วิธีการวิจัย

โครงการนี้คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่า การเฝ้าระวังและตรวจติดตามไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่พบในฟาร์มนกกระทาในประเทศไทย จะทำให้ทราบระบาดวิทยาของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงนิเวศวิทยาของนกกระทาและสิ่งแวดล้อมภายในฟาร์ม เช่น ในนกกระทามีไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใดบ้าง และมีสายพันธุ์ H5N1 หรือไม่ มากน้อยเท่าใด และทำให้ทราบถึงช่องทางการรับเชื้อไวรัสของนกกระทา รวมถึงโอกาสในการแพร่เชื้อไวรัสให้แก่สัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์ นอกจากนี้ยังทำให้ทราบถึงโอกาสของการเกิดการแลกเปลี่ยนท่อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้ตั้งวัตถุประสงค์เชิงกิจกรรม ดังนี้

1. เก็บตัวอย่างนกกระทามีชีวิตจากฟาร์มที่เข้าร่วมการศึกษา
2. ตรวจพิสูจน์หาเชื้อไวรัส และตรวจหาสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธีการ embryonated egg inoculation, real time RT-PCR และ conventional RT-PCR
3. วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของแต่ละยีน ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากนกกระทา

วิธีดำเนินการวิจัยเพื่อที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวมี 3 ระยะ สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ประกอบด้วย

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างนกกระทามีชีวิตจากฟาร์มที่เข้าร่วมการศึกษา

ระยะที่ 2 ตรวจพิสูจน์หาเชื้อไวรัสและตรวจหาสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี embryonated egg inoculation, real time RT-PCR และ conventional RT-PCR

ระยะที่ 3 วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีนทั้งหมด ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากนกกระทา

ระยะที่ 1 เก็บตัวอย่างนกกระทามีชีวิตจากฟาร์มที่เข้าร่วมการศึกษา

สถานที่เก็บตัวอย่าง

สถานที่เก็บตัวอย่างเป็นฟาร์มนกกระทาในจังหวัดอยุธยา 1 ฟาร์ม และจังหวัดสุพรรณบุรี 1 ฟาร์ม เกณฑ์ในการคัดเลือกฟาร์มทั้ง 2 ฟาร์มประกอบด้วย 1) ฟาร์มทั้ง 2 ฟาร์มตั้งอยู่ในเขตจังหวัดที่เคยมีรายงานการระบาดของโรคไข้หวัดนก H5N1 2) ฟาร์มนกกระทาที่คัดเลือกเป็นฟาร์มที่อยู่ในพื้นที่ของการระบาด 3) ได้รับความร่วมมือจากเจ้าของฟาร์มในการศึกษาวิจัย

การเก็บตัวอย่างจากนกกระทา

การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างจากนกกระทาเดือนละ 40 ตัวอย่างต่อฟาร์ม เป็นระยะเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือน เมษายน พ.ศ. 2553 การเก็บตัวอย่างจากนกกระทาทำโดยใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (swab) ป้ายสิ่งคัดหลั่งจากช่องปากและทวารร่วม (oropharyngeal และ cloacal swab) ตัวอย่าง swab จะใส่ใน viral transport media (VTM) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่ 4 °C แล้วนำส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใน 24 ชั่วโมง ในกรณีที่ตัวอย่างไม่สามารถฉีดเข้าไข่ฟักได้ในทันที เนื่องจากปริมาณไข่ฟักไม่เพียงพอ หรืออายุของไข่ฟักยังไม่พร้อม ตัวอย่าง VTM เหล่านั้นจะถูกนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น -80 °C เพื่อรอการฉีดไข่ฟัก แล้วตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่อไป

ระยะที่ 2 ตรวจพิสูจน์หาไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี Embryonated egg inoculation, real time RT-PCR และ conventional RT-PCR

การตรวจพิสูจน์หาไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธีฉีดเข้าไข่ฟัก (embryonated egg inoculation)

