

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การระบุชนิดของไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 โดยใช้
เทคนิคพีซีอาร์และอาร์เอฟแอลพี

ผู้เขียน นางสาวมณิชนา ภูววัง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการตรวจหาชนิดของ Herpes Simplex Virus (HSV) โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดยได้ทำการออกแบบ primer เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่บริเวณ DNA polymerase gene พบว่าได้ PCR product ขนาด 1350 bp เมื่อนำ PCR product ของ HSV-1F และ HSV-2G สายพันธุ์มาตรฐาน มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมคือ *TaqI* และ *RsaI* พบว่าเมื่อตัด PCR product ของ HSV-1F ด้วย *TaqI* จะได้แถบ DNA จำนวน 6 แถบขนาด 28, 150, 195, 226, 366 และ 385 bp และเมื่อตัด HSV-2G จะได้แถบ DNA จำนวน 6 แถบขนาด 28, 58, 150, 168, 195 และ 751 bp ส่วนการตัด HSV-1F ด้วย *RsaI* จะได้แถบ DNA จำนวน 5 แถบ ขนาด 90, 201, 270, 309 และ 480 bp และเมื่อตัด HSV-2G จะได้แถบ DNA จำนวน 8 แถบ ขนาด 81, 90, 99, 102, 189, 222, 258 และ 309 bp เมื่อเปรียบเทียบแถบ DNA ของไวรัสตัวอย่างจำนวน 35 ตัวอย่างหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด กับไวรัสมาตรฐานพบว่าไวรัส 1 ตัวอย่างมีแถบ DNA เหมือน HSV-2G และ 34 ตัวอย่าง มีแถบ DNA คล้ายกับ HSV-1F โดยเมื่อตัดด้วย *TaqI* จะได้แถบ DNA จำนวน 5 แถบขนาด 28, 150, 195, 226 และ 751 bp ส่วนการตัดด้วย *RsaI* จะได้แถบ DNA จำนวน 7 แถบ ขนาด 90, 101, 100, 270, 309 และ 480 bp จึงทำการหาลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของไวรัสตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าลำดับเบสของ DNA polymerase gene ตำแหน่งที่ 2451 สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* เพิ่มอีก 1 ตำแหน่ง และ ตำแหน่งที่ 3288 ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* ดังนั้น HSV-1 ที่แยกได้ในประเทศไทยจึงมีรูปแบบการตัด DNA แตกต่างจาก HSV-1F แต่คล้ายกับ HSV-1 สายพันธุ์ SC16

(accession no. X04771) การใช้เทคนิค PCR และ RFLP ในการศึกษาถึงมีประโยชน์ในการบ่งบอกชนิดของเชื้อ HSV ได้ถึงระดับ species และศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส



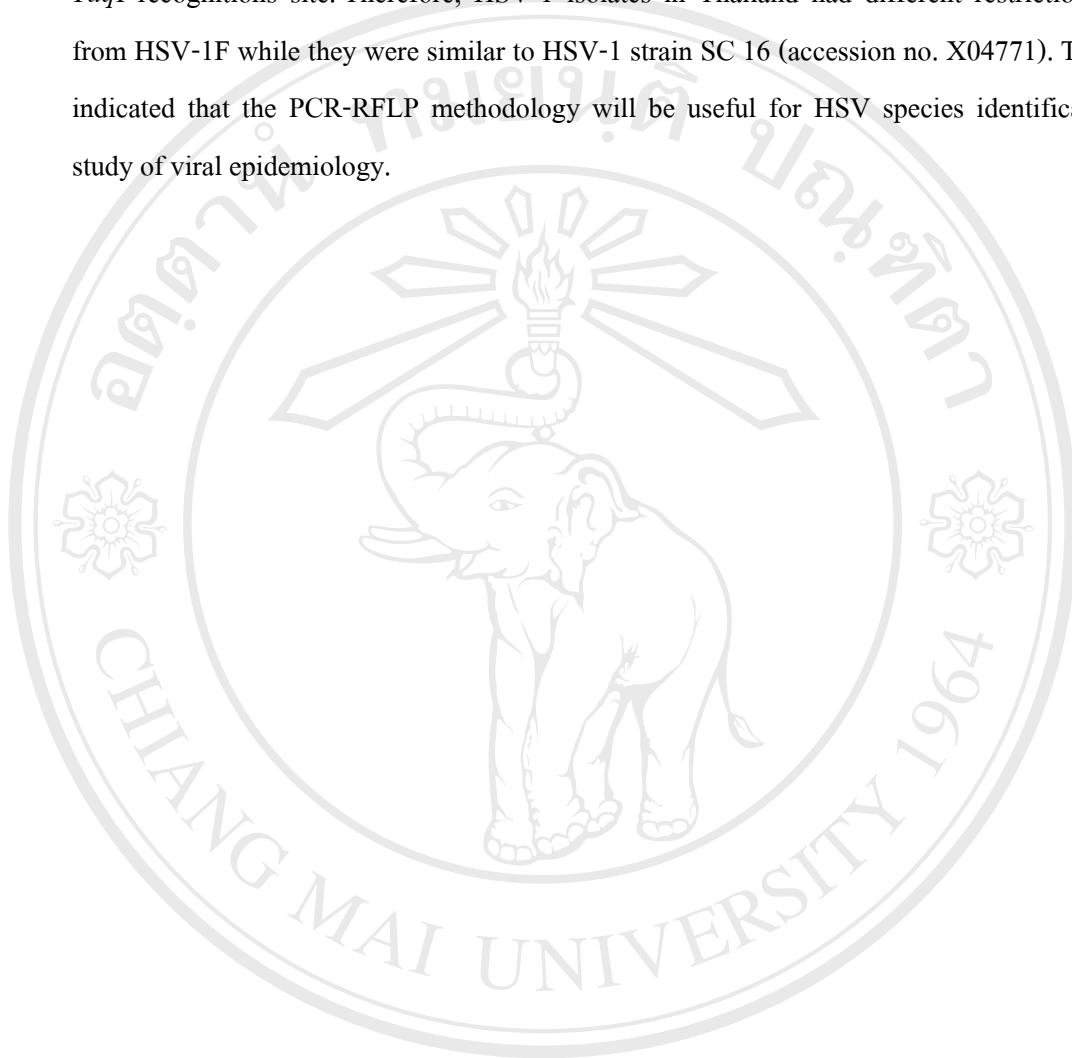
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

| | |
|-----------------------|---|
| Thesis Title | Identification of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 using PCR and RFLP Techniques |
| Author | Miss Manichaya Phuwang |
| Degree | Master of Science (Biology) |
| Thesis Advisor | Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua |

ABSTRACT

A polymerase chain reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) based assay for detection and species identification of Herpes Simplex Viruses (HSVs) were performed in this study. HSV DNA polymerase genes were multiplied using specific designed primers to generate 1350 base pair-size amplicons. PCR products of HSV-1F and HSV-2G were then cleaved by appropriate restriction enzymes; *TaqI* and *RsaI*. After cleavage PCR product of HSV-1F by *TaqI*, six DNA fragments of 28, 150, 195, 226, 366 and 385 bp were obtained, and six DNA fragments of 28, 58, 150, 168, 195 and 751 bp were generated from HSV-2G. Five DNA fragments of 90, 201, 270, 309 and 480 bp, and eight DNA fragments of 81, 90, 99, 102, 189, 222, 258 and 309 bp were generated from PCR products of HSV-1F and HSV-2G by *RsaI* cleavage. When restriction patterns of 35 viral samples were compared with the standard HSV-1F and HSV-2G, the results showed that restriction pattern of 1 sample was exactly the same as HSV-2G whereas restriction patterns of 34 samples were similar to HSV-1F as five DNA fragments of 28, 150, 195, 226 and 751 bp were obtained after analysis these HSV-1 samples by *TaqI* and six DNA fragments of 90, 101, 100, 270, 309 and 480 bp were generated by *RsaI*. Then, DNA polymerase genes of five HSV-1 samples were sequenced. It was found that nucleotide position 2451 contained one more *RsaI* recognition site and nucleotide position 3288 did not have

TaqI recognitions site. Therefore, HSV-1 isolates in Thailand had different restriction pattern from HSV-1F while they were similar to HSV-1 strain SC 16 (accession no. X04771). This study indicated that the PCR-RFLP methodology will be useful for HSV species identification and study of viral epidemiology.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved