บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การลดฤทธิ์ของไวรัส (virus inactivation)

4.1.1 การเปลี่ยนแปลงระดับ Hemagglutination titer ของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา

การลดฤทธิ์ของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 ด้วยสารละลาย 0.01 M และ 0.001 M BEI พบการเพิ่มขึ้นของระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายตัวอย่างเพียงเล็กน้อย และไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับ HA titer ของไวรัส ภายหลังจากการลดฤทธิ์นาน 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง และระดับ HA titer ของไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา เอช5เอ็น1 ภายหลังจากการลดฤทธิ์ของไวรัสด้วย 0.01 M และ 0.001 M BEI

ระดับความเข้มข้น	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	HA titer* (log 2)	pH **
0.01 M BEI	0	8	7.1
	4	8	7.6
	6	8	7.7
	8	8	7.8
	24	8	7.8
0.001 M BEI	0	8	7.1
	4	8	7.2
	6	8	7.4
	8	8	7.5
	24	8	7.6

* ระดับ Hemagglutination titer เมื่อสิ้นสุดแต่ละช่วงเวลา

**ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายตัวอย่างเมื่อสิ้นสุดแต่ละช่วงเวลา

4.1.2 ความสามารถในการติดเชื้อ

ไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 ที่ถูกลดฤทธิ์ด้วย 0.001 M BEI นาน 4, 6 และ 8 ชั่วโมง พบว่าไวรัสยังคงความสามารถในการติดเชื้อในไข่ไก่ฟัก เนื่องจากพบการตายของไข่ไก่ฟัก

และอัลลันโตอิกฟลูอิดที่เก็บจากไข่ฟักที่ตายให้ผลการทดสอบเป็นบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี HA test และ HI test ตามลำดับ แต่ภายหลังจากการลดฤทธิ์ด้วย 0.001 M BEI นาน 24 ชั่วโมง ไวรัสจะถูกลดความสามารถในการติดเชื้อในไข่ไก่ฟัก โดยไม่พบการตายของไข่ฟักและให้ผลการทดสอบเป็นลบต่อการทดสอบด้วยวิธี HA test และ HI test ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

การลดฤทธิ์ด้วย 0.01 M BEI นาน 4 ชั่วโมง พบว่าไวรัสยังคงความสามารถในการติดเชื้อในไข่ฟัก เนื่องจากพบการตายของไข่ฟักและให้ผลการทดสอบเป็นบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี HA test และ HI test ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทำลายฤทธิ์นาน 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ไวรัสจะถูกลดความสามารถในการติดเชื้อในไข่ไก่ฟักโดยสมบูรณ์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของระดับ HA titer และ Infectivity test ของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 จากอัลลันโตอิกฟลูอิดของไข่ไก่ฟัก ภายหลังจากการลดฤทธิ์ของไวรัสด้วย 0.01 M และ 0.001 M BEI

ระดับความเข้มข้น	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	จำนวนไข่ฟัก (จำนวนที่ตาย/ทั้งหมด)[B]	HA titer (log 2)	Infectivity test[D]
0.01 M BEI	0	NT[A]	NT	NT
	4	5/5	8.0	+
	6	0/5	ND[C]	-
	8	0/5	ND	-
	24	0/5	ND	-
0.001 M BEI	0	NT	NT	NT
	4	5/5	5.6	+
	6	5/5	4.4	+
	8	5/5	5.0	+
	24	0/5	ND	-

[A] NT = ไม่ได้ทำการทดสอบ

[B] จำนวนไข่ไก่ฟักที่ตาย/จำนวนไข่ไก่ฟักทั้งหมด

[C] ND = ไม่สามารถตรวจพบได้

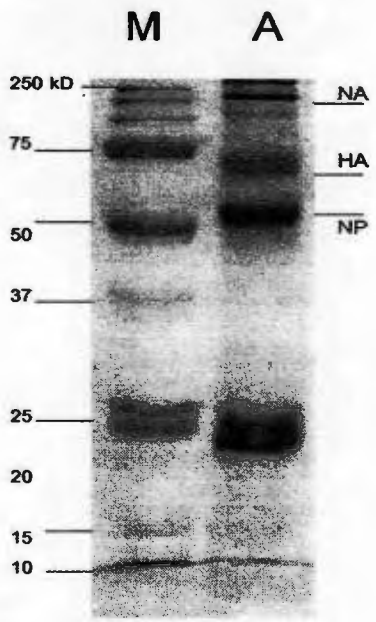
[D] + สามารถตรวจพบไวรัสหรือไวรัสไม่ถูกทำลายฤทธิ์ 100%

-- ไม่สามารถตรวจพบไวรัสหรือไวรัสถูกทำลายฤทธิ์ 100%

4.2 การเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์

การเพิ่มจำนวนไวรัส โดยการฉีดไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 เข้าช่องว่างอัลลันโตอิกของไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน ซึ่งปลอดจากภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดสัตว์ปีก พบว่าจะมีผลต่อปริมาณของไวรัสที่แยกได้ เนื่องจากไวรัสชนิดที่ก่อโรครุนแรงมักทำให้ตัวอ่อนของไก่ตายเร็วกว่าปกติ ส่งผลให้ปริมาณของไวรัสที่เพิ่มจำนวนในไข่ฟักดังกล่าวมีปริมาณน้อยลงด้วย โดยการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์โดยใช้อัลลันโตอิกฟลูอิดจากไข่ไก่ฟัก ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร สามารถเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ได้ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นประมาณ 3 มิลลิกรัมโปรตีนต่อ 1 มิลลิลิตร)

การตรวจสอบองค์ประกอบโปรตีนของไวรัสเข้มข้นที่เตรียมได้ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีแถบของโปรตีนปรากฏให้เห็นดังรูปที่ 3 โดยโปรตีนดังกล่าวมีขนาดเริ่มต้นที่ 10 kDa, 15 kDa, 25 kDa, 50-55 kDa, 60-75 kDa, 80-90 kDa และ 200-220 kDa



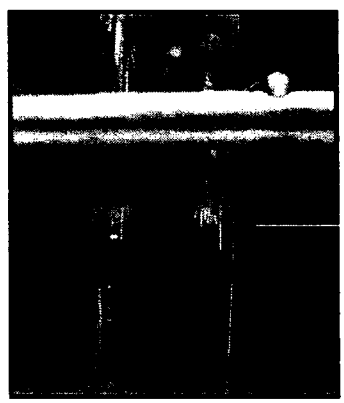
รูปที่ 3 แสดงองค์ประกอบโปรตีนของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยเลน M คือขนาดของโมเลกุลมาตรฐาน (molecular weight marker, kDa) เลน A แสดงแถบโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1

4.3 การเตรียมไวโรโซม

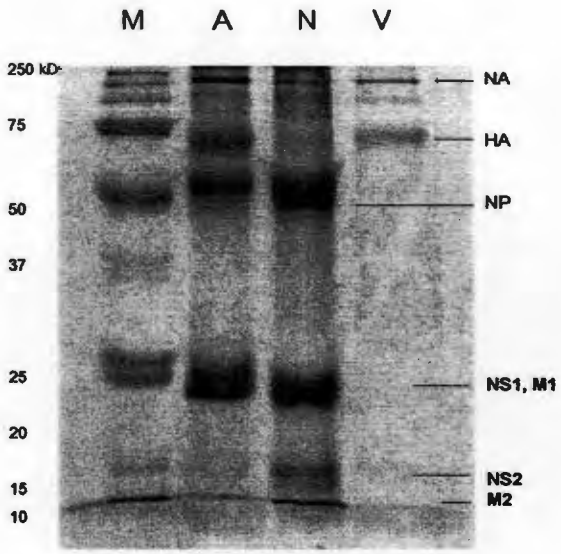
ไกลโคโปรตีนที่ปรากฏบนผิวเปลือกหุ้มไวรัส สามารถแยกออกจากโมเลกุลของไวรัส โดยการใช้สารซักฟอกในการแยกพันธะในโครงสร้างของชั้นไขมันบริเวณเปลือกหุ้มไวรัส octaethyl-eneglycol mono (n-dodecyl) ether ที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถสลายชั้นไขมันเพื่อแยกส่วนของ

นิวคลิโอแคปซิดโปรตีนออกจากโมเลกุลของไวรัส โดยการปั่นแยกส่วนนิวคลิโอแคปซิดโปรตีนออกไป ส่งผลให้สารละลายที่มีไวรัสผสมอยู่มีลักษณะใส

