รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

การทำบริสุทธิ์แอนติเจนไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จาก allantoic fluid

Purified antigen of Avian Infectious bronchitis virus from allantoic fluid

โดย

นางสาวสุจิตรา รักกุศล

สาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

รหัสนักศึกษา 5940213115

รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

การทำบริสุทธิ์แอนติเจนไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จาก allantoic fluid

Purified antigen of Avian Infectious bronchitis virus from allantoic fluid

นางสาวสุจิตรา รักกุศล

โครงงานสหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
พ.ศ. 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการสหกิจฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตามจุดมุ่งหมาย และวัตถุประสงค์ เนื่องจากได้รับความกรุณาเป็นอย่างสูงจากนายสัตวแพทย์จาตุรนต์ พลราช ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ นายสัตวแพทย์ไชยา สง่าประโคน หัวหน้ากลุ่มวิจัยและพัฒนา นายสัตวแพทย์นพคุณ มูลสิน นายสัตวแพทย์ชำนาญการ ฝ่ายทดสอบคุณภาพวัคซีนสัตว์ปีก ที่ปรึกษาโครงการสหกิจศึกษา นางสาวอารีรัตน์ แพงเพ็ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ และเจ้าหน้าที่ทางสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ทุกท่านที่ช่วยเหลืออนุเคราะห์สารเคมี เครื่องมือ อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ วัคซีนสัตว์ปีก Anti-serum ต่อวัคซีนสัตว์ปีก ตลอดจนให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งกำชับดูแลการปฏิบัติงานตามวัตถุประสงค์ของโครงการสหกิจศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณสพ.ญ.พิมพ์ชนก โล่ห์ทองคำ สพ.ญ.ดร.แคทรียา สุขวรรณ ผศ.ดร.Xin Huo อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการสหกิจศึกษา และอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยราภัฏนครราชสีมาทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ และช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนตรวจแก้รูปเล่มรายงานให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สุจิตรา รักกุสล

2 มีนาคม 2563

หัวข้อโครงการ การทำบริสุทธิ์แอนติเจนไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จาก allantoic fluid
Purified antigen of Avian Infectious bronchitis virus from allantoic fluid
ผู้จัดทำ นางสาวสุจิตรา รักกุศล รหัสนักศึกษา 5940213115
สาขาวิชา เทคนิคการสัตวแพทย์
คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
อาจารย์นิเทศ สพ.ญ.พิมพ์ชนก โล่ห์ทองคำ
สพ.ญ.ดร.แคทรียา สุขวรรณ
ผศ.ดร.Xin Huo
พนักงานที่ปรึกษา นางสาวอารีรัตน์ แพงเพ็ง

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและทำบริสุทธิ์ไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จาก allantoic fluid และทดสอบคุณสมบัติทาง Immunology เบื้องต้น การแยกไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการปั่นแยกไวรัสที่ได้จากไข่ไก่ฟักอายุ 9-10 วัน โดยใช้เครื่อง Ultracentrifuge (Beckman Coulter XL-A) ผ่าน 20% sucrose gradient ปั่นเหวี่ยงที่ 98,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอนด้วย TNE buffer นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นผ่าน 30-50% sucrose gradient ปั่นเหวี่ยงที่ 98,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที จะพบแถบวงแหวนสีขาวที่ชั้น 30% sucrose เมื่อนำวงแหวนไปวิเคราะห์ขนาดโปรตีนของไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 10% polyacrylamide gel พบว่าแถบวงแหวนสีขาวเป็นไวรัสบริสุทธิ์ประกอบด้วยโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 50 kDa จากผลการทดสอบด้วยวิธี western blot ชี้ให้เห็นว่าแอนติไวรัส IBV ที่แยกให้บริสุทธิ์นั้นสามารถทำปฏิกิริยากับซีรั่มไก่ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ได้ดี ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีการแยกและบริสุทธิ์ผ่าน sucrose gradient สำหรับเตรียมแอนติเจนเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ส่งผลให้เกิดการวางแผนควบคุมป้องกันโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ ไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่, Sucrose gradient, SDS-PAGE, Western blot

สารบัญ

เรื่อง			หน้า
กิตติกรรมประกาศ			ก
บทคัดย่อ			ข
สารบัญ			ค
สารบัญตาราง			ง
สารบัญรูปภาพ			จ
บทที่ 1 บทนำ			1
	1.1	ที่มาและความสำคัญ	1
	1.2	วัตถุประสงค์	2
	1.3	ขอบเขต	2
	1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
	1.5	แผนการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง			4
	2.1	โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่	4
		2.1.1 สาเหตุของโรค	4
		2.1.2 ระยะฟักตัวของโรค	5
		2.1.3 อาการของโรคและรอยโรค	5
	2.2	การหมุนเหวี่ยงแบบเดนซิตีเกรเดียนต์ (Density gradient centrifugation)	6
	2.3	Electrophoresis	9
	2.4	Western blot	13

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินงาน	19
3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้	19
3.1.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือ	19
3.1.2 สารเคมี และสารมาตรฐาน	20
3.1.3 เชื้อที่ใช้ทดสอบ	21
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงาน	22
3.2.1 ไวรัส Infectious bronchitis virus (IBV)	22
3.2.2 กระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย	22
3.2.3 การแยกและทำไวรัสให้บริสุทธิ์	22
3.2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติของไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE	25
3.2.5 การตรวจสอบยืนยันความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot	25
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน	28
4.1 การแยกและทำบริสุทธิ์ไวรัสด้วยวิธี Continuous sucrose gradient	28
4.2 การตรวจสอบคุณสมบัติของไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE	29
4.3 การยืนยันความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot	30
บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	31
บรรณานุกรม	32
ภาคผนวก	34
ภาคผนวก ก	35
ภาคผนวก ข	41

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงส่วนผสมของชั้น Resolving gel	35
ตารางที่ 2	แสดงส่วนผสมของชั้น 4% Stacking gel	36

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างและส่วนประกอบของไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่	6
ภาพที่ 2	Rate zonal centrifugation	8
ภาพที่ 3	Isopycnic centrifugation	8
ภาพที่ 4	โครงสร้างของ acrylamide, TEMED และ N,N'-methylene bis acrylamide	24
ภาพที่ 5	การเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ของซัลเฟต ($SO_4^{-}\bullet$) จากแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_8$)	10
ภาพที่ 6	การเกิดปฏิกิริยา polymerization ของ acrylamide	10
ภาพที่ 7	การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE	11
ภาพที่ 8	การเข้าจับของ SDS กับโปรตีน	13
ภาพที่ 9	แสดงขั้นตอน Western blot	16
ภาพที่ 10	แสดงขั้นตอนการทำ Western blot	24
ภาพที่ 11	แสดงวงแหวนสีขาวหลังจากปั่นแยกผ่าน 30-50% continuous sucrose gradient	25
ภาพที่ 12	แสดงขนาดโปรตีนที่แยกใน 10% gel SDS-PAGE หลังจากปั่นแยก	26
ภาพที่ 13	ผลของปฏิกิริยา Western Blot ระหว่างซีรั่มไก่กับไวรัสที่แยกได้	27

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (Infectious bronchitis virus ; IBV) จัดเป็น gammacoronavirus ใน *Nidovirales* order, *Coronaviridae* family และ species *Avian coronavirus*. อนุภาคไวรัสมีลักษณะรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 120 nm และมีเปลือกหุ้มด้านนอก (envelope) ที่ประกอบด้วยโปรตีนคลุมด้วยกลุ่มคาร์โบไฮเดรทเป็นปุ่ม (spikes) ยื่นออกนอกผิวอนุภาค ทำให้เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะเห็นเป็นเหมือนมงกุฎ (ภาษาลาติน Corona แปลว่า crown หรือมงกุฎ) ล้อมรอบซึ่งเป็นที่มาของชื่อเชื้อด้วย ภายในอนุภาคไวรัสประกอบด้วยยีโนมอาร์เอ็นเอ สายเดี่ยว สายบวก (ss (+) RNA) ที่มีขนาดประมาณ 28 kb ที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญได้แก่ nucleocapsid protein (N), membrane glycoprotein (M), envelope (E) และ spike glycoprotein (S) โดยส่วน spike ประกอบด้วย 2 ส่วนย่อย คือ S1 และ S2 ซึ่งส่วนของ S1 เป็นโปรตีนที่มีการศึกษามากที่สุดเนื่องจากเป็นโปรตีนที่ช่วยยึดจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ของ host เพื่อเริ่มต้นวงจรการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ และยังเป็นแอนติเจนสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง neutralizing antibodies ของร่างกายได้ และการที่เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อมีสายพันธุกรรมเป็น RNA จึงมีโอกาสสูงที่จะทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงรหัสทางพันธุกรรมได้ง่าย ด้วยเหตุนี้ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจึงมีหลายซีโรไทป์ โดยแต่ละซีโรไทป์จะไม่ให้ความคุ้มกันโรคข้ามกัน การตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ และสามารถปฏิบัติงานได้สะดวกในห้องปฏิบัติการเป็นสิ่งจำเป็นที่ช่วยให้ทราบถึงการสภาวะการณ์ของโรค การเฝ้าระวัง และติดตามการเกิดโรค รวมถึงการคัดเลือกสายพันธุ์ของวัคซีนให้เหมาะสมกับการควบคุมโรคได้อย่างทันท่วงที

การตรวจวินิจฉัยเชื้อทั้งทางตรง เช่น การเพาะแยกเชื้อในไข่ไก่ฟัก ตรวจยืนยันผลด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล หรือวิธี viral neutralization test และการตรวจวินิจฉัยทางอ้อมด้วยการตรวจยืนยันโดยอาศัยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา เช่น วิธี ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ซึ่งการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยดังที่กล่าวมาข้างต้นมักมีจุดเริ่มต้นมาจากขั้นตอนการเตรียม และแยกแอนติเจนให้บริสุทธิ์ และนำแอนติเจนไปใช้เพื่อเป็นสารทดสอบเพื่อผลิตซีรั่มมาตรฐานหรือพัฒนาชุด

ทดสอบที่เกี่ยวข้องต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการเตรียมและทำบริสุทธิ์แอนติเจนของไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จากน้ำ allantoic fluid และทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอติเจนขั้นต้น

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อแยกและทำบริสุทธิ์ไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่จาก allantoic fluid และทดสอบคุณสมบัติทาง Immunology เบื้องต้น

1.3 ขอบเขต

1.3.1 การเพิ่มปริมาณไวรัส Infectious bronchitis virus (IBV) ในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อ

1.3.2 การแยกและทำบริสุทธิ์ไวรัสด้วยวิธี Continuous sucrose gradient

1.3.3 การตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และยืนยันความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถแยกไวรัสและทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Continuous sucrose gradient จาก allantoic fluid เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับเตรียมผลิตซีรั่มมาตรฐานหรือพัฒนาชุดทดสอบที่เกี่ยวข้องต่อไป

1.5 แผนการดำเนินงาน

งานที่ได้รับมอบหมาย	เดือนที่ 1				เดือนที่ 2				เดือนที่ 3				เดือนที่ 4			
	ส 1	ส 2	ส 3	ส 4	ส 1	ส 2	ส 3	ส 4	ส 1	ส 2	ส 3	ส 4	ส 1	ส 2	ส 3	ส 4
เตรียมวัสดุอุปกรณ์, สารเคมีที่ใช้และเครื่องมือวิทยาศาสตร์	◄	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
เพิ่มปริมาณไวรัส IBV ในไข่ไก่ฟัก			◄	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
แยกและทำบริสุทธิ์ไข่ไก่ฟักด้วยวิธี Continuous sucrose gradient			◄	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และยืนยันความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot			◄	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
วิเคราะห์ผลการทดลอง สรุปผลและเขียนรายงาน														◄	—	►

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เป็นโรคติดต่อแบบเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนต้นและทางเดินปัสสาวะของไก่ มีสาเหตุเกิดจากเชื้อ Infectious bronchitis virus (IBV) สัตว์ปีกพวกไก่เท่านั้นที่ติดเชื้อไวรัสนี้ตามธรรมชาติ พบโรคนี้ได้ทั่วโลก ในฝูงไก่ที่ติดเชื้อไวรัส เชื้อจะแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว อัตราป่วยอาจสูงถึง 100% แต่มีอัตราการตายต่ำ อย่างไรก็ตามอัตราการตายอาจเพิ่มขึ้น ในกรณีที่ติดเชื้อ IBV สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดไตอักเสบ (nephropathogenic type) หรือในรายที่มีการติดเชื้อจุลชีพอื่นๆร่วมกับเชื้อ IBV เช่น เชื้อ NDV, *Mycoplasma spp*., Coliform bacteria อาจทำให้การวินิจฉัยโรคสับสนได้

2.1.1 สาเหตุของโรค

เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (Infectious bronchitis virus; IBV) จัดเป็น gammacoronavirus ใน *Nidovirales* order, *Coronaviridae* family และ species *Avian coronavirus*. อนุภาคไวรัสมีลักษณะรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 120 nm และมีเปลือกหุ้มด้านนอก (envelope) ที่ประกอบด้วยโปรตีนคลุมด้วยกลุ่มคาร์โบไฮเดรทเป็นปุ่ม (spikes) ยื่นออกนอกผิวอนุภาค ทำให้เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะเห็นเป็นเหมือนมงกุฎ (ภาษาลาติน Corona แปลว่า crown หรือมงกุฎ) ล้อมรอบซึ่งเป็นที่มาของชื่อเชื้อด้วย ภายในอนุภาคไวรัสประกอบด้วยยีโนมอาร์เอ็นเอ สายเดี่ยว สายบวก (ss (+) RNA) ทีมีขนาดประมาณ 28 kb ที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญได้แก่ nucleocapsid protein (N), membrane glycoprotein (M), envelope (E) และ spike glycoprotein (S) โดยส่วน spike ประกอบด้วย 2 ส่วนย่อย คือ S1 และ S2 ซึ่งส่วนของ S1 เป็นโปรตีนที่มีการศึกษามากที่สุดเนื่องจากเป็นโปรตีนที่ช่วยยึดจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ของ host เพื่อเริ่มต้นวงจรการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ และยังเป็นแอนติเจนสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง neutralizing antibodies ของร่างกายได้ และการที่เชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อมีสายพันธุกรรมเป็น RNA จึงมีโอกาสสูงที่จะทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงรหัสทางพันธุกรรมได้ง่าย ด้วยเหตุนี้ไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อจึงมีหลายซีโรไทป์ โดยแต่ละซีโรไทป์จะไม่ให้ความคุ้มกันโรคข้ามกัน

2.1.2 ระยะฟักตัวของโรค

โรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่มีระยะฟักตัว 18-36 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณของไวรัส และตำแหน่งของการติดเชื้อในไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อที่เตรียมขึ้นจากไข่ไก่ฟักสามารถพบอาการหายใจ (tracheal rale) ภายใน 24 ชั่วโมง และไก่ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติพบอาการได้ภายใน 36 ชั่วโมงหรือนานกว่านั้น

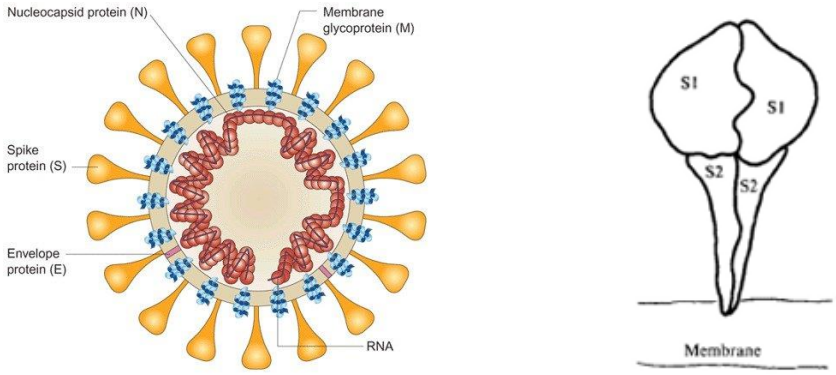
2.1.3 อาการของโรคและรอยโรค

ไก่ที่ป่วยจะแสดงอาการซึม อ้าปากหายใจ ไอ จาม มีน้ำมูก หายใจมีเสียงครืดคราดในหลอดลม (tracheal rale) ส่งผลให้การเพิ่มน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่ดี อัตราการตายมักสูงสุดในช่วง 2 สัปดาห์สุดท้ายของการเลี้ยงก่อนส่งโรงฆ่าคือช่วงอายุประมาณ 5-6 สัปดาห์ และตายเนื่องจากมีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ไก่ไข่ที่ติดเชื้อนอกจากจะแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจแล้วอัตราการไข่ยังลดลงอีกด้วยโดยอาจลดลงถึง 30% หรือมากกว่านี้ รวมทั้งมีผลทาให้เปลือกไข่ผิดรูป สีซีด และไข่ขาวมักเหลวเป็นน้ำ (Cavanagh and Naqi, 2003) เนื่องจากเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคนี้มีหลายสายพันธุ์และบางสายพันธุ์ทำให้เกิดรอยโรคที่ไต (nephropathogenic strain) ซึ่งทาให้ไก่ที่ติดเชื้อแสดงอาการซึม และถ่ายเหลวเป็นน้ำมียูเรตมากขึ้น (Dhinakar Raj and Jones, 1997) อัตราการตายมักสูงกว่าสายพันธุ์ที่ก่อโรคเฉพาะในระบบทางเดินหายใจ สำหรับความเสียหายที่ไตจะพบไตอักเสบ บวม และมีการคั่งยูเรตในท่อไต ซึ่งการเกิดโรคในลักษณะนี้พบได้ทั้งในไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พ่อแม่พันธุ์ (Ziegler et al., 2002) แต่ไก่อายุน้อยมีอาการป่วยรุนแรงและอัตราการตายสูงกว่าไก่อายุมาก (Animas et al., 1994)

ไก่ที่ติดเชื้ออาจพบของเหลวใส (serous) หรือขุ่นเป็นเมือก (catarrhal) และเป็นหนองข้น (caseous) ในท่อลม ช่องจมูก และไซนัส ในระยะติดเชื้อเฉียบพลันถุงลมจะมีลักษณะเป็นฟองคล้ายโฟม จากนั้นจะกลายเป็นของเหลวขุ่นและเป็นหนองข้นเหลือง พบปอดและท่อลมอักเสบ และพบรอยโรคของไต เช่น ไตอักเสบ บวม สีซีด และพบสารยูเรตสีขาวภายในท่อไต (tubules) และท่อปัสสาวะ (ureters) ในไก่ไข่อาจพบไข่แดงแตกภายในช่องท้อง และถุงน้ำในรังไข่

ในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคหลอดลมอักเสบติดต่อครั้งแรกในไก่ในระหว่างปี พ.ศ. 2496-2497 (Chindavanig, 1962) ต่อมาพบการระบาดของโรคในภูมิภาคต่างๆ ที่เกิดจากเชื้อ AvCoVs หลายสายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์ Massachusetts (M41) และ Massachusetts-derived

variants สายพันธุ์ nephropathogenic และ สายพันธุ์ QX ทั้งในภาคใต้และภาคกลางของประเทศ (Antarasena et al.,2008; Pohuang et al., 2009; Pohuang et al., 2011; Promkuntod et al., 2015)



ภาพที่ 1 โครงสร้างและส่วนประกอบของไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่

ที่มา Ahmed S. Abdel-Moneim, D. Cavanagh, 1983

2.2 การหมุนเหวี่ยงแบบเดนซิตีเกรเดียนต์ (Density gradient centrifugation)

เป็นการแยกอนุภาคของสารออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราเร็วในการนอนก้น หรือแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่น โดยใช้ตัวกลางที่เหมาะสมและมีความหนาแน่น ต่าง ๆ กัน จึงนิยมใช้สำหรับการแยกสารหลายชนิดออกจากกันโดยมีความบริสุทธิ์สูง สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น 2 วิธีตามหลักการแยกคือ

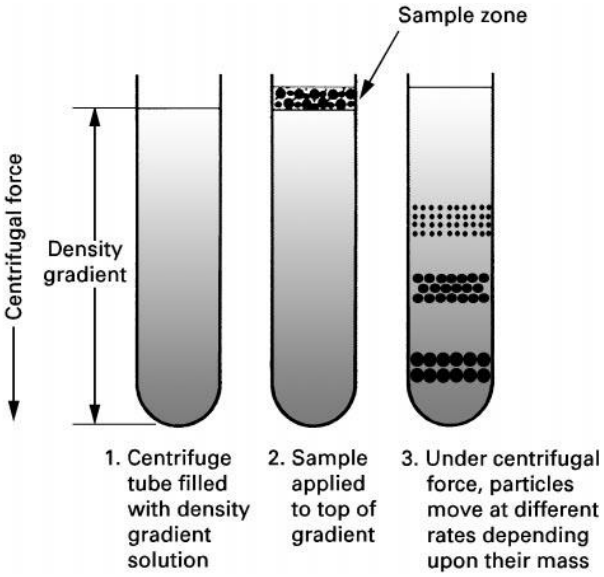
1. การแยกโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราเร็วในการนอนก้น

ในกรณีที่อนุภาค หรือสารประกอบที่ต้องการแยกมีอัตราเร็วในการนอนก้นแตกต่างกันมาก ตัวอย่างเช่น endoplasmic reticulum, mitochondria, nuclei, lysosome, เม็ดเลือดแดง ฯลฯ สามารถแยกออกจากกันโดยใช้ ตัวกลางชนิดเดียวกันแต่มีความหนาแน่นต่างกันใส่ลงในหลอดปั่น โดยให้ตัวกลางที่มีความหนาแน่นมากกว่าอยู่ในชั้นล่างกว่า แล้วจึงใส่สารละลายซึ่งประกอบไปด้วยอนุภาคที่มีอัตรานอนก้นต่างกันลงที่ด้านบนของหลอดหมุนเหวี่ยง หลังจากนำไปหมุนเหวี่ยง อนุภาคที่มีอัตราเร็วในการนอนก้นเท่ากันจะเคลื่อนที่ลงไปในหลอดหมุนเหวี่ยงเรื่อย ๆ เป็นแถบของอนุภาค ส่วนอนุภาคที่มีอัตรานอนก้นช้ากว่าจะอยู่ด้านหลัง ถ้าปล่อยให้หมุนเหวี่ยงเป็นเวลานานแถบอนุภาคทุกแถบจะเคลื่อนที่ถึงก้นหลอดปั่นทั้งหมด แต่การปั่นแยกวิธีนี้จะต้องใช้เวลาปั่นแยกที่เหมาะสมจึงจะ

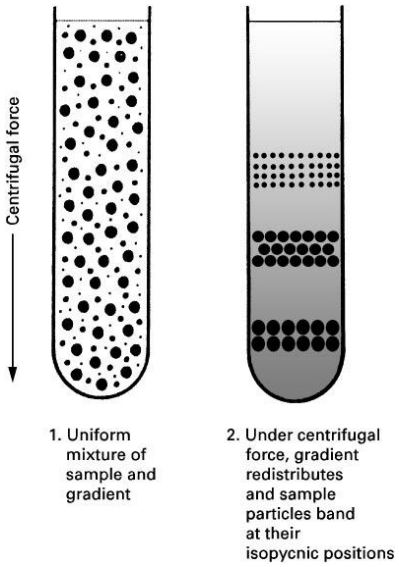
สามารถทำให้อนุภาคชนิดต่าง ๆ แยกเป็นชั้นโดยที่ยังไม่มีอนุภาคเคลื่อนที่ถึงก้นหลอดปั่น หลังจากหยุดหมุนจะได้ชั้นของอนุภาคต่าง ๆ แยกกันอย่างชัดเจน ซึ่งสามารถแยกอนุภาคที่บริสุทธิ์แต่ละชั้นได้โดยการดูดออกจากด้านบน หรือเจาะออกทางก้นหลอดปั่น เรียกการหมุนเหวี่ยงชนิดนี้ว่า rate zonal centrifugation สำหรับตัวกลางที่นิยมใช้ได้แก่สารละลายซูโครสความเข้มข้น 20-50 % ตัวกลางที่เข้มข้นนี้จะทำให้สารละลายที่มีอนุภาคอยู่ไม่ไหลผสมกับชั้นของตัวกลางมากเกินไป ซึ่งทำให้สามารถแยกชั้นอนุภาคได้ชัดเจนมากยิ่ง ส่วนความแตกต่างของความเข้มข้นของสารละลายซูโครสในแต่ละชั้นจะทำให้การเคลื่อนที่ของอนุภาคในแต่ละชั้นความเข้มข้นช้าลง โดยการเคลื่อนที่ของอนุภาคยิ่งช้าลงในสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้นมากขึ้น ซึ่งเป็นผลให้มีเวลานานขึ้นในการแยกอนุภาคขนาดใหญ่และขนาดเล็กออกจากกันได้มากกว่าการใช้ตัวกลางที่มีความเข้มข้นเดียว

2. การแยกโดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นของอนุภาค

ในกรณีที่อนุภาคหรือสารประกอบที่ต้องการแยกมีอัตราเร็วในการนอนก้นใกล้เคียงกันมาก ตัวอย่างเช่น glycogen, microsomes, ribosomes เป็นต้น การแยกสารเหล่านี้ออกจากกันต้องอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นลอยตัว (buoyant density) โดยใช้ตัวกลางที่มีช่วงความหนาแน่นครอบคลุมสารที่ต้องการแยก หลังจากที่ใส่สารที่ต้องการปั่นแยกลงในหลอดปั่นโดยอาจใส่เป็นชั้นอยู่ด้านบน หรือผสมลงในตัวกลางให้เป็นเนื้อเดียวกัน ในขณะที่หลอดปั่นหมุนอนุภาคต่าง ๆ จะมีการเคลื่อนที่หรือลอยตัวไปหยุดอยู่ในชั้นของตัวกลางที่มีความหนาแน่นเท่ากับความหนาแน่นของอนุภาคนั้น ๆ ทำให้สามารถแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันได้ดี จึงเรียกวิธีการแยกแบบนี้ว่า isopycnic centrifugation สำหรับตัวกลางที่นิยมใช้ได้แก่ CsCl ความหนาแน่นต่าง ๆ ซึ่งอาจเตรียมก่อนใส่สารตัวอย่างได้เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายซูโครส หรือปล่อยให้สารละลาย CsCl แยกเป็นชั้นความหนาแน่นต่าง ๆ เองในขณะปั่นแยก (self generating gradient) ตัวอย่างเช่น สารละลาย CsCl ที่มีความหนาแน่น 1.60 ก./มล. เมื่อนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที สารละลายจะแยกออกเป็นชั้นที่มีความหนาแน่นตั้งแต่ 1.40-1.85 ก./มล. การปล่อยให้ CsCl สร้างชั้นความแตกต่างของความหนาแน่นเองต้องใช้เวลาในการหมุนเหวี่ยงนานตั้งแต่ 4-48 ชั่วโมง เพราะ CsCl มีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 168.4



ภาพที่ 2 Rate zonal centrifugation ที่มา Beckman Instruments

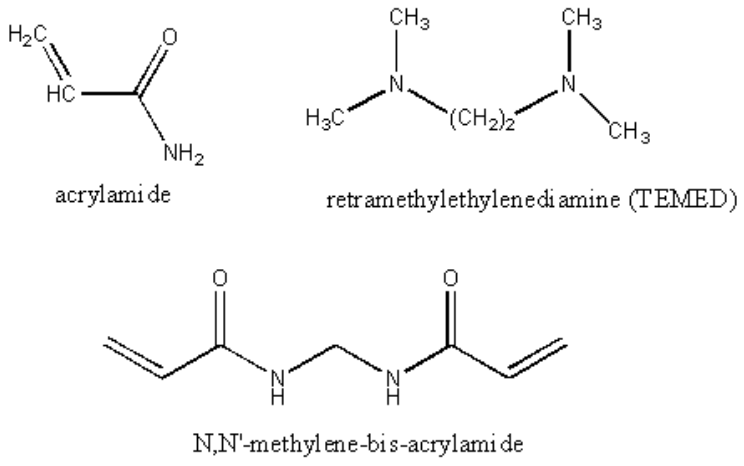


ภาพที่ 3 Isopycnic centrifugation ที่มา Beckman Instruments

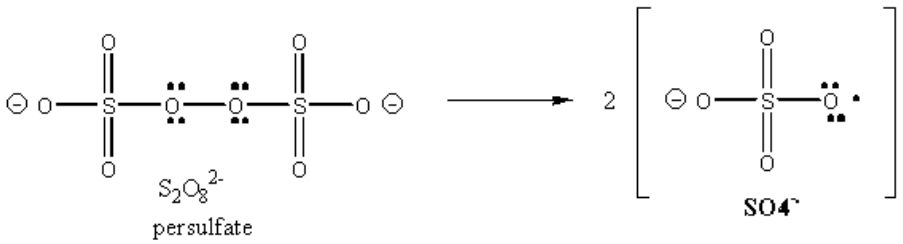
2.3 Electrophoresis

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสาร วิเคราะห์ และเตรียมสารที่มีประจุไฟฟ้าให้บริสุทธิ์ เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก โดยสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วตรงกันข้ามด้วยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ต่างกัน ซึ่งอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร รูปร่างและขนาดของโมเลกุลของสารนั้น และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ในการแยกสารชีวโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสส่วนใหญ่ทำโดยใช้เจลเป็นตัวกลาง เจลที่ใช้เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ตัวอย่างเช่น อะกาโรส และพอลิอะคริลาไมด์ เป็นต้น

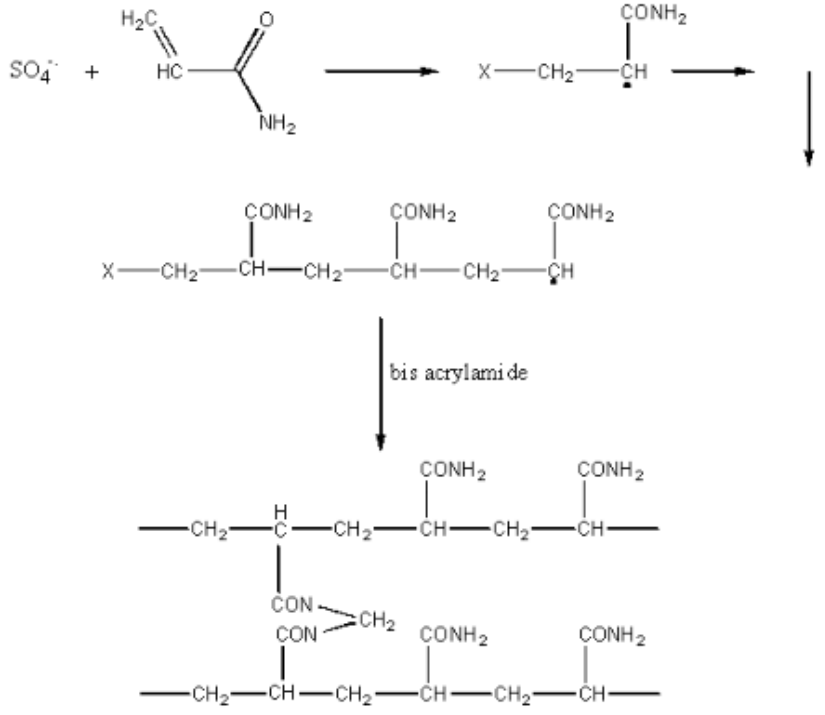
ในการแยกโปรตีนนิยมใช้ polyacrylamide gel โดยเตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) แบบสายตรงของ acrylamide และแบบระหว่างสาย (cross-link) โดยใช้ methylenebisacrylamide ซึ่งเจลที่ได้จากเจลพอลิเมอไรเซชันจะเป็นแผ่นบาง ๆ และมีรูพรุน ขนาดของรูพรุนจะขึ้นกับความเข้มข้นของ acrylamide และ methylene bis acrylamide ที่ใช้ การเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันทำได้โดยการเติมตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้คือ N,N,N´,N´-tetramethylethylenediamine (TEMED) ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ของซัลเฟต (SO_4^{-}) จากแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_8$) ที่เติมลงในสารละลายเจล



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ acrylamide, TEMED และ N,N'-methylene bis acrylamide
ที่มา https://employees.csbsju.edu



ภาพที่ 5 การเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ของซัลเฟต (SO_4^{-}•) จากแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_8$) ที่มา https://employees.csbsju.edu

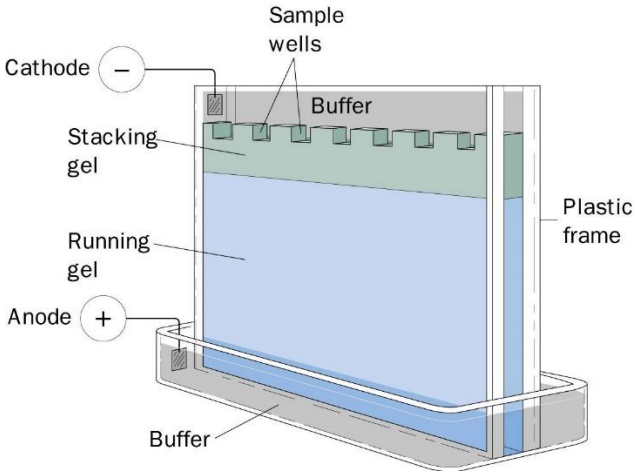


ภาพที่ 6 การเกิดปฏิกิริยา polymerization ของ acrylamide ที่มา https://employees.csbsju.edu

การประกอบเจลเข้ากับอุปกรณ์จะทำโดยการเตรียมสารละลายเจลในบัฟเฟอร์ แล้วเทลงระหว่างกระจกสองแผ่นซึ่งมีแผ่นกั้น (spacer) วางระหว่างกระจกทั้งสองความหนาของเจลจะขึ้นกับความหนาของแผ่นกั้นที่ใช้ จากนั้นจึงใส่หวี (comb) เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับใส่สารตัวอย่าง (well) หลังเจลแข็งตัวแล้ว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10-30 นาที จากนั้นประกอบเจลเข้ากับอุปกรณ์ (gel electrophoresis apparatus) ขอบด้านบนของเจลจะจุ่มอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เรียกว่า cathode buffer ซึ่งอยู่ในภาชนะ (chamber) ที่ต่อเข้ากับขั้วลบ (cathode) ส่วนขอบด้านล่างของ

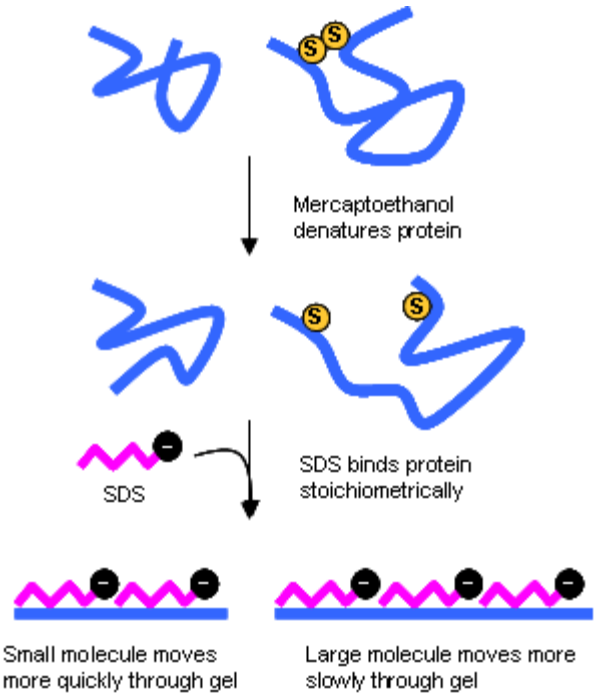
เจลจะจุ่มอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เรียกว่า anode buffer ซึ่งต่อเข้ากับขั้วบวก (anode) เมื่อประกอบอุปกรณ์แล้วจึงต่อขั้วทั้งสองเข้ากับแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า การเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะมีทิศทางจากบนลงล่าง บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคือ Tris-HCl (tris hydroxyl methyl) aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$) ซึ่งมีส่วนผสมของไทรซีน (tricine) อยู่ด้วย เรียกวิธีการแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้ว่า Tricine-SDS-PAGE โดยวิธีนี้จะใช้ในการแยกโปรตีน หรือ polypeptipe ที่มีขนาดเล็ก (1-100 kDa) ได้ดีกว่า Glycine-SDS-PAGE และใช้เปอร์เซ็นต์ของอะคริลาไมด์ที่ต่ำกว่าวิธี Glycine-SDS-PAGE

สำหรับการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าจะกระทำภายใต้ระบบที่ไม่ต่อเนื่อง (discontinuous system) เพื่อทำให้มีความคมชัดของแถบโปรตีนดีขึ้นวิธีนี้ประกอบด้วยเจล 2 ช่วง เจลช่วงบนเรียก stacking gel หรือ spacer gel มี pH 6.9 ซึ่งใน stacking gel จะประกอบไปด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยที่ Tris มีค่า pK_a เท่ากับ 8.3 ที่อุณหภูมิ 20ºC และเจลช่วงล่างเรียกว่า resolving gel หรือ separating gel มีค่า pH ประมาณ 8-9 ในช่วงของ stacking gel จะมีความเข้มข้นของ polyacrylamide ต่ำ (4%) จะมี ionic strength ต่ำ และมีค่า pH ที่เป็นกลาง ในทางตรงกันข้าม resolving gel จะมีความเข้มข้นของ polyacrylamide สูงกว่า (8-20%) มี ionic strength สูง และมีค่า pH ที่เป็นด่าง resolving gel จะทำให้เกิดการแยกกันของโปรตีนตัวอย่าง



ภาพที่ 7 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ที่มา http://www.siumed.edu

เนื่องจากโปรตีนแต่ละชนิดมีประจุสุทธิต่างกันดังนั้นประจุของโปรตีนจึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของ โปรตีน การแยกโปรตีนจึงมักทำในสภาพที่โปรตีนถูกทำให้เสียสภาพโดยการเติมลงในบัฟเฟอร์ โดย SDS จะจับกับกรดอะมิโนในโปรตีนในอัตราส่วนของ 1 โมเลกุลของ SDS ต่อกรดอะมิโน 2 ตัวโดยประมาณ จึงเรียกวิธีวิเคราะห์นี้ว่า SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดังนั้นโครงสร้างจตุรภูมิ ตติยภูมิ และทุติยภูมิ ของโปรตีนจะถูกทำลายเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน SDS-พอลิเพปไทด์ (SDS-polypeptide complex) ซึ่งมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) เนื่องจากสายโซ่พอลิเพปไทด์จะคลายการม้วนออกเป็นสายยาวเมื่อถูกจับด้วย SDS และประจุลบบน SDS จะทำให้ประจุสุทธิบนโปรตีนเป็นลบ ทำให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันคือ เคลื่อนที่เข้าหาขั้วทางขั้วบวก (anode) ดังนั้นการแยกโปรตีนบนเจลจะขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลโปรตีนโดยไม่มีผลของประจุและรูปร่าง เข้ามา เกี่ยวข้อง ซึ่งเราสามารถนำเทคนิค SDS-PAGE มาใช้ในการหามวลโมเลกุลของโปรตีนและพอลิเพปไทด์โดยประมาณได้ สารผสมที่ต้องการแยกและหามวลโมเลกุลต้องถูกทาให้เสียสภาพธรรมชาติ โดยให้ความร้อนที่ 100°C อย่างน้อย 3 นาที ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี SDS ปริมาณมากเกินพอ และมีตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ซึ่งจะทำให้เกิดการละลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ในโปรตีนทาให้พันธะไดซัลไฟด์แยกออกจากกันโดย เปลี่ยนเป็นหมู่ sulfhydyl (SH) พันธะไดซัลไฟด์จะเกิดจากการจับกันของ cysteine ในโปรตีน ส่วน reducing agent ที่นิยมใช้ในการสลายพันธะไดซัลไฟด์ คือ 2-mercaptoethanol (หรือ β-mercaptoethanol) และ dithiothreitol (DTT) นอกจากนี้ยังมีการเติม bromophenol blue ลงในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อเป็น tracking dye หลังจากให้ความร้อนสารตัวอย่างโปรตีนแล้ว ต้องปล่อยให้สารตัวอย่างเย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์โปรตีนหรือพอลิเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงเคลื่อนที่ในระยะทางที่มากกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ในเวลาที่เท่ากัน ซึ่งความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ที่ใช้จะขึ้นกับมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการแยก เมื่อ stacking dye เคลื่อนที่ถึงตำแหน่งที่ต้องการบนเจลแล้วเป็นการสิ้นสุดการทาอิเล็กโทรโฟรีซีส (โดยการปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า) จากนั้นจึงนาเจลมาทาการย้อมสี เพื่อดูแถบของโปรตีน สีย้อม (dye) ที่นิยมใช้คือ Coomassie blue ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่จะถูกย้อมด้วยสีย้อมชนิดนี้ การย้อมด้วย Coomassie blue จะต้องใช้ตัวกลางที่เป็นกรดเพื่อให้เกิดแรงทางไฟฟ้า (electrostatic force) ระหว่างโมเลกุลของสีย้อมกับหมู่แอมโมเนียมไอออน ($-NH_3^+$) ของโปรตีน



ภาพที่ 8 การเข้าจับของ SDS กับโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นเหยียด และมีประจุลบ ที่มา https://www.gibthai.com

2.4 Western blot

Western blot หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Immunoblot เป็นเทคนิคที่ใช้ติดตามโปรตีนที่สนใจในสารตัวอย่าง เช่น homogenate tissue หรือโปรตีนที่สกัดมา เป็นวิธีการคล้ายการทำ southern blot hybridization แต่เปลี่ยนจากการหาดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในตัวอย่างมาเป็นโปรตีนแทน ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

1. การเตรียมเนื้อเยื่อหรือโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการ (tissue/protein preparation)

ตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการทำ western blot อาจได้มาจากเนื้อเยื่อของเซลล์ หรือทำการสกัดโปรตีนออกมาจากเนื้อเยื่อออกมาทั้งหมด ซึ่งการขั้นตอนนการสกัดโปรตีนนั้นจะต้องมีการเติมสาร protease inhibitor ด้วยเป็นการป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ protease ที่มีอยู่ในเซลล์

2. การทำเจลอิเลคโตรฟอเรซีส (gel electrophoresis)

เป็นการแยกโปรตีนตัวอย่างโดยอาจจะแยกตามค่า isoelectic point หรือแยกตามขนาดโปรตีน (molecular weight) ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างนิยมทำกันมาก เพราะง่าย เจลที่ใช้สำหรับการแยกโปรตีนส่วนใหญ่ใช้เจลอะคริลาไมค์ (acrylamide) ซึ่งในการแยกโปรตีนทำได้ทั้งแบบ native gel หรือ

denature gel หรือที่เรียกว่า sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) SDS เป็นสาร ionic detergent ที่จะเข้าไปจับกับโปรตีนทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพและกลายเป็นประจุลบ จึงทำให้การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE จะเป็นการแยกตามขนาดโมเลกุล

3. การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (protein transfer)

เป็นการย้ายโปรตีนผ่านการแยกด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซีสแล้วย้ายสู่เมมเบรนที่มีประจุบวก เช่น nitrocellulose หรือ polyvinylidene fluoride (PVDF) ในปัจจุบันวิธีการย้ายโปรตีนสามารถทำได้ 3 แบบคือ wet tank transfer เป็นการย้ายโดยอาศัย buffer tank ซึ่งวิธีค่อนข้างต้องใช้บัฟเฟอร์เยอะและใช้เวลานานพอสมควรในการย้ายโปรตีน วิธีที่สอง semi-dry transfer เป็นวิธีนิยมใช้กันมากในปัจจุบันเนื่องจากไม่ต้องใช้บัฟเฟอร์เยอะและสามารถทำการย้ายโปรตีนได้หลายแผ่นในเวลาเดียวกัน และสามารถย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนได้เกือบ 100% วิธีสุดท้ายเป็นการย้ายแบบ dry bufferless transfer คือทำการย้ายโปรตีนโดยไม่ต้องใช้บัฟเฟอร์และใช้เวลาน้อยประมาณ 7 นาที ทำให้ลดกระบวนการเตรียมสารต่างๆรวมถึงให้ประสิทธิภาพในการย้ายดีมาก

4. Blocking

เป็นวิธีการป้องกันการเกิด non-specific โปรตีนอื่นๆเข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน หลังจากย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนแล้ว โปรตีนจะจับอยู่กับเมมเบรน แต่ยังมีพื้นที่ของแผ่นเมมเบรนอยู่ที่โปรตีนไม่ได้เข้าจับ ดังนั้นเพื่อป้องกันการจับของโปรตีนตัวอื่นหรือแอนติบอดีกับแผ่นเมมเบรน จึงต้องทำการ blocking ด้วย bovine serum albumin (BSA) หรือ non-fat dry milk ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะจับบนที่ว่างของแผ่นเมมเบรนยกเว้นบริเวณที่มีโปรตีนจับอยู่แล้ว ดังนั้นการทำ blocking จึงมีความสำคัญเพราะจะช่วยลดการเกิด false positives ด้วย

5. การติดตามผล (detection)

ในขั้นตอนการติดตามผลนั้นจะมีการ probe เมมเบรนเพื่อหาโปรตีนที่สนใจด้วยแอนติบอดีซึ่งอาจมีการลิงค์ด้วยเอนไซม์ หรือสารเรืองแสงอื่น และเมื่อทำปริกิริยากับสารตั้งต้นจะทำให้มีสีเกิดขึ้นหรือมีการเปล่งแสงออกมา ซึ่งแบ่งเป็น two step detection และ one-step detection

- Two-step detection เป็นการใช้แอนติบอดี เข้าไปจับโปรตีนที่มีความจำเพาะ เช่นใช้ 1o Ab จับโปรตีนที่สนใจ บ่มเอาไว้เพื่อให้เกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นทำการล้างเพื่อชะ non-specific binding ออกไป แล้วจึงใช้ 2o Ab ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ สารรังสี หรือสารอื่นๆที่สามารถติดตามการเกิดสีหรือเรืองแสงได้ ซึ่ง 2oAb จะเข้ากับกับ 1oAb อย่างจำเพาะ figure 4

- One-step detection เป็นการใช้แอนติบอดีที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์เรียบร้อยแล้ว ให้เข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายได้และสามารถทำให้เกิดสีได้ทันทีหลังจากเติมสารตั้งต้น โดยไม่ต้องผ่านการใช้ 2o Ab เข้าจับอีกที

6. การวิเคราะห์ผล

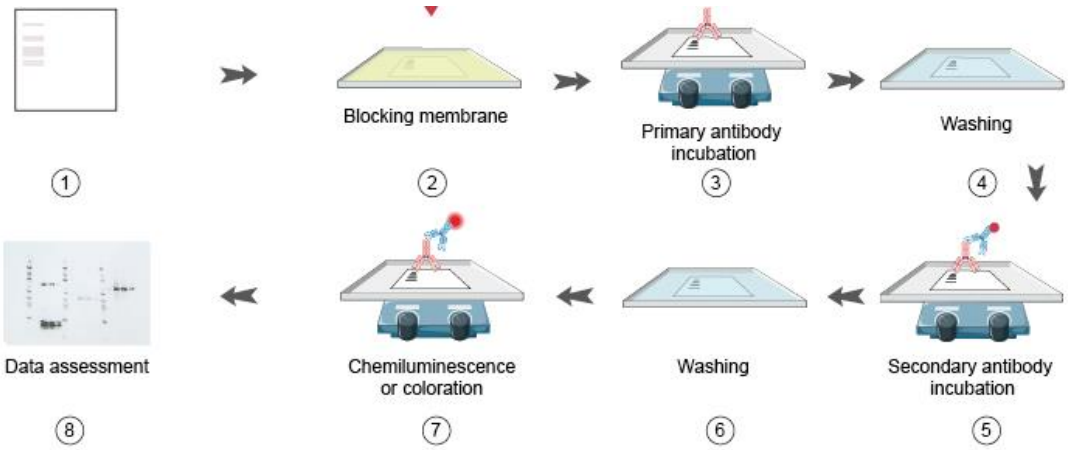
หลังจากทำการบ่มแผ่นเมมเบรนด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะแล้ว จากนั้นจะเป็นวิธีการติดตามว่าแอนติบอดีไปเกาะกับโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งใด ซึ่งการติดต่อวิเคราะห์ผลก็ขึ้นอยู่กับว่าแอนติบอดีที่ใช้ติดฉลากด้วยสารอะไร แบ่งได้ดังนี้

1. Colorimetric detection เป็นการติดตามผลโดยดูการเกิดสีที่เกิดจากเอนไซม์ย่อยสารตั้งต้นแล้วเกิดขึ้นบนแผ่นเมมเบรน

2. Chemiluminescent detection เป็นการติดตามผลโดยการเรืองแสง ซึ่ง substrate ที่ใช้เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้วทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นมา อาจต้องติดตามด้วย photographic filter หรือกล้อง CCD เพื่อจับภาพของเมมเบรน

3. Radioactive detection การติดตามเป็นวิธีนี้ไม่ต้องใช้ substrate เพราะแอนติบอดี ถูกติดฉลากด้วยสารรังสีซึ่งจะเกิดการเปล่งแสงออกมา ต้องติดตามผลด้วยการประกบกับฟิล์มเอกซเรย์

4. Fluorescent detection การวิเคราะห์และติดตามผลแบบนี้แอนติบอดีจะถูกติดฉลากมาด้วยสารเรืองแสง (fluorescent) ซึ่งจะต้องมีการกระตุ้น (excitation) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม และมีการ ปล่อยแสง (emission) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน ดังนั้นจะต้องดูผลโดยการใช้กล้อง photosensor เช่นกล้อง CCD ที่มี filter ในช่วงความยาวคลื่นตรงกันกับสารเรืองแสงเหล่านั้นในการจับภาพ



ภาพที่ 9 แสดงขั้นตอน Western blot ที่มา www.creative-diagnostics.com

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อมรรัตน์ (2544) ได้ทำการศึกษาโปรตีนของไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวของกุ้งกุลาดำ และรายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดีต่อไวรัส White spot syndrome virus; WSSV ให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาโปรตีนไวรัส และใช้ในการผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดี จากการตรวจสอบไวรัส WSSV ที่เตรียมด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าไวรัสที่เตรียมมีขนาดโปรตีน 18, 22, 24, 26, 29, 38, 74, 80, 100, 108 และ 130 kDa โดยโปรตีนขนาด 18, 22, 24, 26 kDa เป็นโปรตีนของไวรัส WSSV จากการศึกษาด้วยวิธี Western blot พบว่าขนาดโปรตีน 18 และ 26 kDa สามารถทำปฏิกิริยากับโพลีโคนอลแอนติบอดีได้ชัดเจน

กรีสัลย์ (2554) ได้ทำการแยกไวรัสหัวเหลือง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยปั่นแยกไวรัสโดยใช้ Ultracentrifuge ใน 20-45% Continous surcrose gradient เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าวิธีการทำบริสุทธิ์ไวรัสให้ผลดี และรวดเร็วโดยสามารถสังเกตเห็นแถบไวรัสบริสุทธิ์เป็นแถบสีขาวซึ่งแยกได้จากแถบสีฟ้าที่เป็นโปรตีนในเลือดกุ้งคาดว่าเป็น Hemocyanin และเมื่อนำไวรัสหัวเหลืองที่แยกได้ และทำให้บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าไวรัสหัวเหลืองประกอบด้วยโปรตีน 4 ขนาด คือ 135, 112, 67 และ 22 kDa และเมื่อนำโปรตีนที่แยกได้ไปจับกับโพลีโคนอลแอนติบอดีในซีรั่มหนูด้วยวิธี Western blot พบโปรตีนขนาด 135 kDa ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าโปรตีนอื่น แสดงว่าไวรัสหัวเหลืองที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ซึ่งน่าจะเหมาะสมในการนำมาใช้ในการผลิตโมโนโคลอลแอนติบอดีต่อไป

นิวัตร (2551) พัฒนาวิธี ELISA และการยับยั้งการตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ พบว่าหลังจากเตรียมไวรัวให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Sucrose gradient แล้ว จะได้แอนติเจนที่บริสุทธิ์ 2 แถบซึ่งเป็นเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ และนำไปหาค่า OD โดยเปรียบเทียบกับค่า OD มาตรฐานความเข้มข้น 1.5, 1.0, 0.8, 0.6 และ 0.4 พบว่าแถบไวรัสส่วน A มีความเข้มข้น 598 µg/ml และส่วน B มีความเข้มข้น 1,290 µg/ml

เอกสิงห์ (2556) ได้ทำการทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมวัคซีนโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่เนื้อต่อไวรัสสายพันธุ์ THA80151และ THA90151 ที่แยกได้ในประเทศไทย โดยการทดลองที่ 1 แบ่งเป็น 5 กลุ่มการทดลองที่ 2 แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มที่ 1 ให้วัคซีน Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 วัน กลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนวัคซีน Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 และ 14 วัน กลุ่มที่ 3 ให้วัคซีน Nobilis IB H120 และ Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 และ 14 วัน ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 ให้วัคซีน Nobilis IB H120 และ Nobilis IB 4-91 ที่อายุ 1 และ 14 วัน ตามลำดับ กลุ่มที่ 5 ไม่ให้วัคซีนและได้รับเชื้อ IBV กลุ่มที่ 6 ไม่ให้วัคซีนและไม่ได้รับเชื้อ IBV การทดลองที่ 1 กลุ่มทดลองที่ 1 - 5 ได้รับเชื้อ IBV THA80151 ที่ความเข้มข้น 105.62 ELD50/0.1 มล. ที่ไก่อายุ 28 วัน และการทดลอง

ที่ 2 กลุ่มทดลองที่ 1 - 5 ได้รับเชื้อ IBV THA90151 ที่ความเข้มข้น 105.78 ELD50/0.1 มล. ที่ไก่อายุ 28 วัน ประเมินผลการทดลองจาก เสียงกรน อัตราการตาย น้ำหนักตัว ciliostasis score ภายในท่อลม รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน และการแยกเชื้อไวรัส โปรแกรมวัคซีนถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้ ทุกกลุ่มแสดงถึงการป้องกันความเสียหายภายหลังจากที่ให้เชื้อไวรัส วัคซีนสามารถลดความรุนแรงจากเสียงกรน ระดับคะแนนการพัดโบกของซิเลียและรอยโรค ทางจุลพยาธิวิทยากับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน โปรแกรมวัคซีนที่ทดลองไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส THA80151 ได้ ยังคงสามารถแยกเชื้อได้จากบางอวัยวะที่ติดเชื้อ การให้วัคซีนซ้ำครั้งที่สอง ด้วยเชื้อ IBV สายพันธุ์ที่แตกต่างจากครั้งแรกสามารถเพิ่มการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบ THA80151 และ THA90151

ภีมภัส (2556) ได้ทำการทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรมวัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่เนื้อต่อไวรัสชนิดสายพันธุ์ THA80151และ THA90151 ที่ถูกแยกได้ในประเทศไทย กลุ่มทดลองไก่เนื้อถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม สำหรับกลุ่มที่ 1 ให้วัคซีน Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 วัน สำหรับกลุ่มที่ 2 ให้วัคซีนวัคซีน Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 และ 14 วัน สำหรับกลุ่มที่ 3 ให้วัคซีน Nobilis IB H120 และ Poulvac IB QX like ที่อายุ 1 และ 14 วัน ตามลำดับ สำหรับกลุ่มที่ 4 ให้วัคซีน Nobilis IB H120 และ Nobilis IB 4-91 ที่อายุ 1 และ 14 วัน ตามลำดับ สำหรับกลุ่มที่ 5 ไม่ให้วัคซีนและได้รับเชื้อ IBV กลุ่มที่ 6 ไม่ให้วัคซีนและไม่ได้รับเชื้อ IBV การทดลองที่ 1 กลุ่มทดลองที 1-5 ได้รับเชื้อ IBV THA80151 ที่ความเข้มข้น 106.33 EID50/0.1 มลml. และการทดลองที่ 2 กลุ่มทดลองที่ 1-5 ได้รับเชื้อ IBV THA90151 ที่ความเข้มข้น 105.78 EID50/0.1 มลml. ประเมินผลการทดลองจาก เสียงกรนในหลอดลมท่อลม อัตราการตาย นำหนักตัว การพัดโบกของซิเลียภายในหลอดลมท่อลม รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน และ การแยกเชื้อไวรัส โปรแกรมวัคซีนถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้ ทุกกลุ่มแสดงถึงการป้องกันความเสียหายภายหลังจากที่ให้เชื้อไวรัส วัคซีนสามารถลดความรุนแรงจากเสียงกรนในหลอดลมท่อลม ระดับคะแนนการพัดโบของซิเลียและรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยากับกลุ่มที่ได้รับวัคซีนเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน โปรแกรมวัคซีนที่ทดลองไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส THA80151 ได้ ยังคงสามารถแยกเชื้อได้จากบางอวัยวะที่ติดเชื้อ การให้วัคซีนซ้ำครั้งที่สอง ด้วยเชื้อ IBV สายพันธุ์ที่แตกต่างจากครั้งแรกสามารถเพิ่มการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบหลอดลมอักเสบ THA80151 และ THA90151

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้

3.1.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. หลอดทดลอง (Test tube)
2. บีกเกอร์ (Beaker)
3. ขวดเก็บสาร (Reagent bottle)
4. ปากคีบ (Forceps)
5. ช้อนตักสาร (Dispensing spoons)
6. กระบอกเข็มฉีดยา (Syringe)
7. หัวเข็มฉีดยา (Needle)
8. ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
9. กระบอกตวง (Cylinder)
10. ไมโครปิเปต (Micropipette)
11. ปิเปตทิป (Pipette tip)
12. หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
13. Centrifuge tube, Ultraclear^{TM}, Beckman, USA ขนาด 9/16 x 31/2 นิ้ว
14. Nitrocellulose membrane
15. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic Bar)
16. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow biological safety cabinet)
17. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
18. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
19. เครื่องวัด pH (pH meter)
20. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
21. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Ultracentrifuge)

- Beckman XL-A Ultracentrifugator, Beckman Co.Ltd. พร้อมโรเตอร์แบบ swing type model SW 41 Ti

22. เครื่องเคลื่อนย้ายโมเลกุลของโปรตีนและสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าชนิดกึ่งแห้ง (Trans-blot semi dry transfer electrophoretic cell) ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น Trans-Blot SD Cell
23. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
24. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
25. ชุดอุปกรณ์ Electrophoresis
26. Electrophoresis Power Supply
27. ตู้เย็น (Refrigerators)
28. เครื่องเขย่าสารแบบเอียงชนิด rocker (Rocker shaker)
29. เครื่องเครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hotplate magnetic stirrer)
30. เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)
31. นาฬิกาจับเวลา (Timer)
32. พาราฟิล์ม (Parafilm)
33. ปากกาเคมี (Permanent marker)
34. กระดาษ (Label sticker)
35. กระติกเก็บความเย็น
36. หม้อต้ม

3.1.2 สารเคมีและสารมาตรฐาน

1. 20-50% Sucrose in TNE buffer
2. TNE buffer
3. 30% Acrylamide
4. 1.5 M Tris-HCl pH 8.8
5. 0.5 M Tris-HCl pH 8.8
6. 10% SDS
7. 10% APS
8. TEMED

9. 10X, 2X และ 1X SDS-PAGE Running buffer
10. BLUeye Prestained Protein Ladder ยี่ห้อ Gene Direx
11. 10X และ 1X Tris buffer saline (TBS)
12. 10X และ 1X Transfer buffer
13. Coomassie Brilliant Blue R-250
14. 5% Skim milk
15. Diaminobenzidine (DAB)
16. Dihydrogen dioxide (H_2O_2)
17. Coomassie Brilliant Blue R-250
18. 1x Tris base
19. Tris base
20. Glycine
21. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
22. 10% Ammonium persulfate (10% APS)
23. TEMED
24. Methanol
25. Glacial acetic acid
26. NaCl
27. EDTA
28. Distilled water

3.1.3 เชื้อที่ใช้ทดสอบ

1. Infectious bronchitis virus (IBV)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.2.1 ไวรัส Infectious bronchitis virus (IBV)

- เชื้อไวรัส IBV ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายผลิตวัคซีนสัตว์ปีก
- Anti-serum ต่อเชื้อไวรัส IBV ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายควบคุมการผลิตวัคซีนสัตว์ปีก

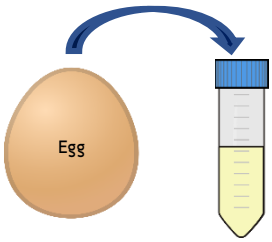
3.2.2 การเพิ่มปริมาณไวรัส

เชื้อไวรัส Infectious bronchitis virus (IBV) นำมาฉีดเข้าทาง allantoic cavity ในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อ อายุ 9-11 วัน โดยทำการฉีดเชื้อไวรัสปริมาณ $10^{3.75}$ fifty percent embryo infective dose (EID_{50}) ฟองละ 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ตู้อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 55-60% แล้วนำไปฟักต่อ 7 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส หลังจากนั้นทำการเก็บ allantoic fluid ที่มีเชื้อ IBV แล้วนำไปทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 การแยกและทำไวรัสให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างน้ำไวรัสที่เก็บจาก allantoic fluid ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Sigma, 3K-18) ความเร็วรอบ 7,000 *xg* ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที เพื่อแยกส่วนไข่ขาวและเศษตะกอนในน้ำไข่ และไปปั่นเหวี่ยงผ่าน 20% (w/v) sucrose gradient ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง ultracentrifuge แบบ swing type model SW 41 Ti (Beckman, XL-A) ความเร็วรอบ 98,000 *xg* ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification) จากนั้นละลายตะกอนด้วย 1X TNE buffer (Tris-buffered saline 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) และนำน้ำตะกอนที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงผ่าน 30-50% (w/v) sucrose gradient ชั้นละ 5 มิลลิลิตร ความเร็วรอบ 98,000 *xg* อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที สังเกตลักษณะวงแหวนสีขาวที่ระหว่างชั้น 30% และ 50% sucrose (w/v) ดูเก็บส่วนวงแหวน และน้ำตัวอย่างแต่ละขั้นตอนไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting assay ต่อไป

แผนผังแสดงขั้นตอนการแยกและทำไวรัสให้บริสุทธิ์



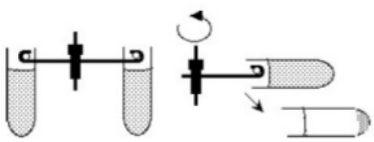
ดูดน้ำไวรัสใน allantoic fluid

7,000 g, 4ºC, 15 min

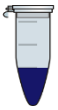
เก็บส่วนใส (Supernatant) เทตะกอนทิ้ง

ตัวอย่างส่วนใสน้ำไวรัส 2 ml

20% Sucrose 10 ml



98,000 g, 4ºC, 2 hr.

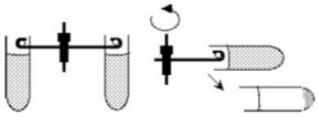


ตัวอย่างตะกอนไวรัส

ตัวอย่างตะกอนไวรัส 2 ml

30% Sucrose 5 ml

50% Sucrose 5 ml



98,000 g, 4ºC, 3 hr 30 min

แถบวงแหวนสีขาว

ดูเก็บส่วนวงแหวน

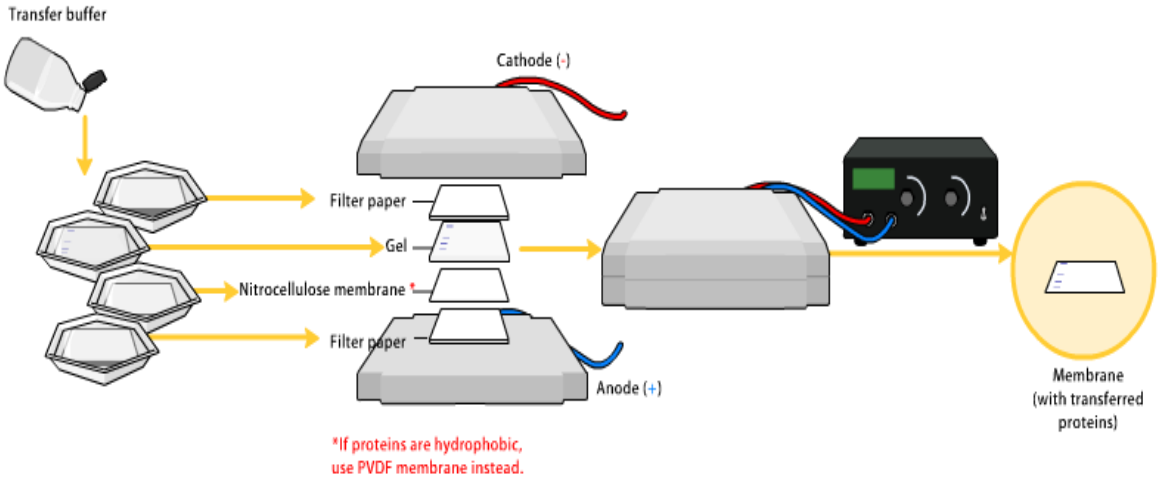
3.2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติของไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของตัวอย่างไวรัสใน allantoic fluid, ตัวอย่างไวรัสที่ผ่าน 20% sucrose และตัวอย่างตะกอนวงแหวนไวรัสที่ผ่าน 30-50% sucrose (w/v) ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยอาศัยเทคนิคการแยกโปรตีนองค์ประกอบในตัวอย่างตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลด้วย 10% polyacrylamide gel เตรียมตัวอย่างโปรตีนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับสีย้อม 1X laemmli sample buffer ในอัตราส่วน 2:1 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นหยอดตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร และใช้โปรตีนมาตรฐาน (Marker) 3 ไมโครลิตร ปล่อยกระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ 200 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 80 นาที หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นสีย้อมเคลื่อนที่ลงมาสุดขอบกระจก เมื่อครบเวลาแกะแผ่นเจลออกจากกระจก และนำไปย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant blue เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีด้วย Destain solution I จนกระทั่งเจลใส และอ่านผลรูปแบบโปรตีนบนเจลเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Protein marker)

3.2.5 การตรวจสอบยืนยันความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot

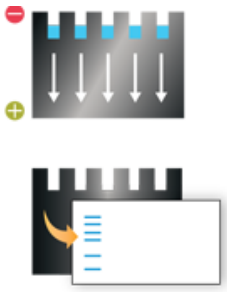
นำตัวอย่างโปรตีนในข้อ 3.2.4 ที่ผ่านการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE มาทดสอบยืนยันความจำเพาะต่อซีรั่มไก่ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (กรมปศุสัตว์) โดยทำการย้าย 10% polyacrylamide gel จากขั้นตอน SDS-PAGE และวางลงบน nitrocellulose membrane ที่มีขาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นประกอบเครื่องส่งถ่ายโปรตีน Semi dry blotting (BIO-RAD) และใช้ transfer blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol, pH 8.2) ที่เย็นเทลงใน chamber และปล่อยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 15 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โปรตีนจะถูกส่งถ่ายจาก polyacrylamide gel ไปสู่ nitrocellulose membrane เมื่อครบเวลาล้าง nitrocellulose membrane ด้วย washing buffer (TBST; 50 mM Tris-base, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยบ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เท washing buffer ออก และเติม blocking buffer ซึ่งประกอบด้วย TBST และ 5% skim milk ปริมาตร 30 มิลลิลิตร หรือให้ท่วมแผ่น membrane เพื่อป้องกันการจับที่ไม่จำเพาะของ antibody โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเท blocking buffer ทิ้ง และเติม primary antibody ที่เจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1:50 ซึ่งเป็นแอนติซีรั่มของไก่ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA ปริมาตร 25

มิลลิลิตร หรือให้ท่วมแผ่น membrane บ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย western blot washing buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วเติม secondary antibody โดยใช้ anti chicken IgG ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (Sigma) ที่เจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1:1,000 บ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย western blot washing buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง และบ่มด้วย TBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นาน 5 นาที ตรวจสอบปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดสด้วย 3,3-diaminobenzidine (DAB) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าจะสังเกตเห็นแถบสีน้ำตาลเข้มของโปรตีนเกิดขึ้นแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา



ภาพที่ 10 แสดงขั้นตอนการทำ Western blot ที่มา https://www.creative-diagnostics.com

แผนผังแสดงขั้นตอนการตรวจสอบยืนยันความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot



แกะแผ่น nitrocellulose

ล้างด้วย washing buffer

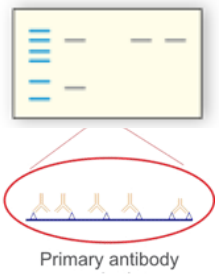
5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

block ด้วย 5% skim milk

1 ชั่วโมง

เท block ทิ้ง



เติม primary antibody

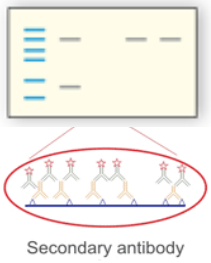
อัตราส่วน 1:50

บ่มที่อุณหภูมิห้อง

2 ชั่วโมง

ล้างด้วย washing buffer

5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง



เติม secondary antibody

อัตราส่วน 1:1,000

บ่มที่อุณหภูมิห้อง

2 ชั่วโมง

ล้างด้วย washing buffer

5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย

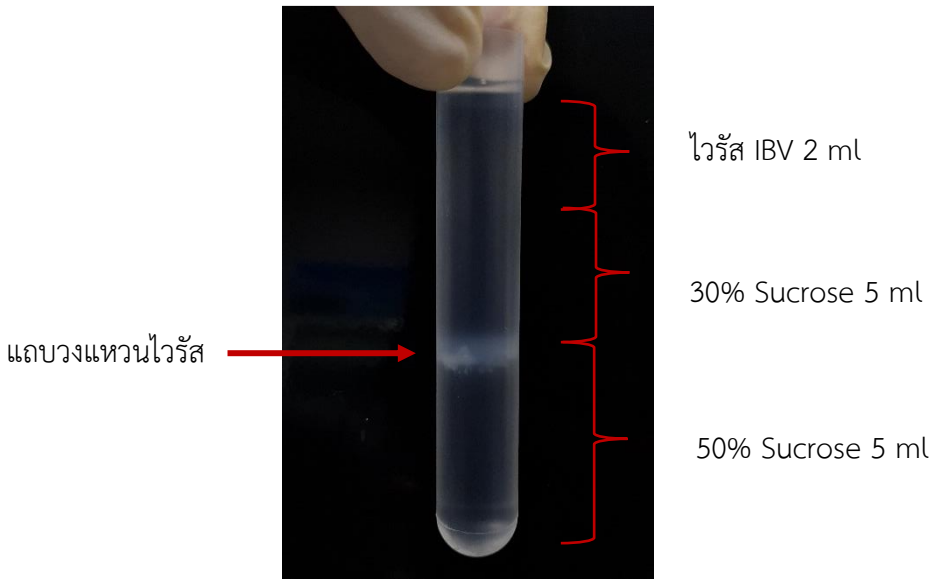
3,3-diaminobenzidine

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 การแยกและทำบริสุทธิ์ไวรัสด้วยวิธี Continuous sucrose gradient

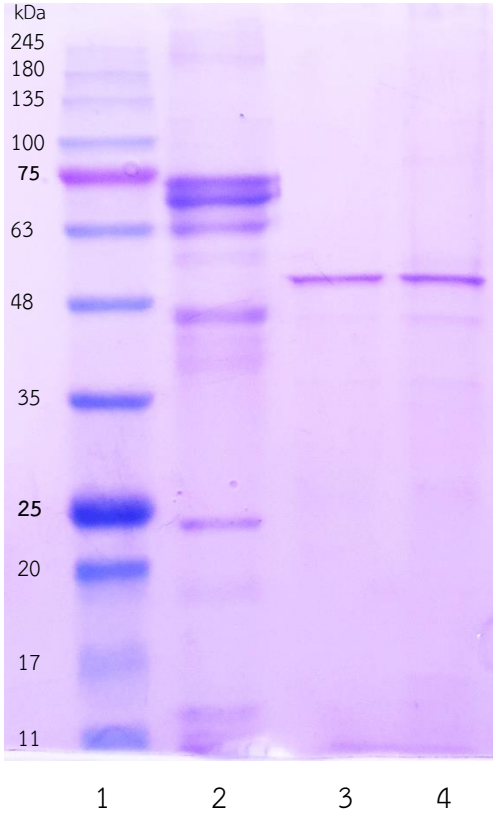
จากการตรียมไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ (IBV) โดยการปั่นแยกไวรัสด้วยเครื่อง Ultracentrifuge (Beckman) ที่ความเร็ว 36,000 rpm นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C ใช้โรเตอร์แบบ swing type model SW 41 Ti ด้วย 20% (w/v) sucrose พบตะกอนบริเวณก้นหลอด เมื่อละลายตะกอนด้วย TNE buffer และนำมาผ่าน 30-50% (w/v) continuous sucrose gradient ที่ความเร็ว 36,000 rpm นาน 3 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จะพบแถบวงแหวนสีขาวที่ชั้น 30% sucrose ดังภาพ



ภาพที่ 11 ภาพแสดงวงแหวนสีขาวหลังจากปั่นแยกผ่าน 30-50% continuous sucrose gradient

4.2 การตรวจสอบคุณสมบัติของไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE

เมื่อนำตัวอย่างมาทดสอบคุณสมบัติโปรตีนด้วย 10% polyacrylamide SDS-PAGE พบว่าตัวอย่างน้ำไวรัสใน allantoic fluid ปรากฏแถบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70, 63, 45, 23, 16, 13, 11 และ 10 kDa อาจจะเป็นไปได้ว่าในตัวอย่างดังกล่าวมีโปรตีนจากน้ำ allantoic fluid ปนอยู่จึงสังเกตเห็นแถบโปรตีนหลายแถบในตัวอย่างดังกล่าว ในขณะที่ตัวอย่างไวรัสที่ผ่าน 20% (w/v) sucrose และตัวอย่างตะกอนวงแหวนไวรัสที่ผ่าน 30-50% (w/v) sucrose พบแถบโปรตีนชัดเจนที่ขนาดประมาณ 50 kDa ดังภาพ



ภาพที่ 12 ภาพแสดงขนาดโปรตีนที่แยกใน 10% gel SDS-PAGE หลังจากปั่นแยก

Lane 1 โปรตีนมาตรฐาน (Marker)

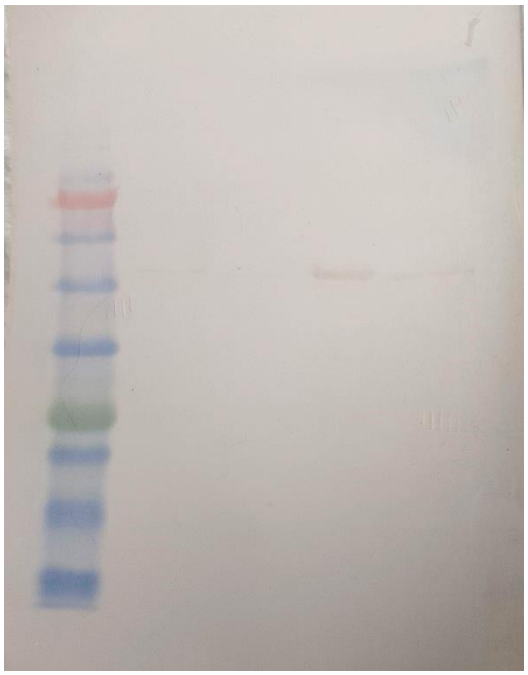
Lane 2 ตัวอย่างไวรัสใน allantoic fluid

Lane 3 ตัวอย่างไวรัสที่ผ่าน 20% sucrose

Lane 4 ตัวอย่างตะกอนวงแหวนไวรัสที่ผ่าน 30-50% sucrose

4.3 การยืนยันความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot

เมื่อนำตัวอย่างน้ำไวรัสใน allantoic fluid, ตัวอย่างไวรัสที่ผ่าน 20% (w/v) sucrose และตัวอย่างตะกอนวงแหวนไวรัสที่ผ่าน 30-50% (w/v) sucrose มาตรวจยืนยันความจำเพาะด้วยวิธี western blot พบแถบปฏิกิริยาของตัวอย่างไวรัสที่ผ่าน 20% (w/v) sucrose และตัวอย่างตะกอนวงแหวนไวรัสที่ผ่าน 30-50% (w/v) sucrose กับซีรั่มไก่ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ได้อย่างชัดเจนที่โปรตีนขนาดโมเลกุล 50 kDa ดังภาพ



1 2 3 4

ภาพที่ 13 แสดงผลของปฏิกิริยา Western Blot ระหว่างซีรั่มไก่กับไวรัสที่แยกได้

Lane 1 โปรตีนมาตรฐาน

Lane 2 ตัวอย่างน้ำไวรัสใน allantoic fluid

Lane 3 ตัวอย่างไวรัสที่ผ่าน 20% sucrose

Lane 4 ตัวอย่างตะกอนวงแหวนไวรัสที่ผ่าน 30-50% sucrose

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การแยกไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการปั่นแยกไวรัสที่ได้จากไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน โดยใช้เครื่อง Ultracentrifuge (Beckman Coulter XL-A) ผ่าน 20% (w/v) sucrose gradient ปั่นเหวี่ยงที่ 98,000 x *g* ที่อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอนด้วย TNE buffer นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นผ่าน 30-50% (w/v) sucrose gradient ปั่นเหวี่ยงที่ 98,000 x *g* อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที จะพบแถบวงแหวนสีขาวที่ชั้น 30% sucrose เมื่อนำวงแหวนไปวิเคราะห์ขนาดโปรตีนของไวรัส ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 10% polyacrylamide gel พบว่าตัวอย่างน้ำไวรัสใน allantoic fluid ปรากฏแถบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70, 63, 45, 23, 16, 13, 11 และ 10 kDa อาจจะเป็นไปได้ว่าในตัวอย่างดังกล่าวมีโปรตีนจากน้ำ allantoic fluid ปนอยู่จึงสังเกตเห็นแถบโปรตีนหลายแถบในตัวอย่างดังกล่าว และไม่พบแถบปฏิกิริยาดังกล่าวเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี western blot อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของไวรัส IBV ในน้ำ allantoic fluid ไม่มากพอที่จะทำให้เกิดแถบปฏิกิริยาดังกล่าว ในขณะที่ตัวอย่างไวรัสที่ผ่าน 20% (w/v) sucrose และตัวอย่างตะกอนวงแหวนไวรัสที่ผ่าน 30-50% (w/v) sucrose เป็นไวรัสบริสุทธิ์ประกอบด้วยโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 50 kDa ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kong Q. และคณะ (2010) ได้ทำการวิเคราะห์อนุภาคโปรตีนของเชื้อไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่ทำให้บริสุทธิ์ พบแถบโปรตีน Spike มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 170 kDa, S1 มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 120 kDa, S2 มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 80 kDa, Nuclecapsid มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 55,50 และ 40 kDa, Membrane มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 30, 24 และ 19 kDa, และ Envelope มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 12 kDa

จากผลการทดสอบด้วยวิธี Western blot ชี้ให้เห็นว่าแอนติไวรัส IBV ที่แยกให้บริสุทธิ์นั้นสามารถทำปฏิกิริยากับซีรั่มไก่ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ได้ดี ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีการแยกและบริสุทธิ์ผ่าน Sucrose gradient สำหรับเตรียมแอนติเจนเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ส่งผลให้เกิดการวางแผนควบคุมป้องกันโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพต่อไป

บรรณานุกรม

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง. (2548). การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในยีนเอสวันและการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อชนิดที่ทำให้เกิดรอยโรคที่ไตในไก่เนื้อ.กรุงเทพมหานคร : ฐานข้อมูลวิทยานิพนธ์ไทย.

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง. (2556). ประสิทธิภาพการป้องกันในไก่ของเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์ QX ที่ทำให้เชื้อลดความรุนแรงด้วยความร้อน.ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย. (2551). การพัฒนาวิธี ELISA และการยับยั้งการตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพมหานคร.

ภีมภัส เบ็งทอง. (2556). การแบ่งกลุ่มไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ที่แยกได้ในประเทศไทยและการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนในการนิวทรัลไลซ์ไวรัส. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพมหานคร.

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2558). วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม ๒. กรุงเทพฯ: บริษัท Full Forse จำกัด. หน้า 64-69

อารีรัตน์ แพงเพ็ง และสายพิณ ขุมทรัพย์. (2558). การพัฒนาวิธี indirect ELISA สำหรับตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ปลอดเชื้อเฉพาะ. ชีวผลิตภัณฑ์, 24 (1-2) ,50-61

เอกสิงห์ สาเรือง. (2556). ประสิทธิภาพและโปรแกรมวัคซีนเชื้อเป็นหลอดลมอักเสบติดต่อสายพันธุ์คล้ายคิวเอ็กซ์ต่อการติดเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Cavanagh D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. Journal of General Virology 1983; 64: 2577-2583.

Cavanagh D, Davis PJ. (1986). Coronavirus IBV: removal of spike glycopolypeptide S1 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells. Journal of Genetic Virology 1986; 67:1443-1448.

Cavanagh D, Davis PJ, Moc- Kett APA. (1988). Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. Virus Research 1988; 11:141-150.

Cavanagh, D. and Naqi, S.A. (2003). Infectious bronchitis. Diseases of poultry 11th edition. Iowa, Iowa State Press.

Kong Q., Xue C., Ren X., Zhang C., Li L., Shu D., Bi Y., Cao Y. (2010). Proteomic analysis of purified coronavirus infectious bronchitis virus particles Proteome Sci 829.10.1186/1477-5956-8-29.

Tawatchai Pohuang. (2010). Development of diagnostic method, molecular characterization and efficacy of infectious bronchitis virus vaccines in chickens in Thailand . Chulalongkorn University/Bangkok.

The world organisation for a animal health (OIE). (2018). - Avian infectious bronchitis, chapter 3.3.2. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), 6th Ed. Volume 2. OIE, Paris, 796-809.

Dent, S. D., Xia, D., Wastling, J. M., Neuman, B. W., Britton, P. & Maier, H. J. (2015) The proteome of the infectious bronchitis virus Beau-R virion. J Gen Virol 96, 3499-3506.

S. Arthur Sylvester, J.M., Kataria, K. Dhama, S.Rahul, Nitin Bhardwaj and S. Tomar. (2003). Purification of infectious bronchitis virus propagated in embryonated chicken eggs and its confirmation by RT-PCR. Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis., 24: 143-147.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

TNE buffer pH 7.4

50 mM Tris	9.0855 g
100 mM NaCl	8.766 g
1 mM EDTA	0.558 g

Sucrose gradient 20-50%

ละลาย sucrose ตามความเข้มข้นต่างๆ ใน TNE buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

NaCl	8.0 g
Na_2HPO	2.9 g
KH_2PO	0.2 g
KCl	0.2 g

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml

การเตรียมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล SDS-PAGE

10X SDS-PAGE running buffer (pH 8.3)

Tris	30.3 g
Glycine	180 g
SDS	10 g
น้ำกลั่น	1000 ml

ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2X SDS-PAGE running buffer (pH 8.3)

10X SDS-PAGE (pH 8.3)	200 ml
น้ำกลั่น	800 m

ละลายให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1X SDS-PAGE running buffer (pH 8.3)

10X SDS-PAGE (pH 8.3)	100 ml
น้ำกลั่น	900 ml

ละลายให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.5 M Tris HCl (pH 8.8)

Tris base	18.15 g
น้ำกลั่น	70 ml

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 เติม HCl เข้มข้น (35% HCl) ประมาณ 5 ml
และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml
เก็บที่อุณหภูมิห้อง

0.5 M Tris HCl (pH 8.8)

Tris base	6.00 g
น้ำกลั่น	60-80 ml

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml
เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10% SDS

Sodium dodecyl sulfate	5.00 g
น้ำกลั่น	50 ml

ละลายให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10% APS

Ammonium persulfate	0.50 g หรือ 0.1 g
น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	5 ml หรือ 1 ml

ละลายให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดละ 100 µl
หลังจากเตรียมแล้วให้เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จะเก็บได้นาน หากเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ใช้ได้ 1 สัปดาห์

Coomassie-blue

Coomassie blue R 250	0.3 g
น้ำกลั่น	120 ml
acetic acid	30 ml
methanol	150 ml

ละลายให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด โดยห่อขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอล์ย

Destain solution I

น้ำกลั่น	425 ml
methanol	500 ml
acetic acid	75 ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

SDS-PAGE Gel

ตารางที่ 1 แสดงส่วนผสมของชั้น resolving gel

Resolving gel				
Component	**Volume (ml) by gel Percentage**			
	7.5%	**10%**		**12.5%**
H_2O	4.8 ml	4.0 ml	2.0 ml	3.1 ml
30% Acrylamide	2.5 ml	3.3 ml	1.65 ml	4.2 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	2.5 ml	1.25 ml	2.5 ml
10% (w/v) SDS	100 µl	100 µl	50 µl	100 µl
* 10% (w/v) APS	100 µl	100 µl	50 µl	100 µl
* TEMED	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl
Total volume	10 ml	10 ml	5 ml	10 ml

หมายเหตุ *ใส่ขั้นตอนสุดท้าย เพราะจะทำให้เจลแข็งตัว

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสมของชั้น 4% Stacking gel

4% Stacking gel			
Component	**Volume (ml)**		
H_2O	6.0 ml	3.0 ml	1.5 ml
30% Acrylamide	1.3 ml	650 µl	325 µl
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	1.25 ml	625 µl
10% (w/v) SDS	100 µl	50 µl	50 µl
* 10% (w/v) APS	50 µl	25 µl	25 µl
* TEMED	10 µl	5 µl	5 µl
Total volume	10 ml	5 ml	2.5 ml

หมายเหตุ *ใส่ขั้นตอนสุดท้าย เพราะจะทำให้เจลแข็งตัว

การเตรียมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล Western blot

10X Transfer buffer (pH 8.3)

Tris	30.28 g
Glycine	144 g
น้ำกลั่น	1000 ml

เก็บที่อุณหภูมิ 4ºC

1X Transfer buffer (pH 8.3)

10X Transfer buffer (pH 8.3)	100 ml
น้ำกลั่น	700 ml
Methanol	200 ml

เก็บที่อุณหภูมิ 4ºC

Blocking buffer

5% Non-fat milk in TBS-Tris

TBS-Tris	100 ml

Skim milk	5 g

10X Tris buffer saline (TBS), pH 7.5

Tris base	60.5 g
NaCl	87.6 g
น้ำกลั่น	800 ml

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml และปรับ pH ด้วย HCl

นึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1X Tris buffer saline (TBS), pH 7.5

1X Tris buffer saline (TBS), pH 7.5	100 ml
น้ำกลั่น	900 ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

DAB (Diaminobenzidine)

Diaminobenzidine	0.006 g
ละลายด้วย TBS	10 ml
เติม Hydrogen peroxide	1 ml

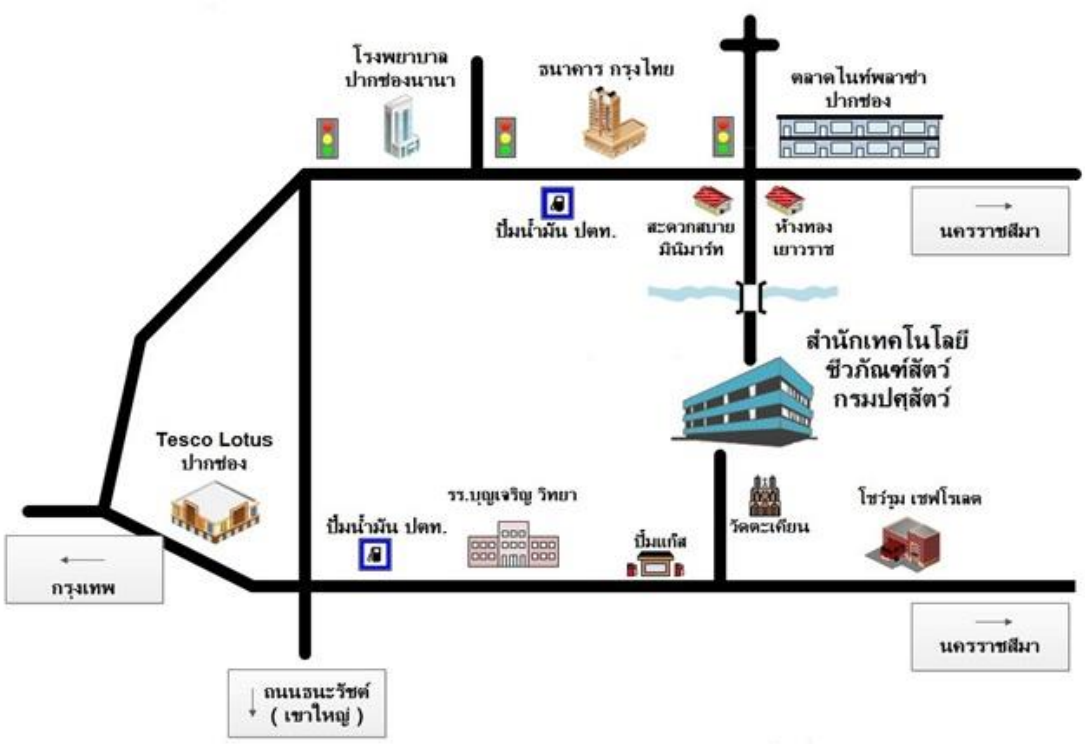
ใช้ทันที ห้ามทิ้งไว้นาน

ภาคผนวก ข
รายละเอียดการปฏิบัติงาน

1. ชื่อ และที่ตั้งของสถานประกอบการ

1.1 ชื่อ: สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (Bureau of Veterinary Biologic)

1.2 ที่ตั้ง: 1213 ถนนกองวัคซีน ตำบลปากช่อง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา รหัสไปรษณีย์ 30130, โทร 044-311476 , โทรสาร 044-315931 , เว็ปไซต์:



http://biologic.dld.go.th

2. ลักษณะการประกอบการ

2.1 วิสัยทัศน์

เป็นผู้นำในการผลิตวัคซีนระดับภูมิภาคอาเซียน เพื่อส่งเสริมปศุสัตว์ไทยอย่างยั่งยืน

2.2 ภารกิจหลักพันธกิจ

ผลิตชีวภัณฑ์สัตว์ชนิดต่าง ๆ สำหรับจำหน่ายเพื่อควบคุมป้องกันโรคระบาดสัตว์ ตามนโยบายของกรมปศุสัตว์ รวมทั้งการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ สนองตอบความต้องการของเกษตรกร

2.3 พันธกิจ

ประเด็นหลัก	พันธกิจ
การผลิตและการทดสอบวัคซีน และมาตรฐานการผลิตและทดสอบ	ผลิตชีวภัณฑ์สัตว์ที่มีคุณภาพตามมาตรฐานสากล สำหรับจำหน่ายในประเทศ และประเทศข้างเคียง
ระบบสนับสนุนการดำเนินการ	ปรับปรุงหน่วยงานที่สนับสนุนการดำเนินการขององค์กรให้มีประสิทธิภาพ และมาตรฐาน ได้แก่ การเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานผลิตชีววัตถุ งานทดสอบและงานวิจัย การบำรุงรักษาเชิงป้องกัน การรักษาสิ่งแวดล้อม ระบบลูกโซ่ความเย็น เป็นต้น
การบริหารทั่วไป ระบบสารสนเทศและการบริหารทรัพยากรบุคคล	เสริมสร้างการเพิ่มศักยภาพและสมรรถนะบุคลากรขององค์กรให้มีความเชี่ยวชาญพร้อมเข้าสู่การเป็นประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน
	ใช้ระบบสารสนเทศตามนโยบาย Thailand ๔.๐ในการดำเนินการบริหารทรัพยากรบุคคล
องค์ความรู้ การวิจัยด้านชีวภัณฑ์ และความร่วมมือระหว่างองค์กร	วิจัยและพัฒนาชีวภัณฑ์สัตว์ให้ได้ตรงตามความต้องการ
	เป็นศูนย์กลางความร่วมมือด้านวิชาการเกี่ยวกับชีวภัณฑ์สัตว์ทั้งภายในและต่างประเทศ

2.4 เป้าหมายหลัก

1. พัฒนาโรงงานผลิตวัคซีนตามมาตรฐาน GMP
2. บริหารผลิตภัณฑ์และลูกค้าบนข้อมูลพื้นฐานที่ถูกต้อง
3. การพัฒนาทุนมนุษย์
4. เพิ่มประสิทธิภาพการบริหารงานวิจัยและพัฒนาชีวภัณฑ์สัตว์
5. พัฒนาระบบสารสนเทศ

2.5 ค่านิยม

V-SMART	ย่อมาจาก
V : Validity	ปฏิบัติงานด้วยความเที่ยงตรง ตรวจสอบได้
S ; Standard	ผลิตชีวภัณฑ์ตามมาตรฐาน
M : Mastery	ทำงานอย่างมืออาชีพ
A : Agility	คล่องตัวและพร้อมรับการเปลี่ยนแปลง
R ; Responsibility	มีความรับผิดชอบต่อสังคมและประเทศชาติ
T : Teamwork	มุ่งมั่นในการทำงานร่วมกัน

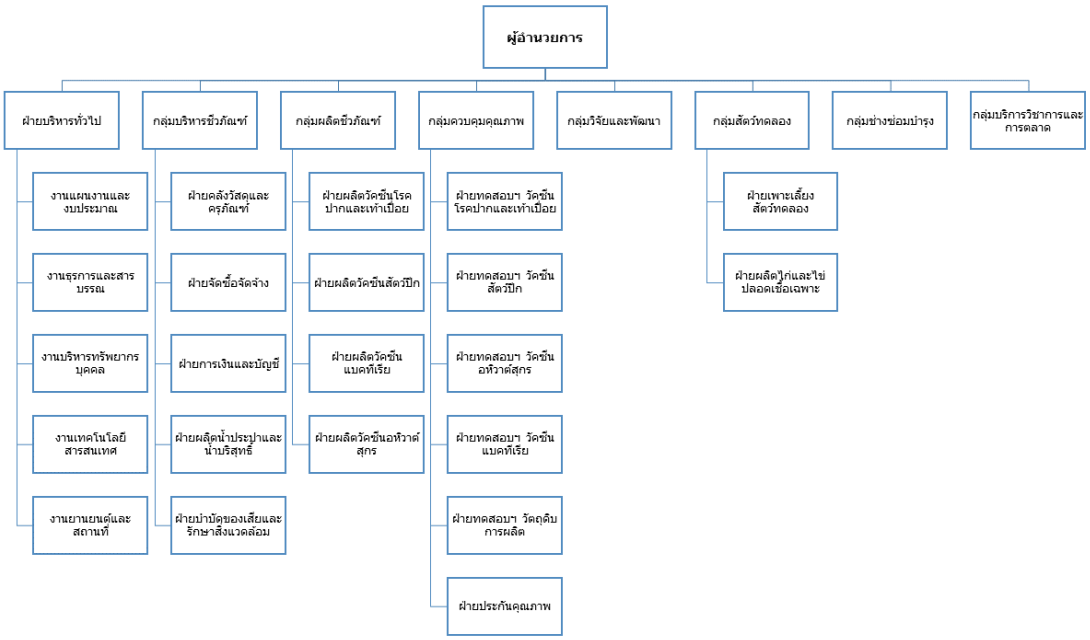
V-SMART หรือ We are smart หมายความว่า บุคลากรที่เกี่ยวข้องในเงินทุนหมุนเวียนเพื่อผลิตวัคซีนจำหน่ายทำงานร่วมกันในการผลิตชีวภัณฑ์สัตว์ตามมาตรฐาน ให้มีความคล่องตัว รับการเปลี่ยนแปลง มีความเที่ยงตรง ตรวจสอบได้ อย่างมีความเป็นมืออาชีพ และรับผิดชอบต่อสังคมและประเทศชาติ

2.6 นโยบาย

ผลิตวัคซีนดี มีมาตรฐาน ปริมาณเพียงพอ ตรงต่อเวลา รักษาสิ่งแวดล้อม

3. รูปแบบการจัดองค์กรและการบริหารงานขององค์กร

โครงสร้างการบริหาร



โครงสร้างการบริหารของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

ที่มา: http://biologic.dld.go.th

ตารางที่ 1 อัตรากำลังรวมปีงบประมาณ 2563

อัตรากำลังรวมปีงบประมาณ 2563		
ข้าราชการ ลูกจ้างประจำและพนักงานฯ		
ข้อมูล ณ วันที่ 6 พฤศจิกายน 2562		
ข้าราชการ		
ผู้อำนวยการสำนักฯ	1	อัตรา
นายสัตวแพทย์เชี่ยวชาญ (ว่าง 2 อัตรา ไปช่วยราชการ 1 อัตรา)	3	อัตรา
นายสัตวแพทย์ (มีจริง 31) (ไปช่วยราชการ 2 อัตรา) (ว่าง 1 อัตรา)	34	อัตรา
เภสัชกร	2	อัตรา
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์	9	อัตรา
สัตวแพทย์ (มีจริง 11) (ว่าง 1 อัตรา)	13	อัตรา
เจ้าพนักงานสัตวบาล	2	อัตรา
นายช่างเทคนิค (มีจริง 5) (ว่าง 3 อัตรา)	7	อัตรา
นักจัดการงานทั่วไป	2	อัตรา
เจ้าพนักงานธุรการ	11	อัตรา
เจ้าหน้าที่การเงินและบัญชี	1	อัตรา
รวม	88	อัตรา
ลูกจ้างประจำ		
ลูกจ้างประจำเงินงบประมาณ	67	อัตรา
ลูกจ้างประจำเงินทุนหมุนเวียนฯ (ปฏิบัติงานที่กองคลัง 3 อัตรา)	89	อัตรา
รวม	156	อัตรา
พนักงานราชการ		
นักงานราชการ	3	อัตรา
พนักงานเงินทุนหมุนเวียนฯ		
พนักงานเงินทุนหมุนเวียนฯ (มีอยู่จริง 136 คน) (กองคลัง 6 อัตรา, กลุ่มตรวจสอบ 2 อัตรา) (ว่าง 1 อัตรา)	144	อัตรา
รวมอัตรากำลังทั้งสิ้น	391	อัตรา

2.7 วัคซีนที่สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ผลิต มีดังนี้

ลำดับที่	วัคซีน
1.	วัคซีนแบลคเลก
2.	วัคซีนเฮโมรายิกเซพติซีเมีย
3.	วัคซีนแอนแทรกซ์
4.	วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับโค กระบือ แพะ แกะ
5.	วัคซีนบรูเซลโลซีส
6.	วัคซีนรวมนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่
7.	วัคซีนกาฬโรคเป็ด
8.	วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อเป็น สเตรนลาโซต้า
9.	วัคซีนฝีดาษไก่
10.	วัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่
11.	วัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่
12.	วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกร
13.	วัคซีนอหิวาต์สุกร
14.	แอนติเจนบรูเซลโลซีส ชนิดทดสอบบนแผ่นกระจก
15.	แอนติเจนบรูเซลโลซีส ชนิดทดสอบในหลอดแก้ว
16.	แอนติเจนบรูเซลโลซีส ชนิดทดสอบโรสเบงกอล
17.	แอนติเจนอุจจาระขาว

4. พนักงานที่ปรึกษา และตำแหน่งของพนักงานที่ปรึกษา

นางสาวอารีรัตน์ แพงเพ็ง ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

5. ตำแหน่งและลักษณะงานที่นักศึกษาได้รับมอบหมายให้รับผิดชอบ

ผู้ช่วยนักวิจัย (กลุ่มวิจัยและพัฒนา และฝ่ายทดสอบวัคซีนแบคทีเรีย) โดยมีหน้าที่ทั่วไปดังนี้

1. เตรียมวัสดุ อุปกรณ์ปราศจากเชื้อตามพื้นฐานงานวิทยาศาสตร์ เช่น การเตรียมและทำความสะอาดวัสดุเครื่องแก้ว พลาสติก และทำให้ปราศจากเชื้อและการกำจัดเชื้อ ปฏิบัติงาน

และดูแลรักษาเครื่องมือวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เช่น เครื่อง autoclave, เครื่องวัดกรด-ด่าง, ตู้เพาะเชื้อ, ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabinet) เป็นต้น

2. การแยกไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ให้บริสุทธิ์ และเข้มข้นด้วยวิธี sucrose gradient, วิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE และตรวจสอบโปรตีนของอนุภาคไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ด้วยวิธี Western blot

6. สถานที่ปฏิบัติงาน

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยและพัฒนา อาคารแบคทีเรีย (ศ.รำพึง) สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

7. ระยะเวลาที่ปฏิบัติงาน

เริ่มปฏิบัติงานตั้งแต่วันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ถึง 6 มีนาคม พ.ศ. 2563 รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 4 เดือน (16 สัปดาห์)

8. วัตถุประสงค์ของการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

1. เตรียมความพร้อมของนักศึกษาก่อนที่จะเข้าสู่ระบบการทำงานในด้านการพัฒนาอาชีพ (Career Development) การเสริมทักษะและประสบการณ์
2. เพิ่มเติมประสบการณ์ทางด้านวิชาการ วิชาชีพ และการพัฒนาตนเองแก่นักศึกษา
3. เปิดโอกาสให้สถานประกอบการทั้งภาคเอกชนและภาครัฐได้มีส่วนร่วมในการพัฒนาคุณภาพบัณฑิต
4. ให้เกิดการพัฒนาหลักสูตรและการเรียนการสอนที่ทันสมัยได้มาตรฐานและตรงกับความต้องการของแรงงานมากยิ่งขึ้น
5. เพื่อเป็นการส่งเสริมและสร้างความสัมพันธ์ระหว่างมหาวิทยาลัยกับสถานประกอบการ โดยผ่านนักศึกษาผู้ไปปฏิบัติงาน ณ สถานประกอบการนั้น ๆ

9. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับประสบการณ์ตรงตามสาขาวิชาที่เรียนเพิ่มเติมจากการเรียนด้านทฤษฎีในห้องเรียน
2. เกิดความร่วมมือกับสถานประกอบการในการพัฒนาบุคลากรร่วมกันใน รูปแบบต่าง ๆ เช่น การแลกเปลี่ยนประสบการณ์ การอบรม การนำกรณี ตัวอย่างมาใช้ในการเรียนการสอน
3. เกิดการเรียนรู้และพัฒนาตนเอง รู้จักทำงานร่วมกับผู้อื่น มีความรับผิดชอบ มีความมั่นใจ ในตนเองมากขึ้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พึงประสงค์ของสถานประกอบการ
4. ได้พบปัญหาต่าง ๆ ที่แท้จริงในการทำงาน และคิดค้นวิธีการแก้ปัญหาเฉพาะหน้าได้อย่างถูกต้อง จากประสบการณ์ในการปฏิบัติงานจริงในสถานประกอบการ
5. เกิดทักษะการสื่อสารข้อมูลการทำงานภายในสถานประกอบการ (Communication Skill)
6. ทราบความถนัดของตนเองได้มากขึ้น
7. สำเร็จการศึกษาเป็นบัณฑิตที่มีศักยภาพในการทำงาน และมีโอกาสได้รับการเสนองานก่อนสำเร็จการศึกษา

10. งานที่ได้ปฏิบัติ

1. เตรียมวัสดุ อุปกรณ์ปราศจากเชื้อตามพื้นฐานงานวิทยาศาสตร์

เช่น การเตรียมและทำความสะอาดวัสดุเครื่องแก้ว พลาสติก และทำให้ปราศจากเชื้อและการกำจัดเชื้อ ปฏิบัติงานและดูแลรักษาเครื่องมือวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ได้แก่ เครื่อง autoclave, เครื่องวัดกรด-ด่าง, ตู้เพาะเชื้อ, ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabinet), ตู้อบลมร้อน เป็นต้น

2. การแยกไวรัสโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ให้บริสุทธิ์และเข้มข้นด้วยวิธี Sucrose gradient

มีขั้นตอนในการปฏิบัติงานดังนี้

1.1 เตรียมสารละลาย Sucrose gradient 20%-60% ปริมาตร 100 ml. ละลายด้วย TNE buffer (Tris-buffered saline 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.2 เชื้อไวรัส Infectious bronchitis virus (IBV) นำมาฉีดเข้าทาง allantoic cavity ในไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อ อายุ 9-11 วัน โดยทำการฉีดเชื้อไวรัสปริมาณ $10^{3.75}$ fifty percent embryo

infective dose (EID50) ฟองละ 0.1 ml บ่มที่ตู้อุณหภูมิ 37ºC ความชื้น 55-60% แล้วนำไปฟักต่อ 7 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส หลังจากนั้นทำการเก็บ allantoic fluid ที่มีเชื้อ IBV

1.3 นำตัวอย่างน้ำไวรัสที่เก็บจาก allantoic fluid ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Sigma, 3K-18) ความเร็ว 7,000 xg ที่อุณหภูมิ 4ºC นาน 15 นาที

1.4 เก็บส่วนใสที่ได้ใส่หลอด

1.5 นำส่วนใสปริมาตร 2 ml ไปปั่นเหวี่ยงผ่าน 20%(w/v) sucrose gradient ปริมาตร 10 ml ด้วยเครื่อง ultracentrifuge แบบ swing type model SW 41 Ti (Beckman, XL a) ความเร็ว 98,000 xg ที่อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.6 ละลายตะกอนด้วย TNE ปริมาตร 500 µl

1.7 นำตัวอย่างปริมาตร 2 ml ที่ได้ไปปั่นผ่าน 30-50%(w/v) sucrose gradient ชั้นละ 5 ml ปั่นเหวี่ยงที่ 98,000 xg อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 3.30 ชั่วโมง

1.8 เก็บตัวอย่างวงแหวนที่อุณหภูมิ 4ºC

3. วิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE

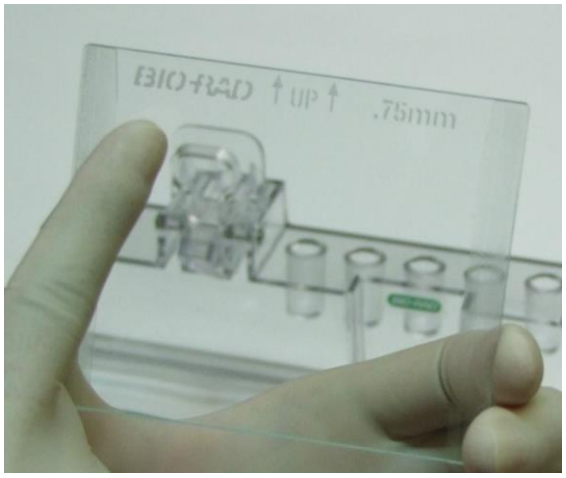
2.1 ตัวอย่างไวรัสใน allantoic fluid, ตัวอย่างไวรัสที่ผ่าน 20% sucrose และตัวอย่างตะกอนวงแหวนไวรัสที่ผ่าน 30-50% sucrose ตัวอย่างละ 20 µl ผสมให้เข้ากันกับสีย้อม 1X laemmli sample buffer ในอัตราส่วน 2:1

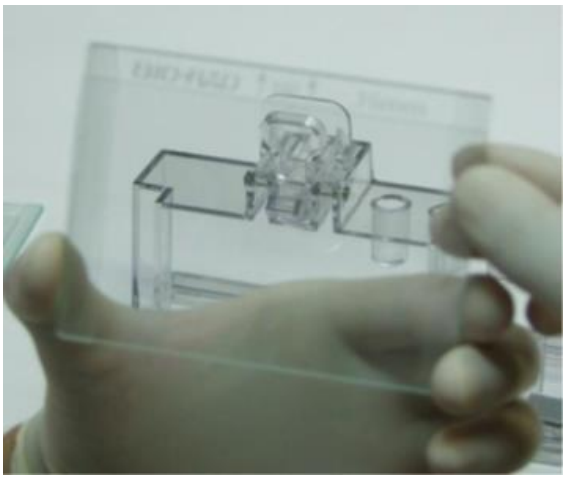
2.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที

2.3 เตรียมอุปกรณ์สำหรับเตรียมเจล

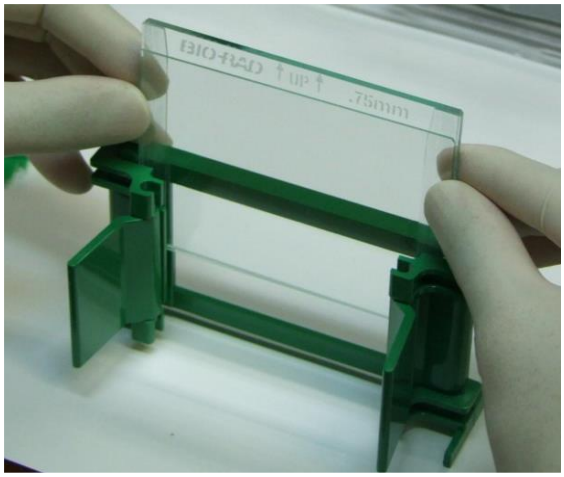
2.3.1 ทำความสะอาดแผ่นกระจก (glass plates), ที่วาง (casting stand), กรอบวาง(casting frames) ให้สะอาดและแห้งก่อนทำการประกบแผ่นกระจก

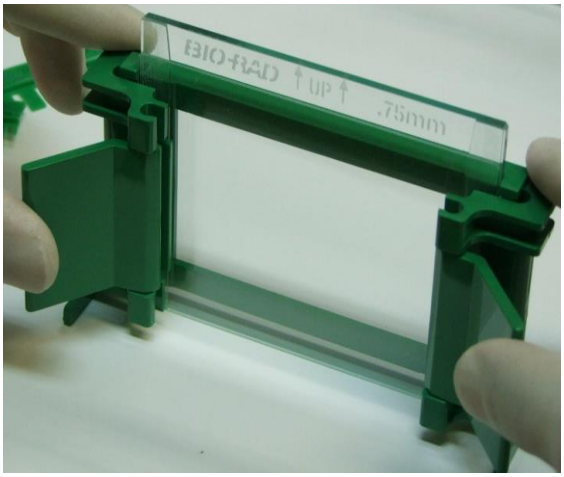
2.3.2 ประกบแผ่นกระจก 2 แผ่น โดยวางกระจกแผ่นสั้นไว้บน spacer plate ซึ่งมีความหนา 0.75 mm โดยตั้งแผ่นกระจกที่มีลูกศรขึ้นไว้ด้านบน



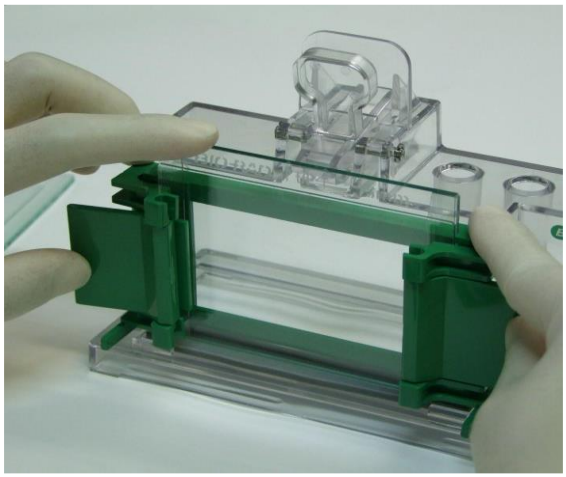
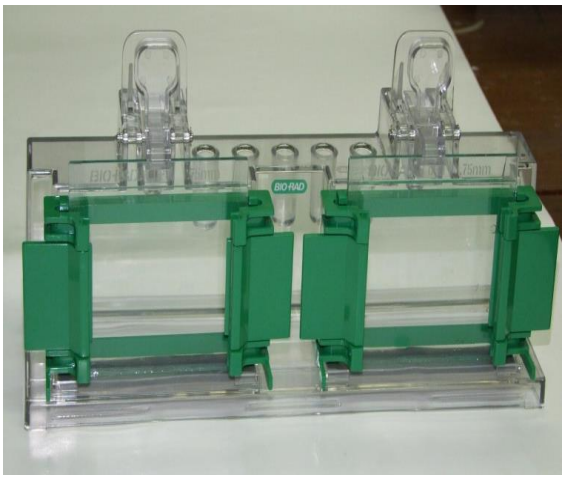


2.3.3 นำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นวางลงใน Casting Frame โดยวางแผ่นสั้น (Short Plate) ไว้ด้านหน้า Casting Frame ให้ปลายแผ่นกระจกทั้งสองเสมอกันเพื่อป้องกันการรั่ว จากนั้นค่อยๆ กดล็อคด้วย Pressure Cams ด้วยความระมัดระวัง เพราะกระจกอาจแตกจากการประกบไม่เข้ารูป

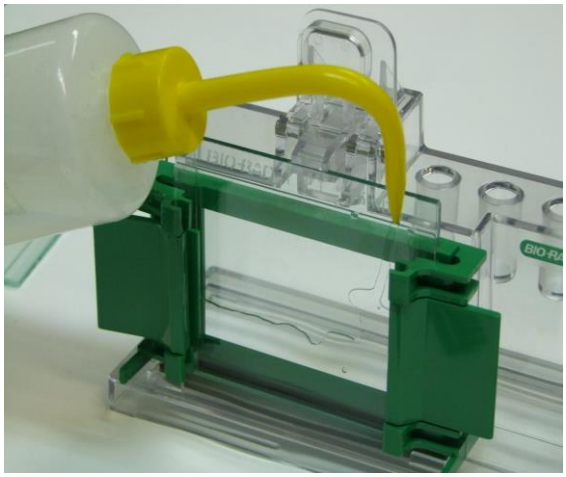




2.3.4 นำ gel cassette assembly ที่ประกอบใน casting frame วางบน casting stand ที่มี gray casting stand gasket รองอยู่ที่ด้านล่าง โดยกดส่วน spring loaded lever ให้gel cassette assembly แนบสนิทและตั้งฉากกับ casting stand

2.3.5 เช็คการรั่วของแผ่นกระจก โดยใช้น้ำกลั่นทดสอบการรั่วของแผ่นกระจก ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที ถ้ารั่วจะมีการไหลของน้ำออกจากแผ่นกระจก โดยสังเกตระดับน้ำ หากมีการรั่วไหลเกิดขึ้นให้ทำการประกบกระจกใหม่

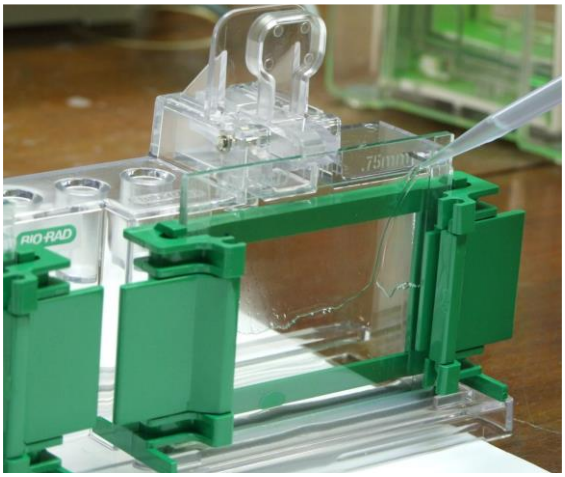


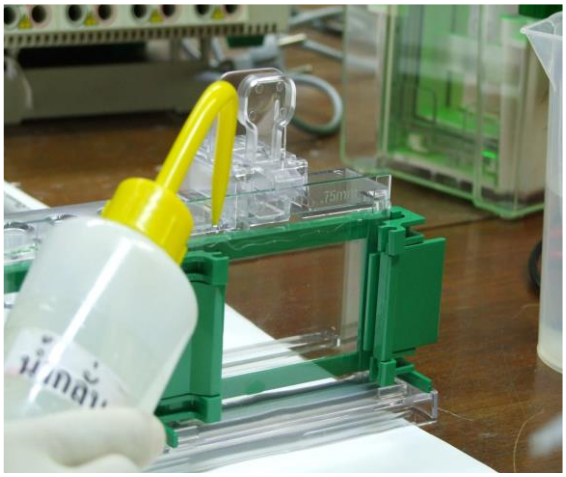
2.4 เตรียมเจลสำหรับวิเคราะห์ ประกอบด้วย Resolving gel เตรียมดังตาราง

Resolving gel		
Component	Volume (ml) by gel Percentage	
	10%	10%
H_2O	4.0 ml	2.0 ml
30% Acrylamide	3.3 ml	1.65 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	1.25 ml
10% (w/v) SDS	100 µl	50 µl
* 10% (w/v) APS	100 µl	50 µl
* TEMED	10 µl	5 µl
Total volume	10 ml	5 ml

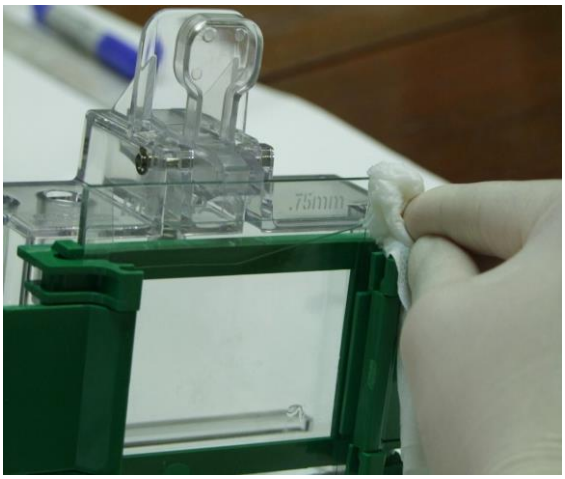
หมายเหตุ *ใส่ขั้นตอนสุดท้าย เพราะจะทำให้เจลแข็ง

2.5 หยอด resolving gel ที่เตรียมไว้ลงในชุดทดสอบสำหรับเตรียมเจล ให้ห่างจากขอบบนของแผ่นกระจกประมาณ 1.5 เซนติเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศแล้วค่อยๆ เติมน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจลซึ่งน้ำกลั่นจะทำให้ผิวหน้าเจลเรียบสม่ำเสมอ





2.6 ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว แล้วค่อยๆ เทน้ำกลั่นที่อยู่ส่วนบนออก

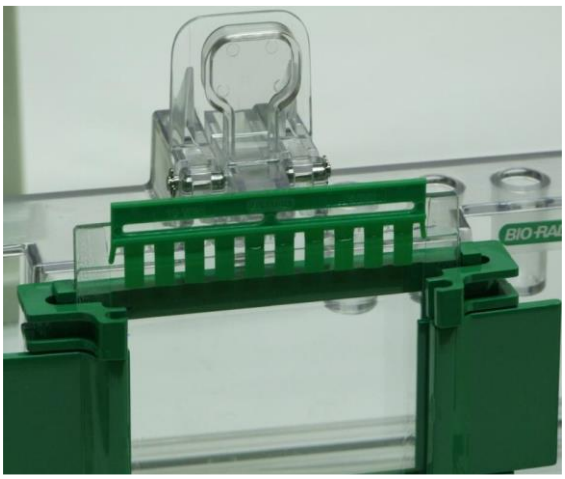


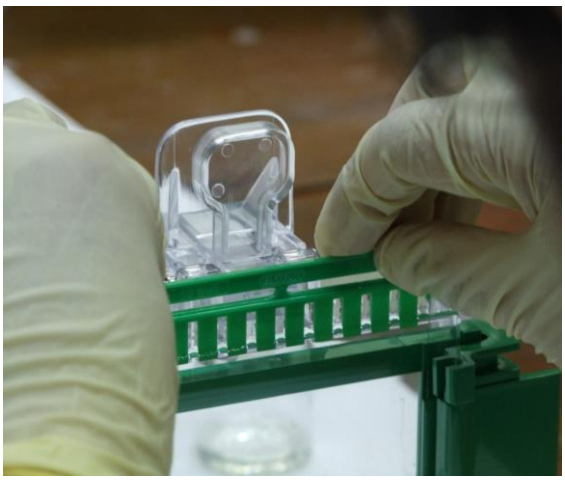
2.7 เตรียมชั้น Stacking gel ดังตาราง

Stacking gel			
Component	Volume (ml)		
H_2O	6.0 ml	3.0 ml	1.5 ml
30% Acrylamide	1.3 ml	650 µl	325 µl
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	1.25 ml	625 µl
10% (w/v) SDS	100 µl	50 µl	50 µl
* 10% (w/v) APS	50 µl	25 µl	25 µl
* TEMED	10 µl	5 µl	5 µl
Total volume	10 ml	5 ml	2.5 ml

หมายเหตุ *ใส่ขั้นตอนสุดท้าย เพราะจะทำให้เจลแข็ง

2.8 หยอด stacking gel ที่เตรียมไว้ลงบน resolving gel ให้ห่างจากขอบกระจกประมาณ 3 มิลลิเมตร แล้ววาง comb ลงใน stacking gel ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวค่อยๆ ดึง comb ออกแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น



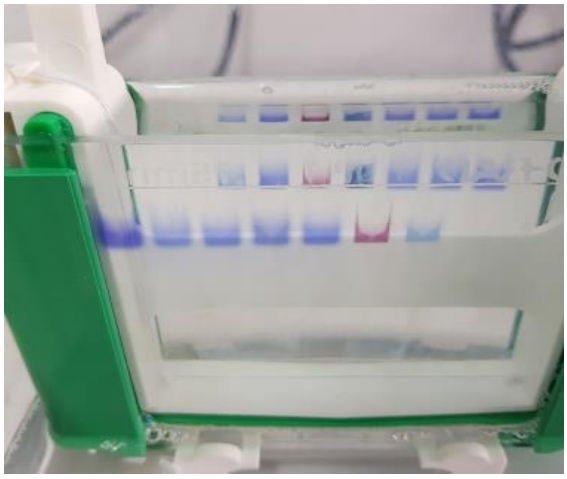


2.9 การต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซิสและการหยอดสารมาตรฐานและตัวอย่าง

2.8.1 เติม 2X running buffer ลงใน inner chamber ประมาณ 130 มิลลิเมตร และใน mini tank ประมาณ 170 มิลลิเมตร

2.8.2 วาง sample loading guide บน inner chamber ระหว่างแผ่นเจลทั้งสอง

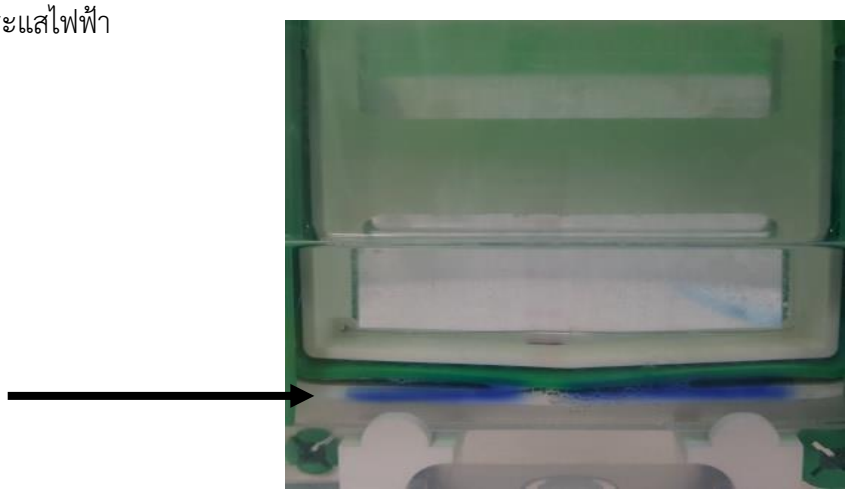
2.8.3 ค่อยๆหยอดโปรตีนมาตรฐานและตัวอย่างลงในหลุมของ stacking gel โดยใช้ auto pipette ตัวอย่างละ 10 µl และโปรตีนมาตรฐาน (marker) 4 µl



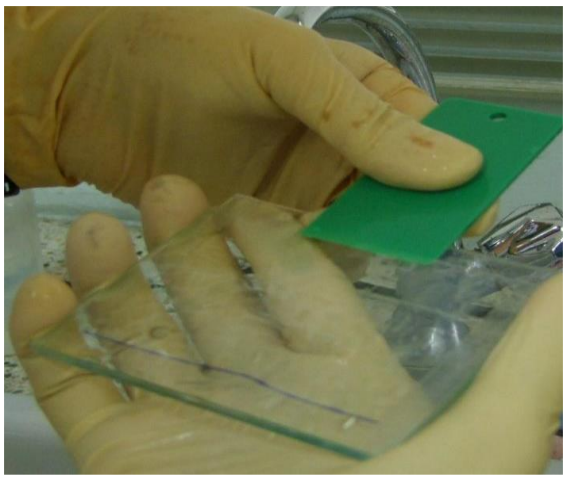
2.8.4 นำ sample loading guide ออก แล้วปิดฝา mini tank ให้ขั้วไฟฟ้าตรงกันโดยสังเกตสีของขั้วสายไฟให้ตรงกัน

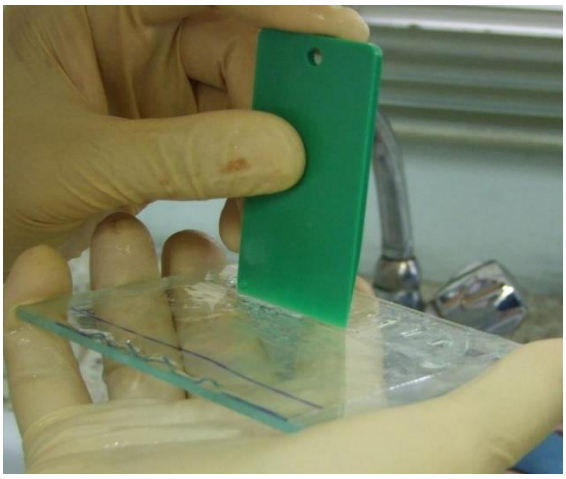
2.8.5 เปิดเครื่อง set voltage โดยให้มีค่าความต่างศักย์เป็น 90 โวลต์ 200 mA ตั้งเวลาในการเดินเครื่องนาน 80 นาที (หรือแล้วแต่ running condition ของตัวอย่าง)

2.8.6 สังเกตเห็นสีย้อมเคลื่อนที่ลงมาสุดขอบกระจก ปิดสวิทช์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

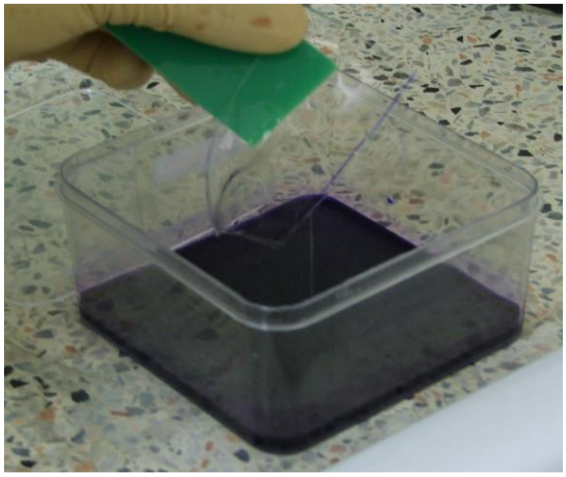


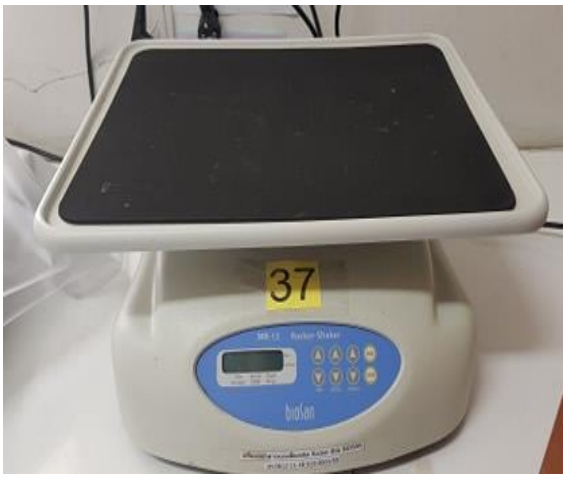
2.8.7 แกะแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก โดยใช้ plastic gel releaser ช่วยในการแยกแผ่นกระจกสองแผ่นออกจากกัน ตัดส่วน stacking gel ทิ้ง





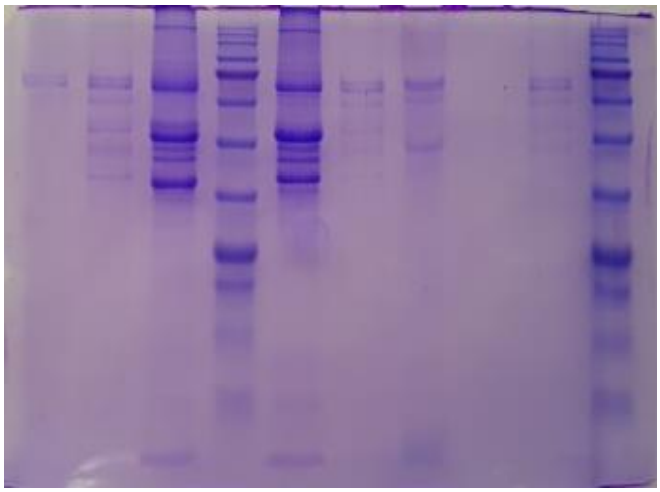
2.8.8 นำไปย้อมสี Coomassie Brilliant blue ประมาณ 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าสารแบบเอียงชนิด rocker shaker

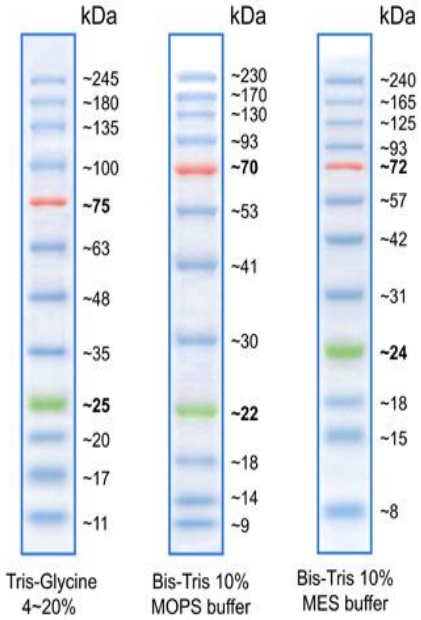




2.8.9 ล้างสีด้วย destain solution I จนพื้นเจลใส และเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจน

2.8.10 ถ่ายภาพ และบันทึกผลการวิเคราะห์หา molecular weight ของตัวอย่างโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Marker)





4. ตรวจสอบโปรตีนของอนุภาคไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ด้วยวิธี Western blot

3.1 แช่ filter pad และ nitrocellulose ใน 1x transfer buffer (เย็น)

3.2 ทำการย้าย 10% polyacrylamide gel จากขั้นตอน SDS-PAGE และวางลงบน nitrocellulose membrane ที่มีขาดรูพรุน 0.2 µm

3.3 ประกอบเครื่องส่งถ่ายโปรตีน Semi dry blotting

3.4 ปล่อยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 15 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

3.5 เมื่อครบเวลาล้าง nitrocellulose membrane ด้วย washing buffer (TBST; 50 mM Tris-base, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) ปริมาตร 30 ml บ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.6 เท washing buffer ออก

3.7 เติม blocking buffer ซึ่งประกอบด้วย TBST และ 5% skim milk ปริมาตร 30 ml หรือให้ท่วมแผ่น membrane บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.8 เท blocking buffer ทิ้ง

3.9 เติม primary antibody ที่เจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1:50 ซึ่งเป็นแอนติซีรั่มของไก่ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA ปริมาตร 25 ml หรือให้ท่วมแผ่น membrane

3.10 บ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.11 ล้างด้วย western blot washing buffer ปริมาตร 30 ml บ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.12 เติม secondary antibody โดยใช้ anti chicken IgG ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (Sigma) ที่เจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1:1,000

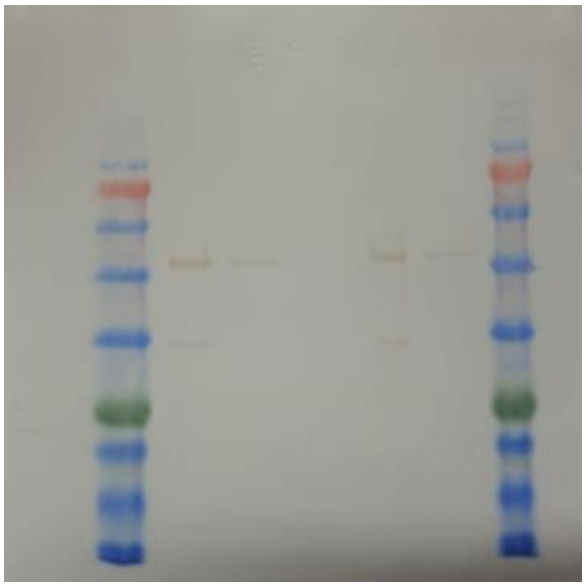
3.13 บ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.14 ล้างด้วย western blot washing buffer ปริมาตร 30 ml บ่มบน rocking plateform ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.15 บ่มด้วย TBS ปริมาตร 10 ml นาน 5 นาที

3.16 ตรวจสอบปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดสด้วย 3,3-diaminobenzidine (DAB) ปริมาตร 30 ml

3.17 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าจะสังเกตเห็นแถบสีน้ำตาลเข้ม ของโปรตีนเกิดขึ้นแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา



ประวัติผู้จัดทำ

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุจิตรา รักกุศล
รหัสนักศึกษา	5940213115
ที่อยู่	61/61 ซอยท่ามะนาว 1 ถนนปากช่อง-ลำสมพุง ตำบลปากช่อง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 30130
การศึกษา	จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น และระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนปากช่อง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันกำลังศึกษาระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา