

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

เปรียบเทียบผลการทำ PCR กับ ผลการทำ ELISA โดยแสดงผลเป็นร้อยละ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ : HBV (PreS1, PreS2, S gene) และ HCV (Core และ NS5)

- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
- ทำการจำแนก genotype โดยการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบ แต่ละชนิด ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST และ โปรแกรม Genotyping tool
- ทำการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความต่างของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน ด้วยวิธี cluster analysis โดยใช้โปรแกรม Clustal X Ver3ion 1.83 และ Bioedit version 7.0.4.1 เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบทวีเคราะห์ ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)
- สร้างรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram หรือ phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 1.83 และ MEGA3.1 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบทวีศึกษาแต่ละ genotype ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)
- วิเคราะห์คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (genetic distance) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของต่างประเทศที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม เพื่อหาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม MEGA3.1
- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
- ทำการจำแนก subtype โดยการแปลรหัสพันธุกรรมในส่วนที่ศึกษาให้เป็นกรดอะมิโน จากนั้นดูลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่สนใจศึกษา
- เปรียบเทียบผลจากการทำกรดอะมิโนในตำแหน่งที่สนใจศึกษา

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ทำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยการตัด gel ในส่วนแถบ DNA ที่ต้องการจาก gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Perfect Gel Cleanup kit แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลผลิตที่ได้ 5 µl ทำการตรวจด้วย gel electrophoresis อีกครั้งหนึ่งว่าได้ชิ้นส่วน DNA

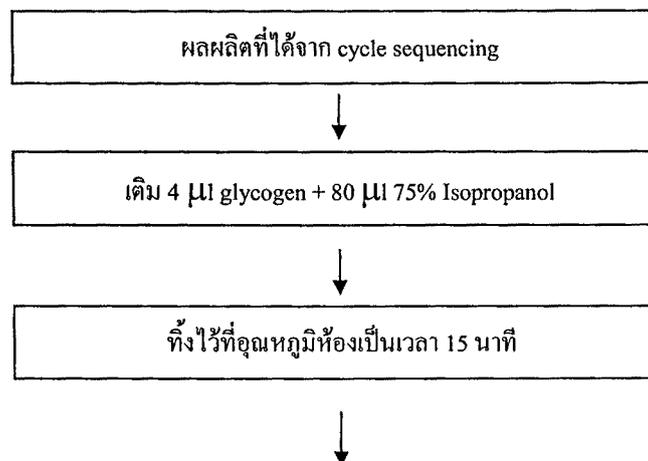
ที่ต้องการหรือไม่และเพื่อตรวจสอบว่าไม่มี DNA อื่นเจือปน หลังจากนั้นจึงนำผลผลิตที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาทำ cycle sequencing การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นจะใช้ forward primer เพื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่ต้องการ โดยผสมสารที่ใช้ทำ cycle sequencing ดังตารางที่ 8

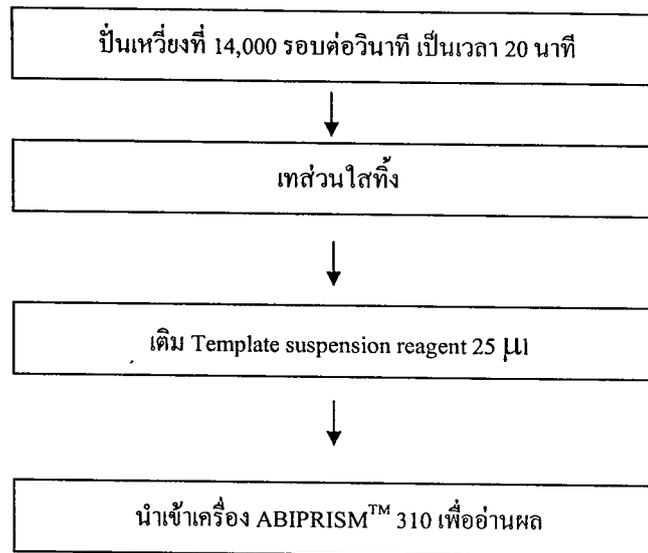
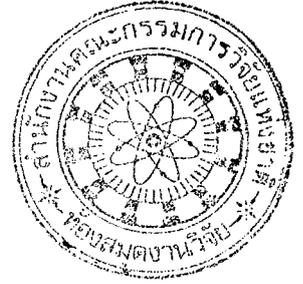
ตารางที่ 8 แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ cycle sequencing

สารละลาย	ปริมาณ (μl)
Distilled water	5.33
5X buffer	2
BigDye RR-100	4
Primer (ในช่วงยีนที่ต้องการ)	0.67
ผลผลิตที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว	8
Total volume	20

หลังจากผ่านการทำ cycle sequencing แล้ว นำผลผลิตที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการตกตะกอนเพื่อนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABIPRISM™ ดังนี้

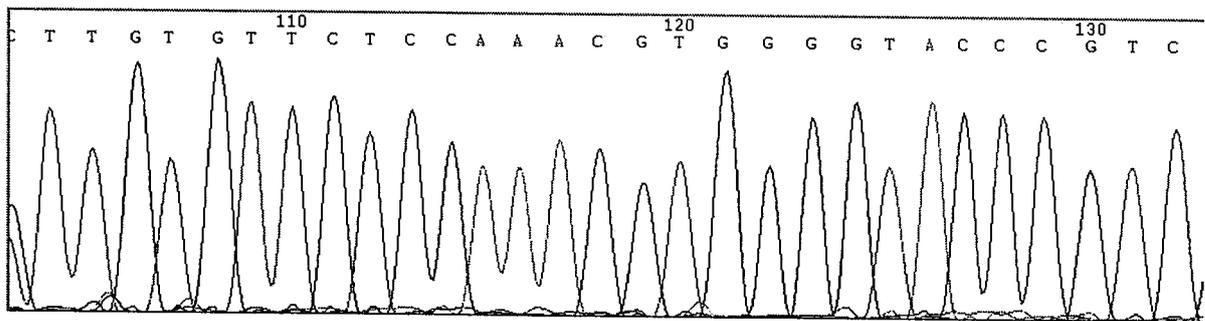
แสดงขั้นตอนการตกตะกอนที่ได้จากการเข้า cycle sequencing





ทำการอ่านผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 เพื่อวิเคราะห์ Chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ผลต่อไป (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างของ Chromatogramme ของ gene ที่ต้องการศึกษาในการทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์



1. เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างระดับ โมเลกุลระหว่างสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และสายพันธุ์ที่พบในต่างประเทศ โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์วิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) โดยใช้ programme สำเร็จรูป (free programme) จาก website เช่น DNASTAR, Clustal X, BioEdit และ BLAST เป็นต้น โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์อื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast (รูปที่ 2)

รูปที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์อื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF477491.3	Hepatitis B virus TbcC15 surface protein gene, complete cds	2111	2111	100%	0.0	100%
AF477490.2	Hepatitis B virus NC15 surface protein gene, complete cds	2097	2097	100%	0.0	99%
AF477487.3	Hepatitis B virus NngchaiC16 surface protein gene, complete cds	2069	2069	100%	0.0	99%
A1131572.1	Hepatitis B virus complete genome, isolate gib160	2066	2066	100%	0.0	99%
AF477483.2	Hepatitis B virus GemezC14 surface protein gene, complete cds	2053	2053	99%	0.0	98%
AF477485.2	Hepatitis B virus JackC20 surface protein gene, complete cds	2048	2048	100%	0.0	98%
A1131570.1	Hepatitis B virus complete genome, isolate gib731	2039	2039	100%	0.0	98%
AF274495.2	Hepatitis B virus surface protein gene, complete cds	2026	2026	99%	0.0	98%
AF477489.3	Hepatitis B virus Sbooc15 surface protein gene, complete cds	2021	2021	100%	0.0	98%
AF274496.2	Hepatitis B virus surface protein gene, complete cds	2017	2017	99%	0.0	98%
AF477492.2	Hepatitis B virus CamiC14 surface protein gene, complete cds	1975	1975	99%	0.0	97%
A1131573.1	Hepatitis B virus complete genome, isolate gib153	1826	1826	100%	0.0	94%
AF477486.2	Hepatitis B virus SianC13 surface protein gene, complete cds	1822	1822	100%	0.0	94%
A1131571.1	Hepatitis B virus complete genome, isolate gib645	1806	1806	99%	0.0	94%
AF477486.2	Hepatitis B virus MidnightR27 surface protein gene, complete cds	1795	1795	100%	0.0	94%
AF477494.2	Hepatitis B virus JackoR4 surface protein gene, complete cds	1795	1795	100%	0.0	94%
A1131574.1	Hepatitis B virus complete genome, isolate gib151	1795	1795	100%	0.0	94%
A1131575.1	Hepatitis B virus complete genome, isolate chimp82	1795	1795	100%	0.0	94%
AF275378.2	Hepatitis B virus g12 surface protein gene, complete cds	1790	1790	100%	0.0	93%
AF477492.2	Hepatitis B virus PkC2 surface protein gene, complete cds	1790	1790	100%	0.0	93%
AF477493.2	Hepatitis B virus JibR6 surface protein gene, complete cds	1786	1786	100%	0.0	93%
A1131568.1	Hepatitis B virus complete genome, isolate gib824	1781	1781	100%	0.0	93%
A1131569.1	Hepatitis B virus complete genome, isolate gib759	1775	1775	100%	0.0	93%
Y17565.1	Hepatitis B virus preS1, preS2 and S genes, isolate Mojo	1772	1772	100%	0.0	93%
Y17563.1	Hepatitis B virus preS1, preS2 and S genes, isolate Papa	1772	1772	100%	0.0	93%
F171414.1	Hepatitis B virus complete genome, isolate HAUNEA core protein and large S protein gene	1768	1768	99%	0.0	92%

- ทำการจำแนก genotype โดยการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของ enterovirus แต่ละ genotype ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST และ โปรแกรม Genotyping tool
- ทำการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ด้วยวิธี cluster analysis โดยใช้โปรแกรม Clustal X Ver3ion 1.83 และ Bioedit version 7.0.4.1 เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ enterovirus ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)
- สร้างรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram หรือ phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 1.83 และ MEGA3.1 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับนิวคลีโอไทด์ของ hepatitis viruses แต่ละ ชนิด และ genotype ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)