การตรวจพิสูจน์หาเชื้อไวรัส โดยวิธีฉีดเข้าไข่ฟักจะทำในห้องปฏิบัติการที่มีระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (Biosecurity level 3, BSL3) ซึ่งตั้งอยู่ที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการตรวจพิสูจน์หาเชื้อไวรัสโดยวิธีฉีดเข้าไข่ฟัก ประกอบด้วย นำตัวอย่าง VTM มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนที่จะดูดส่วนใสไปฉีดเข้าไข่ฟัก ไข่ฟักที่ใช้เป็นไข่ที่ปลอดเชื้อและไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ที่อายุ 9-11 วัน ตรวจดูการมีชีวิตของตัวอ่อนโดยใช้ไฟส่องดูการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนและการคงอยู่ของหลอดเลือด จากนั้นกำหนดจุดที่จะใช้เจาะรูเพื่อฉีดตัวอย่างเข้าไปบริเวณช่องว่าง (air cell) โดยจะใช้ตัวอย่างปริมาณ 0.15-0.2 มิลลิลิตรต่อไข่ฟัก 1 ฟอง ตัวอย่าง 1 ตัวอย่างจะฉีดเข้าไข่ฟักอย่างน้อย 3 ฟอง หลังจากนั้นนำไข่ฟักไปฟักในตู้ฟักที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การตรวจไข่ฟักหลังจากฉีดตัวอย่างแล้ว จะส่องไฟเพื่อดูการเคลื่อนไหวของตัวอ่อน และการเจริญของหลอดเลือดทุกวัน ไข่ฟักที่ตายจะสังเกตเห็นการหยุดเคลื่อนไหวของตัวอ่อนและการเสื่อมสลายของหลอดเลือด ไข่ฟักที่ตายภายใน 24 ชั่วโมงหลังฉีดตัวอย่างเข้าไป จะต้องนำตัวอย่างนั้นมาฉีดไข่ฟักใหม่ ส่วนไข่ฟักที่ตายหลังจาก 24 ชั่วโมง และไข่ฟักที่ไม่ตายหลังครบ 72 ชั่วโมง จะเก็บ allantoic

fluid เพื่อตรวจคัดกรองหาเชื้อไวรัสโดยวิธี hemagglutination test (HA test) ตามวิธีที่ OIE แนะนำ (OIE, 2009)

การตรวจพิสูจน์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี real time RT-PCR

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HA test จะถูกนำมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) แล้วนำ RNA มาตรวจพิสูจน์และยืนยันไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ด้วยวิธี one step-real time RT-PCR โดยใช้ primer และ hydrolysis probe (TaqMan probe) ที่จำเพาะต่อยีน M ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Payungporn et al., 2004)

รายละเอียดการทำ one step-real time RT-PCR จะใช้ RNA template ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมลงในสารเคมี PCR ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 15 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย 10 uM specific primer ที่จำเพาะต่อยีน M ของเชื้อไวรัสปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร, 2.5 uM hydrolysis probe (TaqMan probe) 0.6 ไมโครลิตร, 2X Master mix (Invitrogen, CA, USA) 7.5 ไมโครลิตร, superscript III Taq polymerase and reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA) 0.3 ไมโครลิตร, 50mM $MgSO_4$ 1 ไมโครลิตร, nuclease free- water 1.3 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารเคมีที่ผสมไปใส่ในเครื่อง real time-Thermo cycler (RoterGen3000, Corbett Life Science, Australia) ภายใต้ภาวะควบคุมดังนี้ ที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}$C นาน 30 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตามด้วยอุณหภูมิ 95 $^{\circ}$C นาน 15 นาที เพื่อกระตุ้น (activate) ให้เอนไซม์ Taq polymerase ทำงาน จากนั้นตามด้วย 50 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 $^{\circ}$C นาน 15 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C นาน 30 วินาที เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ annealing ในแต่ละรอบเครื่อง real time-Thermo cycler จะอ่านค่าปริมาณของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบ

การตรวจพิสูจน์แยกสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยวิธี conventional RT-PCR

ตัวอย่าง RNA ที่ให้ผลบวกต่อการทำ real time RT-PCR จะนำมาตรวจแยกสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ โดยวิธี conventional RT-PCR โดยใช้ specific subtyping primer ที่จำเพาะต่อยีน HA และ NA ของแต่ละสายพันธุ์ (Tsukamoto et al., 2008; Tsukamoto et al., 2009)

รายละเอียดการตรวจแยกสายพันธุ์ โดยวิธี conventional RT-PCR คือ นำ RNA มาสังเคราะห์เป็น cDNA แล้วนำ cDNA ที่ได้มาทดสอบ โดยผสม cDNA ลงในสารเคมี PCR ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร, 10 uM specific subtyping primer 0.5 ไมโครลิตร, 2X ReddyMix PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK) 6.25 ไมโครลิตร, 25 mM

$MgCl_2$ 0.5 ไมโครลิตร และ nuclease free-water 3.75 ไมโครลิตร แล้วนำสารเคมีที่ผสมไปใส่ในเครื่อง Thermo cycler (Hybaid limited, Ashford, Middlesex, UK) และตั้ง PCR condition ดังนี้ intial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที ตามด้วย 40 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 30 วินาที และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 7 นาที หลังจากทำ RT-PCR แล้ว นำ amplified PCR product ปริมาตร 4 ไมโครลิตร มาผ่าน 1.5% agarose gel electrophoresis (FMC Bioproducts, Rockland, ME) จากนั้นย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide (0.5 mg/ml) เพื่อตรวจดูขนาดของ PCR product และบันทึกภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation system (Vilber Lourmat, La Vallee, France) ผลบวกของ RT-PCR จะแสดงได้โดยขนาดของ PCR product ที่ตรงและจำเพาะต่อสายพันธุ์ (Tsukamoto et al., 2008; Tsukamoto et al., 2009)

อย่างไรก็ตามการยืนยันสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (subtype) จะรายงายเมื่อได้ยืนยันผล sequence แล้วเท่านั้น และเนื่องจาก specific subtyping primer ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ถอดรหัสพันธุกรรม จึงต้องออกแบบ primer ใหม่ สำหรับเพื่อให้เหมาะสมกับการถอดรหัสพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Primer3 Input (v.0.4.0)

<u>ระยะที่ 3 วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีนทั้งหมดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากนกกระทา</u>

โดยทั่วไปการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA sequencing) ในแต่ละครั้ง จะได้ความยาวของสายรหัสพันธุกรรมที่มีความยาว 500-800 bp ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณภาพของตัวอย่าง (template) และสมรรถนะของเครื่องถอดรหัส (sequencer) ในการวิจัยครั้งนี้เพื่อให้ได้รหัสพันธุกรรมที่มีความน่าเชื่อถือ ได้ถอดรหัสพันธุกรรมอย่างน้อย 2 ครั้งต่อรหัสพันธุกรรม (2 fold coverage; 1 forward และ 1 reverse)

การแยกสกัด RNA และ การเตรียม cDNA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกสกัด RNA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ จากน้ำไข่ฟัก (allantoic fluid) โดยใช้ชุดแยกสกัด QIAamp viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) วิธีการแยกสกัด RNA ของไวรัสประกอบด้วย การเติมสารละลาย buffer AVL ปริมาตร 560 ไมโครลิตร และตัวอย่าง (allantoic fluid) ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) นาน 10 นาที และเติมสารละลาย ethanol (99.99%) ปริมาตร 560 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำส่วนผสมปริมาตร 630 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที หลังจากนำสารละลายผ่าน column เติมสารละลาย wash buffer AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column และปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที จากนั้นเติมสารละลาย wash buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 3 นาที ขั้นตอนสุดท้ายเติมสารละลาย Buffer AVE หรือ molecular grade water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน QIAamp spin column ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที เก็บสารสกัด RNA เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

หลังจากแยกสกัด RNA แล้วจากนั้นเตรียมสังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis) ซึ่งประกอบด้วยการผสม viral RNA 5 ไมโครลิตร และ 0.5 ug Random primer (Promega, Madison, WI) หรือ oligonucleotide influenza universal primer Uni12: 5'-AGC AAA AGC AGG-3' ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำส่วนผสมมาผ่านเครื่อง Thermal cycler ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที และที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที หลังจากนั้นเติม 5X Improm-II reaction buffer (Promega, Madison, WI) 4 ไมโครลิตร, 10mM dNTPs 1 ไมโครลิตร, 25mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 10Unit Rnasin Ribonuclease inhibitor 0.3 ไมโครลิตร และ Improm-II Reverse transcriptase 1 ไมโครลิตร แล้วนำส่วนผสมมาผ่านเครื่อง Thermal cycler ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที ตามด้วยที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที และที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที cDNA ที่ได้จะนำไปใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมในขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยวิธี RT-PCR

หลังจากแยกสกัด RNA ของไวรัส และเตรียม cDNA แล้ว จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primers ที่เป็น specific primers สำหรับยีนของไวรัส (การศึกษาครั้งนี้ได้มุ่งเน้นยีน 2 ยีน คือ HA และ NA เป็นอันดับแรก) การทำ RT-PCR ดำเนินโดยเตรียมสารเคมี ซึ่งประกอบด้วย cDNA ในปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร, 2X ReddyMix PCR master mix (Thermo Fisher Scientifici, Surrey, UK) 12.5 ไมโครลิตร, 10 uM of each primers 1 ไมโครลิตร และ nuclease free-water ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร หลังจากผสมสารเคมีจะทำ RT-PCR โดยใช้เครื่อง Thermal cycler ด้วยการตั้ง PCR condition ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที ตามด้วย 40 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 45-60°C นาน 30-90 วินาที (ขึ้นกับชนิดของ primer) extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 90 วินาที และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 7 นาที หลังจากทำ RT-PCR แล้ว นำ amplified PCR product ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาผ่าน 1.5% agarose gel electrophoresis (FMC Bioproducts,

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

Rockland, ME) จากนั้นย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide (0.5 mg/ml) เพื่อตรวจดูขนาดของ PCR product และบันทึกภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation system (Vilber Lourmat, La Vallee, France) และตัดเจลเพื่อนำไปสกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ต่อไป

การถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (DNA sequencing)

วิธีการถอดรหัสพันธุกรรม หลังจากแยกสกัด RNA ของเชื้อไวรัส และเตรียม cDNA แล้ว จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primers ที่เป็น specific primers สำหรับแต่ละยีนของเชื้อไวรัส (การศึกษาครั้งนี้ได้มุ่งเน้นยีน 2 ยีน คือ HA และ NA เป็นอันดับแรก) ซึ่งเป็น primer ที่ได้ออกแบบให้เหมาะสมกับเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ รายละเอียดวิธีการทำ RT-PCR โดยการเตรียมสารเคมีในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 2X ReddyMix PCR master mix (Thermo Fisher Scientifici, Surrey, UK) และ 10 uM of each primers และ cDNA ในปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร หลังจากผสมสารเคมี จะทำ RT-PCR โดยใช้เครื่อง Thermal cycler ด้วยการตั้ง PCR condition ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95^{o}C นาน 3 นาที ตามด้วย 40 รอบของ denaturation ที่อุณหภูมิ 95^{o}C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 45-60^{o}C นาน 30-90 วินาที (ขึ้นกับชนิดของ primer) extension ที่อุณหภูมิ 72^{o}C นาน 90 วินาที และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72^{o}C นาน 7 นาที หลังจากนั้นนำ amplified PCR product ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาผ่าน 1.5% agarose gel electrophoresis (FMC Bioproducts, Rockland, ME) จากนั้นย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide (0.5 mg/ml) เพื่อตรวจดูขนาดของ PCR product และบันทึกภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation system (Vilber Lourmat, La Vallee, France) และตัดเจลเพื่อนำไปสกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ การสกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ จะใช้ชุดสกัด Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendrof, Humburg, Germany) หลังจากได้ purified PCR product จะนำไปถอดรหัสพันธุกรรมต่อไป

การถอดรหัสพันธุกรรม (DNA sequencing) จะส่งตัวอย่างไปยังบริษัท Molecular Informatics Laboratory Limited (Shatin, N.T., Hong Kong) ด้วยวิธี dideoxy chain-termination method วิธีการถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสประกอบด้วย การเตรียมตัวอย่างด้วย Big Dye Terminator V.3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction (ABI, Foster City, CA) จากนั้นจะวิเคราะห์รหัสพันธุกรรม ด้วยเครื่อง ABI-Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, CT) หรือ ABI-Prism 377 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, CT) รหัสพันธุกรรมที่ได้จะนำมาตรวจ และประกอบรหัสพันธุกรรมต่อไป

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 3 ส.ค. 255
เลขทะเบียน 215501
เลขเรียกหนังสือ

การประกอบรหัสพันธุกรรม (Sequence assembly)

การประกอบรหัสพันธุกรรม ได้ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ PC และโปรแกรมที่ใช้ในการอ่านและประกอบรหัสพันธุกรรม ซึ่งเป็นโปรแกรมในกลุ่ม DNASTAR (DNASTAR, Madison, WI) ขั้นตอนการประกอบรหัสพันธุกรรมประกอบด้วย

1. อ่านและยืนยันข้อมูลรหัสพันธุกรรม โดยปกติรหัสพันธุกรรมที่ได้จากเครื่อง ABI automated DNA sequencer (Applied Biosystems) จะเป็น ABI file format ซึ่งจำเป็นต้องใช้โปรแกรมอ่านข้อมูลรหัสพันธุกรรมจาก ABI file หรือ Text file ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม Chromas V1.45 (Griffith University, Queensland, Australia) และ SeqMan v.5.03 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) ในการอ่านข้อมูลรหัสพันธุกรรมและยืนยันผลการอ่าน (validate) รหัสพันธุกรรมให้ถูกต้อง

2. แปลงรหัสพันธุกรรมให้อยู่ใน file ที่เหมาะสมกับ assembly program ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม EditSeq v.5.03 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) ในการแปลง file ให้เหมาะสมกับ assembly program

3. ประกอบรหัสพันธุกรรม (assembly) ทำให้ได้สายรหัสพันธุกรรมที่ยาวขึ้น และครอบคลุมรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของแต่ละยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม SeqMan v.5.03 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) ในการประกอบรหัสพันธุกรรม (assembly program)

การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Genetic and cluster analysis)

หลังจากได้รหัสพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสไข้หวัดใหญ่แล้ว ได้วิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในต่างประเทศจากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งประกอบด้วย

1. เตรียมรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้ในนกกระทาในประเทศไทย รวมทั้งรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสไข้หวัดใหญ่จากต่างประเทศ รหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสดังกล่าวได้จากการ download รหัสพันธุกรรมผ่านทางฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

2. เปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (comparison of full-length genomic sequences) ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรม MegAlign v.5.03 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) ซึ่งใช้ในการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของแต่ละยีน

3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ในระดับ genome (genetic relatedness) โดยวิธี phylogenetic analysis โดยคอมพิวเตอร์โปรแกรม MEGA4 (Tamura et al., 2007) ซึ่งวิธี phylogenetic analysis จะสามารถบอกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสเป็น percentage of similarity หรือ genetic distance และสามารถนำเสนอความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram หรือ phylogenetic tree)

การเผยแพร่ข้อมูล (Data release)

การเผยแพร่ข้อมูล ทำได้โดยการส่งข้อมูลรหัสพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ไปยังฐานข้อมูล GenBank เพื่อเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov