladder

lane N : น้ำกลั่นบริสุทธิ์

lane 1 : isolate Npl 8/2

lane 2 : isolate VPs

lane 3 : isolate VPd03G

lane 4 : isolate VPd03R

lane 5 : isolate VPh03

ตารางที่ 4.4 ผลการคำนวณค่า similarity coefficient ระหว่างเชื้อแต่ละ isolate

	ค่า similarity coefficient ระหว่างเชื้อแต่ละ isolate				
	Npl 8/2	VPh03	VPs	VPd03G	VPd03R
Npl 8/2	-	-	-	-	-
VPh03	0.86	-	-	-	-
VPs	0.73	0.76	-	-	-
VPd03G	0.74	0.89	0.63	-	-
VPd03R	0.74	0.89	0.63	1.00	-

4.3 ผลการทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น

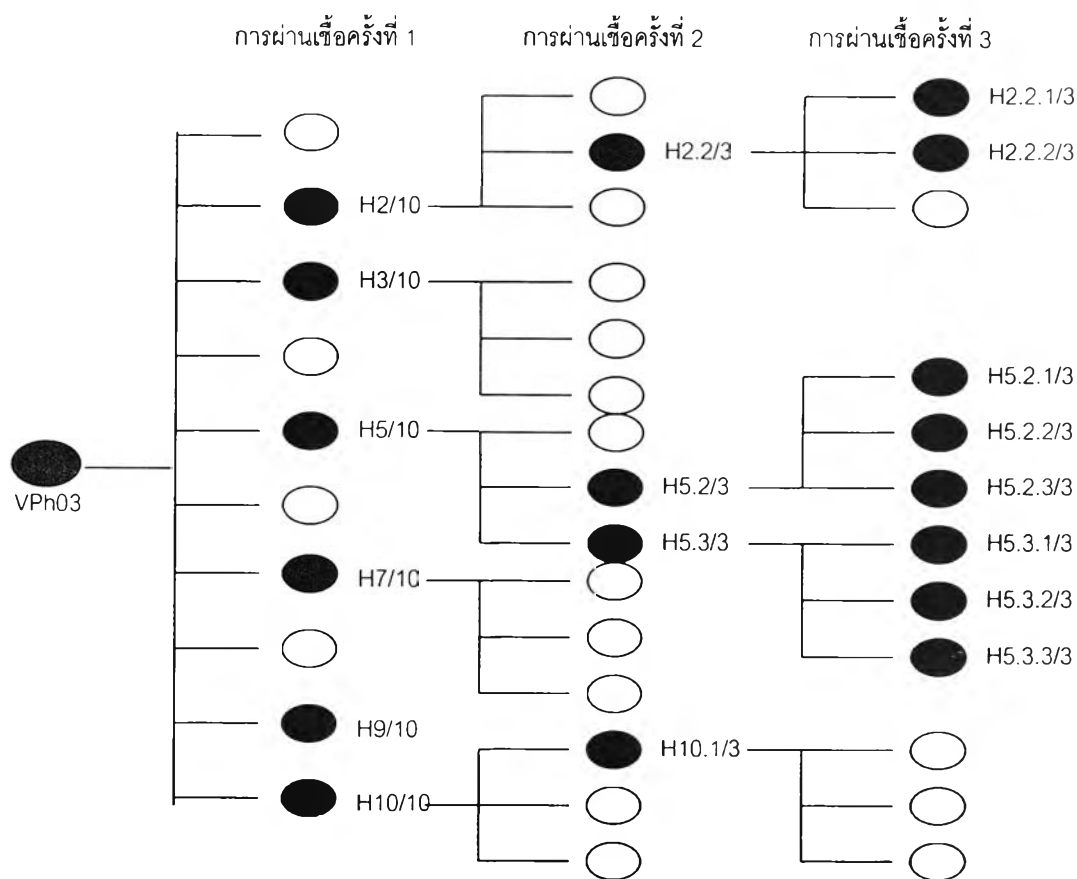
การทดลองในหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดยาคดภูมิคุ้มกัน และทำการตรวจเชื้อในกระแสเลือดจากปลายหางหนูเป็นเวลา 20 วัน ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของหนูทดลอง 2 ตัว ใน 5 ตัว โดยตรวจพบเชื้อในวันที่ 4 และ 6 หลังการฉีดเชื้อตามลำดับ

การผ่านเชื้อครั้งที่ 1 ตรวจพบว่าหนูมีเชื้ออยู่ในกระแสเลือดหลังจากฉีดเชื้อ 4 วัน เป็นจำนวน 7 ตัว ได้แก่หนูตัวที่ 2, 3, 5, 7, 8, 9 และ 10 ดังรูปที่ 4.6 และได้ทำการเก็บเลือดและสกัด DNA เก็บไว้ทุกตัว ยกเว้นหนูตัวที่ 8 และ 9 ซึ่งตายก่อนที่เชื้อจะมีปริมาณ 10^8 trypanosomes / เลือด 1 มิลลิลิตร และนำเลือดจากหนูทดลองที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดมาทำการผ่านเชื้อครั้งที่ 2 ต่อไป

การผ่านเชื้อครั้งที่ 2 ทำโดยผ่านเชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 1 พบว่า การผ่านเชื้อจากหนูตัวที่ 3 และ 7 จากการผ่านเชื้อครั้งที่ 1 ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือด การผ่านเชื้อจากหนูตัวที่ 2 ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดในหนูเพียง 1 ตัว คือ H2.2/3 และสามารถตรวจพบเชื้อในวันที่ 8 หลังการฉีดเชื้อ การผ่านเชื้อจากหนูตัวที่ 5 ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดในหนู 2 ตัว คือ H5.2/3 และ H5.3/3 โดยตรวจพบในวันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อทั้ง 2 ตัว และการผ่านเชื้อจากหนูตัวที่ 10 ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของ H10.1/3 เพียง 1 ตัว และตรวจพบในวันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อ โดยหนูทุกตัวที่ตรวจพบเชื้อในการผ่านเชื้อครั้งที่ 2 นี้ จะถูกเก็บเลือดและสกัด DNA ของเชื้อเก็บไว้ และนำเลือดจากหนูทดลองที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดมาทำการผ่านเชื้อครั้งที่ 3 ต่อไป

การผ่านเชื้อครั้งที่ 3 ได้ทำการผ่านเชื้อที่ได้จากการผ่านเชื้อครั้งที่ 2 ได้แก่ H2.2/3 H5.2/3 H5.3/3 และ H10.1/3 พบว่า การผ่านเชื้อจาก H2.2/3 สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของหนู 2 ตัว ในวันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อ ได้แก่ H2.2.1/3 และ H2.2.2/3 การผ่านเชื้อจาก H5.2/3 และ H5.3/3 ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของหนูทั้งหมด 3 ตัว และตรวจพบได้ในวันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อ ยกเว้น H5.2.1/3 เพียงตัวเดียวที่ตรวจพบเชื้อในวันที่ 8 หลังการฉีดเชื้อ และการผ่านเชื้อจาก

H10.1/3 ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดของหนูทั้ง 3 ตัว โดยหนูทุกตัวที่ตรวจพบเชื้อในการผ่านเชื้อครั้งที่ 3 นี้ จะถูกเก็บเลือดและสกัด DNA ของเชื้อเก็บไว้



รูปที่ 4.6 แผนผังการทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธ์ขึ้น : ○ คือหนูที่ตรวจไม่พบเชื้อ

T. evansi ในกระแสเลือด และ ● คือหนูที่ตรวจพบเชื้อ *T. evansi* ในกระแสเลือด และนำเชื้อ isolate VPh03, H2/10, H2.2/3 และ H2.2.1/3 มาทำปฏิกิริยา PCR และนำผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่พลาสมิด และนำมาหาลำดับเบสในช่วง 18S rRNA gene, ITS1 และ 5.8S rRNA gene เชื้อละ 3 พลาสมิด

4.3.1 การหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้น

เลือกเชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 1 2 และ 3 มาทำการทดลองดังนี้ การผ่านเชื้อครั้งที่ 1 เลือก H2/10 การผ่านเชื้อครั้งที่ 2 เลือก H2.2/3 และการผ่านเชื้อครั้งที่ 3 เลือก H2.2.1/3 (ดังรูปที่ 4.6) มาทำปฏิกิริยา PCR และนำผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่พลาลสมิต เพื่อส่งตรวจหาลำดับเบสในช่วง 18S rRNA gene/ITS1/5.8S rRNA gene ดังแสดงผลการตรวจหาลำดับเบสในตารางที่ 4.5 นำผลการหาลำดับเบสของเชื้อที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นของการผ่านเชื้อทั้ง 3 ครั้ง มาเปรียบเทียบกับเชื้อ isolate VPh03 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้น โดยการนำ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และได้สรุปเป็นรูปแบบของ genotype ของเชื้อที่ผ่านและไม่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้น ซึ่งเชื้อ isolate VPh03 มี genotype 2 รูปแบบ คือ genotype f และ g ดังแสดงไว้แล้วในตารางที่ 4.3 เชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 1 (H2/10) มี genotype เพียงรูปแบบเดียว คือ genotype f เชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 2 (H2.2/3) มี genotype ต่างกันไปถึง 3 รูปแบบ คือ genotype j, f และ k และเชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 3 (H2.2.1/3) มี 2 genotype คือ genotype g และ f ดังตารางที่ 4.7

และนำเอาผลการ alignment ของเชื้อที่ผ่านและไม่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นมาสร้างเป็น phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA version 3 ดังรูปที่ 4.7

4.3.2 ผลการหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer 122-2 และ 122-3 ของเชื้อ isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้น

นำ DNA ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 จากที่ผ่านการผ่านเชื้อครั้งที่ 1 2 และ 3 มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer 122-2 และ 122-3 ตามปฏิกิริยาในการทดลองข้อ 3.6 โดยการผ่านเชื้อครั้งที่ 1 เลือก H2/10 การผ่านเชื้อครั้งที่ 2 เลือก H2.2/3 และการผ่านเชื้อครั้งที่ 3 เลือก H2.2.1/3 เมื่อนำปฏิกิริยา PCR มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังรูปที่ 4.8 พบว่ารูปแบบของ DNA fingerprint ของเชื้อ isolate VPh03 และเชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 2 (H2.2/3) มีความเหมือนกัน ในขณะที่เชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 (H2/10 และ H2.2.1/3) มีรูปแบบของ DNA fingerprint เหมือนกัน และตั้งค่า similarity coefficient ที่คำนวณได้ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.5 ลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง

<p>H2/10 พลาสมิดที่ 1 (H2/10_1) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>
<p>H2/10 พลาสมิดที่ 2 (H2/10_2) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>
<p>H2/10 พลาสมิดที่ 3 (H2/10_3) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

<p>H2.2/3 พลาสมิดที่ 1 (H2.2/3_1) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCCGTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATATAGTTCTGTTATTTCTATTATGTATGTGTGTTAGGGTGC TGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA CACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTATATATATTTATGTATAT ATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTCTCCCTGTTGACCACGGCT CCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGAA CGCAGCAAAGTGCATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGCC CAATCTTT</p>
<p>H2.2/3 พลาสมิดที่ 2 (H2.2/3_2) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCCGTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>
<p>H2.2/3 พลาสมิดที่ 3 (H2.2/3_3) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTCTATATGCCGTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTAAACATAGTTCTGTTATTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

<p>H2.2.1/3 พลาสมิดที่ 1 (H2.2.1/3_1) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>
<p>H2.2.1/3 พลาสมิดที่ 2 (H2.2.1/3_2) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTACATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>
<p>H2.2.1/3 พลาสมิดที่ 3 (H2.2.1/3_3) (511 คู่เบส)</p>	<p>GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGG TGAACCTGCAGCTGGATCATTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCA TATTTATGTGCATGTATAAATTGCACAGTATGCAACCAAAAATATACATAT ATGTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCCGTTGACATGGGAGATGAGG GATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTGTGTTAGAGTGT CTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCTCTACATAATATACAGTAGTAATA ACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTCTATATATATTTATGTATA TATGCTATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGC TCCCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGA ACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTTTCATTGC CCAATCTTT</p>

ตารางที่ 4.6 ผลการ alignment ของ small sununit rRNA gene ด้วยโปรแกรม ClustalW ของเชื้อ

T. evansi isolate VPh03 ที่ไม่ผ่านและผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง

VPh03_1	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPh03_2	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
VPh03_3	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
H2/10_1	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
H2/10_2	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
H2/10_3	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
H2.2/3_1	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
H2.2/3_2	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
H2.2/3_3	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
H2.2.1/3_1	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
H2.2.1/3_2	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60
H2.2.1/3_3	GATATTGCTTCAATAGAGGAAGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAG	60

VPh03_1	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPh03_2	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
VPh03_3	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
H2/10_1	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
H2/10_2	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
H2/10_3	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
H2.2/3_1	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
H2.2/3_2	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
H2.2/3_3	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
H2.2.1/3_1	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
H2.2.1/3_2	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120
H2.2.1/3_3	CTGGATCATTTTCTGATATCCATTATACAAAAAGAGCATATTTATGTGCATGTATAAAT	120

VPh03_1	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
VPh03_2	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
VPh03_3	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
H2/10_1	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
H2/10_2	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
H2/10_3	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
H2.2/3_1	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
H2.2/3_2	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
H2.2/3_3	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
H2.2.1/3_1	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
H2.2.1/3_2	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180
H2.2.1/3_3	TGCACAGTATGCAACCAAAAAATATACATATATGTTTTACATGTATGTGTTTCTATATGCC	180

VPh03_1	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPh03_2	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
VPh03_3	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
H2/10_1	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
H2/10_2	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
H2/10_3	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
H2.2/3_1	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATATATAGTTCTGTTATTTTCTATATGTATGTG	240
H2.2/3_2	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
H2.2/3_3	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTAAACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
H2.2.1/3_1	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
H2.2.1/3_2	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240
H2.2.1/3_3	GTTTGACATGGGAGATGAGGGATGCTATACATAGTTCTGTTATTTTCTATCATGTATGTG	240

VPh03_1	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPh03_2	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
VPh03_3	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
H2/10_1	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
H2/10_2	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
H2/10_3	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
H2.2/3_1	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
H2.2/3_2	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
H2.2/3_3	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
H2.2.1/3_1	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
H2.2.1/3_2	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300
H2.2.1/3_3	TGTTAGAGTGTCTGTGTTAATATACTTTTTAATGCATGCCTACATAATATACAGTAGTA	300

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

VPh03_1	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
VPh03_2	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
VPh03_3	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
H2/10_1	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
H2/10_2	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
H2/10_3	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
H2.2/3_1	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
H2.2/3_2	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
H2.2/3_3	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
H2.2.1/3_1	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
H2.2.1/3_2	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360
H2.2.1/3_3	ATAACACAGAGAATACGTATGGAATGCGTATCTCTACATATATTTATGTATATATGCT	360

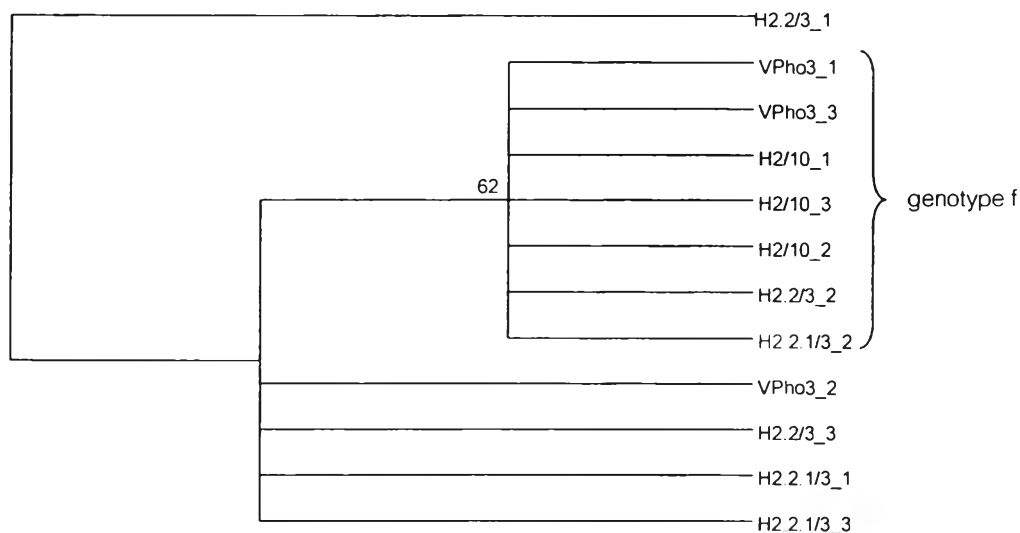
VPh03_1	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
VPh03_2	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
VPh03_3	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
H2/10_1	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
H2/10_2	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
H2/10_3	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
H2.2/3_1	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
H2.2/3_2	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
H2.2/3_3	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
H2.2.1/3_1	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
H2.2.1/3_2	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420
H2.2.1/3_3	ATGTGTATATCAACCTCGCATATTTTCTCCCTGTTGACCACGGCTCCCACAACGTGTGCG	420

VPh03_1	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
VPh03_2	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
VPh03_3	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
H2/10_1	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
H2/10_2	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
H2/10_3	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
H2.2/3_1	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
H2.2/3_2	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
H2.2/3_3	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
H2.2.1/3_1	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
H2.2.1/3_2	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480
H2.2.1/3_3	GATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATC	480

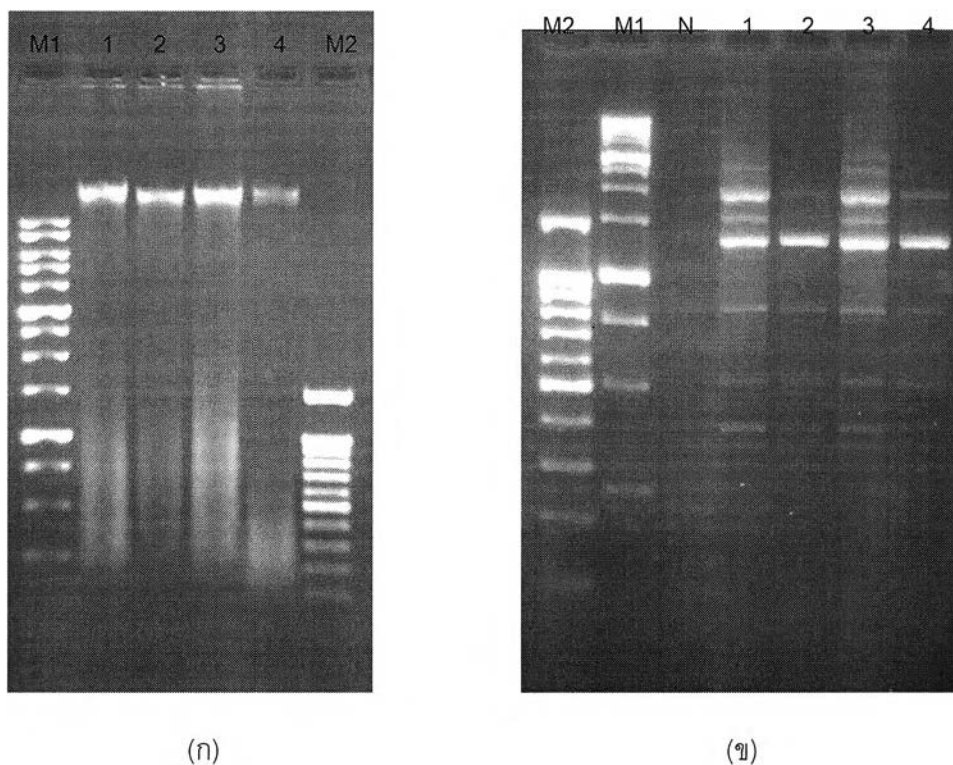
VPh03_1	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPh03_2	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
VPh03_3	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
H2/10_1	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
H2/10_2	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
H2/10_3	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
H2.2/3_1	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
H2.2/3_2	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
H2.2/3_3	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
H2.2.1/3_1	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
H2.2.1/3_2	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511
H2.2.1/3_3	AATTGCAGAATCATTTCATTGCCCAATCTTT	511

ตารางที่ 4.7 รูปแบบ genotype ต่างๆของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง

เชื้อ <i>T. evansi</i>	โคลนนี้ที่	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลง					genotype
		208	210	231	247	339	
		VPh03	1,3	T	C	C	
	2	T	C	C	A	T	g
H2/10 (การผ่านเชื้อครั้งที่ 1)	1,2,3	T	C	C	A	C	f
H2.2/3 (การผ่านเชื้อครั้งที่ 2)	1	T	T	T	G	T	j
	2	T	C	C	A	C	f
	3	A	C	C	A	T	k
H2.2.1/3 (การผ่านเชื้อครั้งที่ 3)	1,3	T	C	C	A	T	g
	2	T	C	C	A	C	f



รูปที่ 4.7 phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง



รูปที่ 4.8 : (ก) การตรวจหา DNA ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ไม่ผ่านและผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis
 (ข) การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ primer 122-2 และ 122-3 ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ไม่ผ่านและผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง

lane M1 : 1 Kb DNA ladder
 lane M2 : 100 bp DNA ladder
 lane N : น้ำกลั่นบริสุทธิ์
 lane 1 : VPh03
 lane 2 : H2/10 (การผ่านเชื้อครั้งที่ 1)
 lane 3 : H2.2/3 (การผ่านเชื้อครั้งที่ 2)
 lane 4 : H2.2.1/3 (การผ่านเชื้อครั้งที่ 3)

ตารางที่ 4.8 ผลการคำนวณค่า similarity coefficient ระหว่างเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ไม่ผ่านและผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง

	ค่า similarity coefficient ระหว่างเชื้อที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น			
	VPh03	H2/10	H2.2/3	H2.2.1/3
VPh03	-	-	-	-
H2/10	0.57	-	-	-
H2.2/3	1	0.57	-	-
H2.2.1/3	0.57	1	0.57	-