บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เก็บอุจจาระจากสุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบที่แสดงอาการอาเจียนและถ่ายเหลว 55 ตัวอย่าง และ เก็บอุจจาระจากสุนัขปกติ ที่จะมารับการฉีดวัคซีน และ ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน 55 ตัวอย่าง โดยการเก็บอุจจาระจากสุนัขปกติ จะเลือกเก็บให้มี จำนวนเพศ อายุ และพันธุ์ ใกล้เคียงกันกับตัวอย่างอุจจาระของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบ โดยการเก็บตัวอย่างอุจจาระในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจาก คลีนิครักษาสัตว์ และ โรงพยาบาลสัตว์เล็กคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวบรวมข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับสุนัขป่วย เช่น อายุ เพศ พันธุ์ และประวัติการป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบ ซึ่งเก็บรวบรวม ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2542 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2543 เก็บตัวอย่างอุจจาระเหลวจากสุนัขที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบจำนวน 0.2 มิลลิลิตร และอุจจาระแข็งจากสุนัขปกติจำนวน 0.2 กรัม เจือจางอุจจาระเป็นสารแขวนลอย 10% โดยเติม Phosphate Buffered Saline ลงไป 2 มิลลิลิตร (v/v และ w/v ตามลำดับ) ปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ แช่ไว้ที่อุณหภูมิ -70 $^{\circ}$C จนกว่าจะนำมาตรวจหา Canine Parvoviral DNA

Positive control ได้มาจากการใช้ Parvovirus vaccine (Modified Live Virus) ได้แก่ Parvodog (Rhone-Merieux)

Negative control ได้มาจากอุจจาระของสุนัขปกติที่ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) นำส่วนใสหรือวัคซีน 15 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด microtube เติม 0.1 M. NaOH 40 ไมโครลิตร Incubate ที่ 37 $^{\circ}$C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.1 M. HCl 50 ไมโครลิตร เขย่าและปั่นเหวี่ยง

การเลือก Primers โดยการดึงลำดับเบสของ CPV แต่ละชนิดตาม accession number ที่มีอยู่ใน Genbank นำมาเรียงลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X (NCBI) ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 6

```
                                                    3280       3290       3300
U72697  TGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATC
U72696  TGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATC
U72695  TGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATC
U72698  ------------------------------------TAATAATGATTTAACTGCATC
M24003  TGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATC
M24000  TGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATC
M23255  TGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATC
M19296  TGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATC
                                                    **********************

                                                                      3360
U72697  ATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATC
U72696  ATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATC
U72695  ATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATC
U72698  ATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATC
M24003  ATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATC
M24000  ATTAATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATC
M23255  ATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATC
M19296  ATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATC
        *** **********************************************************

                                                                      3420
U72697  TGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTT
U72696  TGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTT
U72695  TGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTT
U72698  TGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTT
M24003  TGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTT
M24000  TGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTT
M23255  TGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTT
M19296  TGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTT
        ************************************************************

                                                                      3480
U72697  TCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACTAGTGGGACACCAACAAATAT
U72696  TCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACTAGTGGGACACCAACAAATAT
U72695  TCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACTAGTGGGACACCAACAAATAT
U72698  TCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACTAGTGGCACACCAACAAATAT
M24003  TCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACTAGTGGCACACCAACAAATAT
M24000  TCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACTAGTGGCACACCAACAAATAT
M23255  TCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACTAGTGGCACACCAACAAATAT
M19296  TCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACTAGTGGCACACCAACAAATAT
        ********************************************** **************

                                                                      3540
U72697  ATACCATGGCACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGT
U72696  ATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGT
U72695  ATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGT
U72698  ATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGT
M24003  ATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGT
M24000  ATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGT
M23255  ATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGT
M19296  ATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGT
        ********* ************************************************
```

```
                                                                    3600
U72697  ACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTTGATTGTAAACC
U72696  ACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTTGATTGTAAACC
U72695  ACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTTGATTGTAAACC
U72698  ACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTTGATTGTAAACC
M24003  ACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTTGATTGTAAACC
M24000  ACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTTGATTGTAAACC
M23255  ACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTTGATTGTAAACC
M19296  ACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTTGATTGTAAACC
        ************************************************************
                                                                    3660
U72697  ATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAA
U72696  ATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAA
U72695  ATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAA
U72698  ATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAA
M24003  ATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAA
M24000  ATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAA
M23255  ATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAA
M19296  ATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAA
        ************************************************************
                         3680       3690       3700                 3720
U72697  TTCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAA
U72696  TTCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAA
U72695  TTCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAA
U72698  TTCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAA
M24003  TTCTTTGCCTCAATCTGAAGGAGGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAA
M24000  TTCTTTGCCTCAATCTGAAGGAGGTACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAA
M23255  TTCTTTGCCTCAATCTGAAGGAGCTACTAACTTTGGTGATATAGGAGTTCAACAAGATAA
M19296  TTCTTTGCCTCAATCTGAAGGAGCTACTAACTTTGGTGATATAGGAGTTCAACAAGATAA
        ************* ********* ************* ***********************
                                                                    3780
U72697  AAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAG
U72696  AAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAG
U72695  AAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAG
U72698  AAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAG
M24003  AAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAG
M24000  AAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAG
M23255  AAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAG
M19296  AAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAG
        ************************************************************
                                                                    3840
U72697  ACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAAGGGCC
U72696  ACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAAGGGCC
U72695  ACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAAGGGCC
U72698  ACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAAGGGCC
M24003  ACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAAGGGCC
M24000  ACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAAGGGCC
M23255  ACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAAGGGCC
M19296  ACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAAGGGCC
        ************************************************************
```

```
                                                                    3900
U72697  ATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGC
U72696  ATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGC
U72695  ATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGC
U72698  ATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGC
M24003  ATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGC
M24000  ATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGC
M23255  ATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGC
M19296  ATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACATATGAAAATCAAGCAGC
        ****************************************** ****************
                                                                    3960
U72697  AGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGG
U72696  AGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGG
U72695  AGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGG
U72698  AGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGG
M24003  AGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGG
M24000  AGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGG
M23255  AGATGGTAATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGG
M19296  AGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGG
        ******* ********************************************************
                                                                    4020
U72697  AGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGG
U72696  AGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGG
U72695  AGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGG
U72698  AGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGG
M24003  AGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGG
M24000  AGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGG
M23255  AGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGG
M19296  AGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGG
        ************************************************************
                                                                    4080
U72697  AGATTGGATTCAAAATATTAACTTTAACCTTCCTGTAACAAATGATAATGTATTGCTACC
U72696  AGATTGGATTCAAAATATTAACTTTAACCTTCCTGTAACAGATGATAATGTATTGCTACC
U72695  AGATTGGATTCAAAATATTAACTTTAACCTTCCTGTAACAAATGATAATGTATTGCTACC
U72698  AGATTGGATTCAAAATATTAACTTTAACCTTCCTGTAACAAATGATAATGTATTGCTACC
M24003  AGATTGGATTCAAAATATTAACTTTAACCTTCCTGTAACAAATGATAATGTATTGCTACC
M24000  AGATTGGATTCAAAATATTAACTTTAACCTTCCTGTAACAAATGATAATGTATTGCTACC
M23255  AGATTGGATTCAAAATATTAACTTTAACCTTCCTGTAACAAATGATAATGTATTGCTACC
M19296  AGATTGGATTCAAAATATTAACTTTAACCTTCCTGTAACGAATGATAATGTATTGCTACC
        ************************************  ********************
                                                                    4140
U72697  AACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTAATACTTATGG
U72696  AACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTAATACTTATGG
U72695  AACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTAATACTTATGG
U72698  AACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTAATACTTATGG
M24003  AACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTAATACTTATGG
M24000  AACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTAATACTTATGG
M23255  AACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTAATACTTATGG
M19296  AACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTAATACTTATGG
        ************************************************************
```

```
                                                                4200
U72697  TCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAA
U72696  TCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAA
U72695  TCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAA
U72698  TCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAA
M24003  TCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAA
M24000  TCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAA
M23255  TCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAA
M19296  TCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAA
        ************************************************************
                                                                4260
U72697  AGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAA
U72696  AGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAA
U72695  AGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAA
U72698  AGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAA
M24003  AGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAA
M24000  AGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAA
M23255  AGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAA
M19296  AGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAA
        ************************************************************
                                                                4320
U72697  TAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTGAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCC
U72696  TAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCC
U72695  TAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCC
U72698  TAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCC
M24003  TAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCC
M24000  TAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCC
M23255  TAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCC
M19296  TAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCC
        ************************* ************************************
                                                                4380
U72697  TGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAA
U72696  TGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAA
U72695  TGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAA
U72698  TGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAA
M24003  TGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAA
M24000  TGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAA
M23255  TGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAA
M19296  TGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAA
        ************************************************************
                                                                4440
U72697  ATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAATCCAATTCAACAAATGAG
U72696  ATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAATCCAATTCAACAAATGAG
U72695  ATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAATCCAATTCAACAAATGAG
U72698  ATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAATCCAATTCAACAAATGAG
M24003  ATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAATCCAATTCAACAAATGAG
M24000  ATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAATCCAATTCAACAAATGAG
M23255  ATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAATCCAATTCAACAAATGAG
M19296  ATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAATCCAATTCAACAAATGAG
        ************************************************************
```

```
                                                                    4500
U72697   TATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGT
U72696   TATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGT
U72695   TATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGT
U72698   TATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGT
M24003   TATTAATATAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGT
M24000   TATTAATATAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGT
M23255   TATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGT
M19296   TATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGT
         ******* ************************************************************

                                                4540       4550       4560
U72697   ATATGAAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATATTAA----------------------
U72696   ATATGAAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATATTAA----------------------
U72695   ATATGAAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATATTAA----------------------
U72698   ATATGAAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATATTAA----------------------
M24003   ATATGAAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATATTAACATACTTACTATG-TTTTTA
M24000   ATATGAAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATATTAACATACTTACTATG-TTTTTA
M23255   ATATGAAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATATTAACATACTTACTATG-TTTTTA
M19296   ATATGAAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATATTAACATACTTACTATGGTTTTTA
         ***************************************
```

U72697: CPV-2a ; U72696: CPV-2b ; U72695: CPV-2a ; U72698: CPV-2a; M24003: CPV-2a(15) ; M24000: CPV-2a(31) ; M23255: CPV-2(d) ; M19296: CPV-2

รูปที่ 6 CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment
แสดงการเปรียบเทียบลำดับ DNA จาก nucleotides 3,280 ถึง 4,540 ตำแหน่งที่สามารถแยก CPV-2 ออกจาก CPV-2a หรือ CPV-2b ได้แก่ 3,685 และ 3,699

ในการเลือก primers จะเลือกบริเวณที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (conserved region) และครอบคลุมตำแหน่ง nucleotides ที่ 3,685 และ 3,699 ในบริเวณ VP2 gene เพื่อสามารถใช้เอนไซม์ในการตัดแยกชนิดของเชื้อ CPV ได้ primers ควรมีความยาวไม่น้อยกว่า 17 เบส และไม่มากกว่า 28 เบส ปริมาณ GC 40-60 เปอร์เซ็นต์ melting temperature (Tm) ของแต่ละ primers ใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายละเอียดของแต่ละ primers

Primer	Sequence 5'---------3'	Tm(^{0}C)	%G-C content
1	CTCCAGCAGCTATGAGATC	58	52.63
2	GATCTGTTGGTAGCAATAC	54	42.11
3	CATCTGGATCTGTACCATGG	60	50.00
4	CTAGGTGCTAGTTGATATG	54	42.11

สำหรับ primers ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่

Primer1 (Forward) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-CTCCAGCAGCTATGAGATC-3' ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 3,342 ถึง 3,360 [31]

Primer2 (Reverse) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-GATCTGTTGGTAGCAATAC-3' คู่สม (complementary) กับตำแหน่งเบสที่ 4,070 ถึง 4,088 [31]

Primer3 (Reverse) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-CATCTGGATCTGTACCATGG-3' คู่สม (complementary) กับตำแหน่งเบสที่ 3,484 ถึง 3,503 [31]

Primer 4 (Reverse) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-CTAGGTGCTAGTTGATATG-3' คู่สม (complementary) กับตำแหน่งเบสที่ 4,570 ถึง 4,588 [31]

การเลือกใช้ restriction enzyme ในการแยก CPV-2 ออกจาก CPV-2a หรือ CPV-2b บริเวณลำดับเบสที่ 3,685 และ 3,699 โดยใช้ Graphic map / Table by enzyme name จาก internet web site Http://www.ccsi.com/firstmarket/cutter สำหรับ restriction enzyme ที่ใช้ในการตัดลำดับเบสที่ 3,686 และ 3,708 ได้แก่ *Rsa* I (5'---GT∇AC---3') และ *Hph* I (5'---GGTGA $(N)_8\nabla$---3') ตามลำดับ

การปรับสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR (Optimization of PCR condition) โดยการปรับพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ความเข้มข้นของ primers (16.5, 25 และ 50 pmole) ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดออกมาจากอุจจาระ (5 และ 10 ไมโครลิตร) ปริมาณผลิตภัณฑ์จาก PCR ช่วงแรก (1, 5 และ 10 ไมโครลิตร) เอนไซม์ Taq DNA Polymerase (0.5, 1 และ 1.5 unit) และ primer annealing temperature (50^{o}C และ 55^{o}C)

การตรวจหาเชื้อ CPV โดยวิธี seminested Polymerase Chain Reaction

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification) บริเวณ VP2

1. 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา PCR ช่วงแรก ประกอบด้วย 10 mMTris-HCl (pH8.3), 50 mMKCl, 1.5 mM$MgCl_2$, 25 pmole ของ primer 1 และ primer 2, 200 uM dNTPs , 0.5 unit ของ Taq DNA polymerase, ดีเอ็นเอที่สกัดจากอุจจาระหรือจากวัคซีน 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น นำหลอด microtubes ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้

1.1 เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 ^{o}C เป็นเวลานาน 5 นาที

1.2 ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation	94 ^{o}C	30	วินาที
Annealing	55 ^{o}C	2	นาที
Extension	72 ^{o}C	2	นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ

1.3 เมื่อครบรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลานาน 10 นาที

2. 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา PCR ช่วงสอง ประกอบด้วย 10 mMTris-HCl (pH8.3), 50 mMKCl, 1.5 mM$MgCl_2$, 25 pmole ของ primer 1 และ primer 3, 200 uM dNTPs , 0.5 unit ของ Taq DNA polymerase, ผลิตภัณฑ์จาก PCR ช่วงแรก 1 ไมโครลิตรและ น้ำกลั่นนำหลอด microtubes ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและ เวลาของแต่ละขั้นตอนและจำนวนรอบเหมือนกับการทำ PCR ช่วงแรก

การตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยา (Product detection)

โดยการใส่ผลผลิตของปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตรลงบน 2% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ที่ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ย้อมสีด้วย ethidium bromide ดูด้วยกล้อง UV light ขนาดของผลผลิต PCR วัดโดยเทียบกับ molecular weight marker 100 bp DNA Ladder (New England, Biolabs)

ผลลัพธ์ลบปลอมจากการทำ seminested PCR ในการศึกษานี้อาจเกิดขึ้นจาก มีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR (inhibitory substances) อยู่ในตัวอย่างอุจจาระ หรือ ไม่สามารถแยกดีเอ็นเอจากตัวอย่างอุจจาระ ภายหลังจากการสกัดแยกดีเอ็นเอด้วยกรด-ด่าง จึงจำเป็นต้องมีการตรวจหาผลลัพธ์ลบปลอมโดย

1. ทดสอบหาสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ในตัวอย่างที่ให้ผลลบจากการทำ seminested PCR โดยการทำ seminested PCR อีกครั้งหลังจากการสกัดแยกดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ให้ผลลบในหลอดหนึ่ง และ อีกหลอดหนึ่งมีตัวอย่างที่ให้ผลลบรวมกับตัวอย่างที่ให้ผลบวก ถ้าในหลอดที่เติมตัวอย่างที่ให้ผลบวกเข้าไปสามารถขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแล้วให้ผลิตภัณฑ์ PCR ในขนาดที่ต้องการ แสดงว่าไม่มีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR แต่ถ้าในหลอดที่เติมตัวอย่างที่ให้ผลบวกเข้าไปไม่สามารถขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ แสดงว่ามีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR อยู่ในตัวอย่างอุจจาระนั้นภายหลังจากการสกัดแยกด้วยวิธีกรด-ด่าง

2. ทดสอบหาปริมาณดีเอ็นเอ ทำได้โดยวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นแสง (λ) 260 นาโนเมตร

การแยกชนิดของเชื้อ CPV โดยวิธี seminested Polymerase Chain Reaction และ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตรวจหาเชื้อ CPV ดังกล่าวข้างต้น ไม่มีตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ครอบคลุมตำแหน่งที่สามารถใช้เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการขยายเพิ่มจำนวนขนาดดีเอ็นเอให้ครอบคลุมพื้นที่ที่สามารถใช้วิธี RFLP ในการแยกชนิดของเชื้อ CPV ได้ โดยนำตัวอย่างและวัคซีนที่ให้ผลบวกทั้งหมดในการทำ seminested PCR มาทำการแยกชนิดของเชื้อ CPV โดย

<u>การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification) บริเวณ VP2</u>

1. 45 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา PCR ช่วงแรก ประกอบด้วย 5 mMTris-HCl (pH8.3), 25 mMKCl, 0.75 mM$MgCl_2$, 16.5 pmole ของ primer 1 และ primer 4, 250 uM dNTPs , 1.5 unit ของ Taq DNA polymerase, ดีเอ็นเอที่สกัดจากอุจจาระ หรือวัคซีน 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น นำหลอด microtubes ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้

1.1 เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลานาน 5 นาที

1.2 ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation	94 °C	30	วินาที
Annealing	50 °C	2	นาที
Extension	72 °C	2	นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ

1.3 เมื่อครบรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลานาน 10 นาที

2. 45 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา PCR ช่วงสอง ประกอบด้วย 5 mMTris-HCl (pH8.3), 25 mMKCl, 0.75 mM$MgCl_2$, 16.5 pmole ของ primer 1 และ primer 2, 250 uM dNTPs , 1.5 unit ของ Taq DNA polymerase, นำผลิตภัณฑ์จาก PCR ช่วงแรก 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น นำหลอด microtubes ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนและจำนวนรอบเหมือนกับการทำ PCR ช่วงแรก

การตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยา (Product detection)

โดยการใส่ผลผลิตของปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตรลงบน 2% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ที่ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ย้อมสีด้วย ethidium bromide ดูด้วยกล้อง UV light ขนาดของผลผลิต PCR วัดโดยเทียบกับ molecular weight marker 100 bp DNA Ladder (New England, Biolabs)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

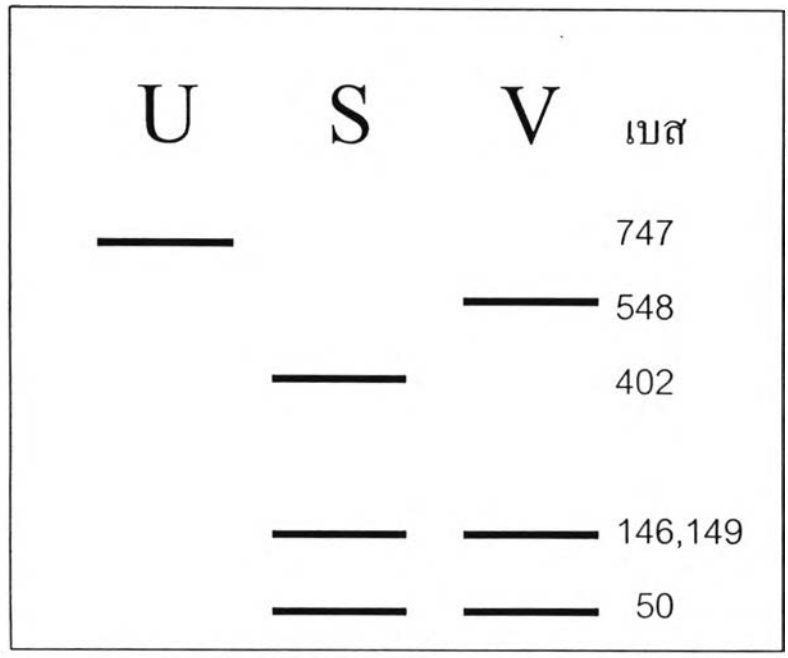
การตัดผลิตภัณฑ์ CPV DNA โดยใช้ Restriction Enzymes

แยก CPV-2 ออกจาก CPV-2a และ CPV-2b โดยใช้ Restriction Enzyme *Rsa* I ซึ่งประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์จาก PCR ช่วงสอง 20 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 1.5 ไมโครลิตร, 10X NEBuffer 1 2.5 ไมโครลิตร และ *Rsa* I (10 units/ul) 1 ไมโครลิตร incubate 37^{0}C นาน 3 ชั่วโมง และ ใช้ Restriction Enyme *Hph* I ซึ่งประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์จาก PCR ช่วงสอง 20 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 0.5 ไมโครลิตร, 10X NEBuffer 4 2.5 ไมโครลิตร และ *Hph* I (5 units/ul) 2 ไมโครลิตร incubate 37^{0}C นาน 3 ชั่วโมง

การตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยา (Product detection)

โดยการใส่ผลผลิตของปฏิกิริยา (restriction fragments) 25 ไมโครลิตรลงบน 2% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ที่ 80 โวลต์ นาน 90 นาที ย้อมสีด้วย ethidium bromide ดูด้วยกล้อง UV light ขนาดของผลผลิต PCR วัดโดยเทียบกับ molecular weight marker 100 bp DNA Ladder (New England, Biolabs)

คาดว่าเอนไซม์ *Rsa* I ตัดผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่าง (CPV-2a หรือ CPV-2b) ขนาด 747 เบส ออกเป็น 149, 50, 146 และ 402 เบส และ ตัดผลิตภัณฑ์ PCR จากวัคซีน (CPV-2) ขนาด 747 เบส ออกเป็น 149, 50 และ 548 เบส ดังแสดงในรูปที่ 7 ส่วนเอนไซม์ *Hph* I ตัดผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่าง (CPV-2a หรือ CPV-2b) ขนาด 747 เบส ออกเป็น 220, 348 และ 179 เบส และ ตัดผลิตภัณฑ์ PCR จากวัคซีน (CPV-2) ขนาด 747 เบส ออกเป็น 220, 147 และ 380 เบส ดังแสดงในรูปที่ 8

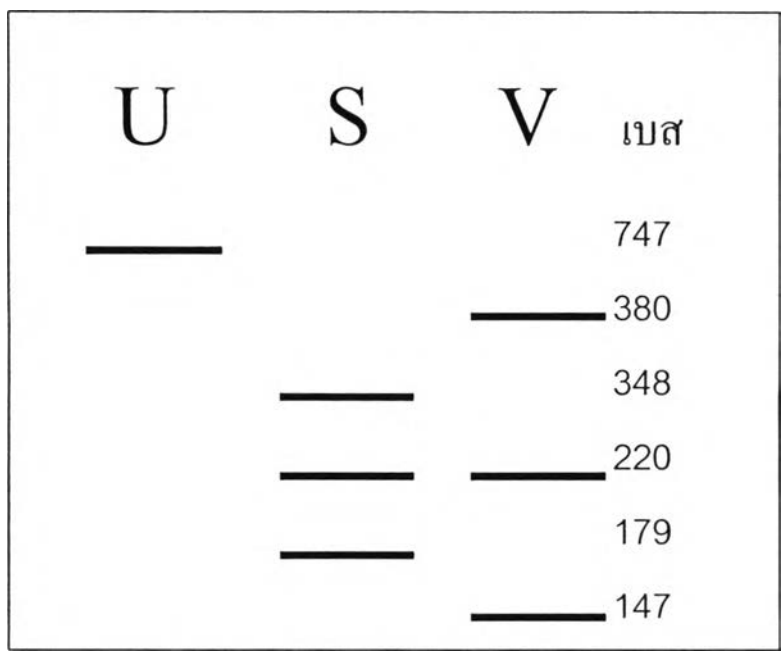


รูปที่ 7 รูปแบบ RFLP ของ CPV Products ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Rsa* I

U = ผลิตภัณฑ์ PCR รอบสองก่อนตัดด้วยเอนไซม์

S = ผลิตภัณฑ์จากตัวอย่าง PCR รอบสองหลังตัดด้วยเอนไซม์

V = ผลิตภัณฑ์จากวัคซีน PCR รอบสองหลังตัดด้วยเอนไซม์



รูปที่ 8 รูปแบบ RFLP ของ CPV Products ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hph* I

U = ผลิตภัณฑ์ PCR รอบสองก่อนตัดด้วยเอนไซม์

S = ผลิตภัณฑ์จากตัวอย่าง PCR รอบสองหลังตัดด้วยเอนไซม์

V = ผลิตภัณฑ์จากวัคซีน PCR รอบสองหลังตัดด้วยเอนไซม์

นำข้อมูลที่ผ่านการตรวจสอบแล้ว นำมาวิเคราะห์ในรูปของสถิติการวิจัยเพื่อประเมินความชุก ของโรค (prevalence) หรืออัตราการตรวจพบและชนิดของเชื้อ CPV ที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ ในสุนัข และนำเสนอเป็นตารางเทียบเปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