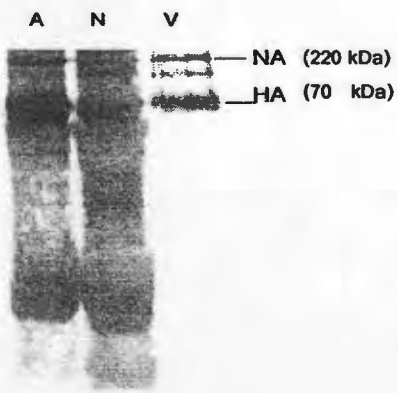
รูปที่ 4 แสดงลักษณะทางกายภาพของสารละลายตัวอย่างก่อนและหลังการทำปฏิกิริยาด้วยสารละลาย $C_{12}E_8$ และดูดซับด้วย BioBead SM2 โดย (A) คือสารละลายตัวอย่างหลังการทำปฏิกิริยาด้วยสารละลาย $C_{12}E_8$ และยังไม่ผ่านการดูดซับด้วย BioBead SM2 (B) คือสารละลายตัวอย่างหลังการดูดซับด้วย BioBead SM2



รูปที่ 5 แสดงแถบของไวโรโซมของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 หลังจากปั่นแยกใน 10-40% discontinuous sucrose gradient ที่ระดับ 130,000xg (Beckman, TLS-55 SW) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

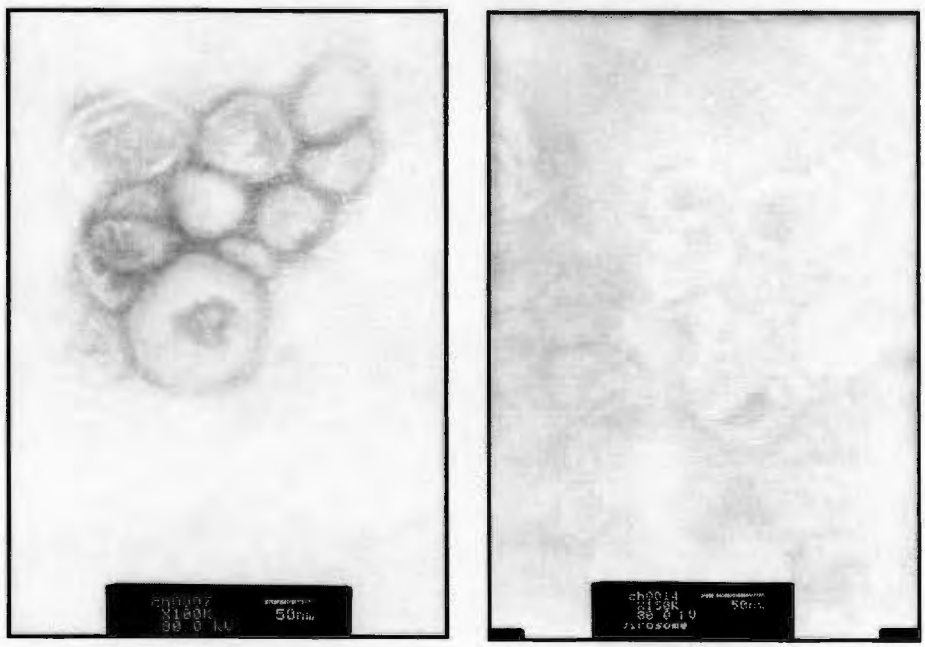


รูปที่ 6 แสดงการวิเคราะห์องค์ประกอบโปรตีนของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 และไวโรโซม ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยเลน M คือขนาดของโมเลกุลมาตรฐาน (molecular weight marker, kDa) เลน A แสดงให้แถบของโปรตีนองค์ประกอบโปรตีนของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 เลน N แสดงแถบของโปรตีนองค์ประกอบของนิวคลิโอแคปซิด และเลน V แสดงแถบของโปรตีนองค์ประกอบของไวโรโซม



รูปที่ 7 แสดงการวิเคราะห์องค์ประกอบโปรตีนของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 และไวโรโซม ด้วยวิธี Western blotting โดยโปรตีนดังจะถูกแยกด้วยวิธี SDS-PAGE และถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) โดยเลน A แสดงให้

แถบของโปรตีนองค์ประกอบโปรตีนของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 เลน N แสดงแถบของโปรตีนองค์ประกอบของนิวคลิโอแคปซิด และเลน V แสดงแถบของโปรตีนองค์ประกอบของไวโรโซม



A B

รูปที่ 8 Negative-staining transmission electron micrograph (TEM) ของไวรัส เอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 (A) และไวโรโซมที่เตรียมจากไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5 เอน 1 (B) กำลังขยาย 80,000 เท่า (x80,000) แสดงให้เห็นลักษณะรูปร่างแบบ spherical vesicles และโครงสร้างของไกลโคโปรตีนบริเวณเปลือกหุ้ม

รูปที่ 9 แสดงการวิเคราะห์ hemagglutination activity ของไวโรโซมซึ่งเตรียมจากไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอชรเอน1 ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเม็ดเลือดแดง (hemagglutination, HA test)