รายการอ้างอิง

Amonsin, A., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Thanawongnuwech, R., Suradhat, S., Pariyothorn, N., Tantilertcharoen, R., Damrongwantanapokin, S., Buranathai, C., Chaisingh, A., Songserm, T. and Poovorawan, Y. 2006. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. Virology. 344(2): 480-491.

Bender, C., Hall, H., Huang, J., Klimov, A., Cox, N., Hay, A., Gregory, V., Cameron, K., Lim, W. and Subbarao, K. 1999. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. Virology. 254(1): 115-123.

Bright, R.A., Ross, T.M., Subbarao, K., Robinson, H.L. and Katz, J.M. 2003. Impact of glycosylation on the immunogenicity of a DNA-based influenza H5 HA vaccine. Virology. 308(2): 270-278.

Brown, E.G. 2000. Influenza virus genetic. Biomed. Pharmacother. 54(4): 196-209.

Castrucci, M. and Kawaoka, Y. 1993. Biologic importance of neuraminidase stalk region length in influenza A virus. J. Virol. 67(2): 759-764.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. "Avian influenza: current situation." [Online]. Available: http://www.cdc.gov/flu/avian/outbreaks/current.htm#animals

Chen, H., Smith, G.J., Li, K.S., Wang, J., Fan, X.H., Rayner, J.M., Vijaykrishna, D., Zhang, L.X., Zhang, L.J., Guo, C.T., Cheung, C.L., Xu., K.M., Duan, L., Huang, K., Qin, K., Leung, Y.H., Wu., W.L., Lu., H.R., Chen, Y., Xia, N.S., Naipospos, T.S., Yuen, K.Y., Hassen, S.S., Bahri, S., Nguyen, T.D., Webster, R.G., Peiris, J.S. and Guan Y. 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103(8): 2845-2850.

Claas, E.C., Osterhaus, A.D., van Beek, R., De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Senne, D.A., Krauss, S., Shortridge, K.F. and Webster, R.G. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet. 351(9101): 472-477.

Department of Livestock Development (DLD). 2006."Avian Influenza situation and control measures."[Online].Available: http://www.dld.go.th/home/bird_flu/Livestock_by_En_don.html

De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A. and Osterhaus, A.D. 2000. Influenza virus: a master of metamorphosis. J. Infect. 40(3): 218-228.

de Jong, M.D., Tran, T.T., Truong, H.K., Vo, M.H., Smith, G.J., Nguyen, V.C., Bach, V.C., Phan, T.Q., Do, Q.H., Guan, Y., Peiris, J.S., Tran, T.H., Farrar, J. 2005. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. N. Engl. J. Med. 353. 2667-2672.

de Jong, M.D. and Hien, T.T. 2006. Avian influenza A (H5N1). J. Clin. Virol. 35(1): 2-13.

Easterday, B.C., Hinshaw, V.S. and Halverson, D.A. 1997. Influenza. In : Disease of poultry. B.W. Calnek, H. J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, Y.M. Saif (ed.) Iowa: Iowa State University Press. 583-608.

Fouchier, R.A.M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfsy, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B. and Osterhaus, A.D. 2004. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from Black-Head gulls. J. Virol. 79(5): 2814-2822.

Gambaryan, A., Tuzikov, A., Pazynina, G., Bovin, N., Balish, A. and Klimov, A. 2006. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. Virology. 344(2): 432-438.

Gao, P., Watanabe, S., Ito, T., Goto, H., Wells, K., McGregor, M., Cooley, A.J. and Kawaoka, Y. 1999. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. J. Virol. 73(4): 3184-3189.

Guan, Y., Peiris, J.S., Lipatov, A.S., Ellis, T.M., Dyrting, K.C., Krauss, S., Zhang, L.J., Webster, R.G. and Shortridge, K.F. 2002. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99(13): 8950-8955.

Gubareva, L.V., McCullers, J.A., Bethell, R.C. and Webster, R.G. 1998. Characterization of influenza A/HongKong/156/97 (H5N1) virus in a mouse model and protective effect of zanamivir on H5N1 infection in mice. J. Infect. Dis. 178(6): 1592-1596.

Gubereva, L.V. 2004. Molecular mechanism of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. Virus. Res. 103(1-2): 199-203.

Ha, Y., Stevens, D.J., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. 2001. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98(20): 11181-11186.

Hughes, M.T., McGregor, M., Suzuki, T., Suzuki, Y. and Kawaoka, Y. 2001. Adaptation of influenza A viruses to cells expressing low levels of sialc acid leads to loss of neuraminidase activity. J. Virol. 75(8): 3766-3770.

Hulse, D.J., Webster, R.G., Russell, R.J. and Perez, D.R. 2004. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. J. Virol. 78(18): 9954-9964.

Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R.A., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theambooniers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsan, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, D.M. and Poovorawan, Y. 2004. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerg. Infect. Dis. 10(12): 2189-2191.

Kiso, M., Mitamura, K., Sakai-Tagawa,Y., Shiraishi, K., Kawakami, C.,Kimura, K.,Hayden, F.G., Sugaya, N. and Kawaoka,Y. 2004. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. Lancet. 364(9436): 759-765.

Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G. and Osterhaus, A.D. 2003. Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). Vet. Pathol. 40(3): 304-310.

Lamp, R.A. and Choppin, P.W. 1983. The gene structure and replication of influenza virus. Ann. Rev. Biochem. 52: 467-506.

Lee, C.W., Suarez, D.L., Tumpey, T.M., Sung, H.W., Kwon, Y.K., Lee, Y.J., Choi, J.G., Joh, S.J., Kim, M.C., Lee, E.K., Park, J.M., Lu, X., Katz, J.M., Spackman, E., Swayne, D.E. and Kim, J.H. 2005. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. J. Virol. 79(6): 3692-3702.

Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. and Peiris, J.S. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature. 430(6996): 209-213.

Ligon, B.L. 2005. Avian influenza virus H5N1: a review of its history and information regarding its potential to cause the next pandemic. Semin. Pediatr. Infect. Dis. 16(4): 326-335.

Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y. and Webster, R. 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. J. Virol. 73(2): 1146-1155.

Moscona, A. 2005. Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. N. Engl. J. Med. 353(25), 2633-2636.

McKimm-Breschkin, J., Sahasrabudhe, A., Blick, T. and McDonald, M. 2001. Mechanisms of resistance of influenza virus to neuraminidase inhibitors. Int. Congr. Ser. 1219: 855-861.

Muramoto, Y., Le, T.Q., Phuong, L.S., Nguyen, T., Nguyen, T.H., Sakai-Tagawa, Y., Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Kida, H. and Kawaoka, Y. 2006. Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005. J. Vet. Med. Sci. 68(5): 527-531.

Nguyen, D.C., Uyeki, T.M., Jadhao, S., Maines, T., Shaw, M., Matsuoka, Y., Smith, C., Rowe, T., Lu, X., Hall, H., Xu, X., Balish, A., Klimov, A., Tumpey, T.M., Swayne, D.E., Huynh, L.P., Nghiem, H.K., Nguyen, H.H., Hoang, L.T., Cox, N.J. and Katz, J.M. 2005. Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001. J. Virol. 79(7): 4201-4212.

Office International des Epizooties (OIE). 2005a. "Old Classification of Diseases Notifiable to the OIE." [Online]. Available: http://www.oie.int/eng/maladies/en_OldClassification.htm.

Office International des Epizooties (OIE). 2005b. "Avian Influenza" [Online]. Available: http: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm

Office International des Epizooties (OIE). 2006. " Update on Avian Influenza in Animals (TYPE 5)" [Online]. Available: http://www.oie.int/downld/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm

Osterhaus, A.D., de Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F. and Claas, E.C. 2002. H5N1 influenza in Hong Kong: virus characterizations. Vaccine. 20. Suppl. 2: S82-83.

Payungporn, S., Phakdeewirot, P., Chutinimitkul, S., Theamboonlers, A., Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Amonsin, A. and Poovorawan, Y. 2004. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. Viral. Immunol. 17(4): 588-593.

Puthavathana, P., Auewarakul, P., Chor Charoenying, P., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., Khanyok, R., Thawachsupa, P., Kijphati, R. and Sawanpanyalert, P. 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. J. Gen. Virol. 86: 423-433.

Roberts, P.C., Garten, W. and Klenk, H.D. 1993. Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. J. Virol. 67(6), 3048-3060.

Smith, G.J., Naipospos, T.S., Nguyen, T.D., de Jong, M.D., Vijaykrishna, D., Usman, T.B., Hassan, S.S., Nguyen, T.V., Dao, T.V., Bui, N.A., Leung, Y.H., Cheung, C.L., Rayner, J.M., Zhang, J.X., Zhang, L.J., Poon, L.L., Li, K.S., Nguyen, V.C., Hien, T.T., Farrar, J., Webster, R.G., Chen, H., Peiris, J.S. and Guan, Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. Virology. 350(2): 258-268.

Songsermn, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2006. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. Emerg. Infect. Dis. 12(4): 681-683.

Steinhauer, D.A. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virology. 258(1):1-20.

Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. and Cox, N. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. Science. 279(5349), 393-396.

Suzuki, Y. 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol. Pharm. Bull. 28(3): 399-408.

Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tantilertcharoen, R., Damrongwatanapokin, S., Theamboonlers, A., Payungporn, S., Nanthapornphiphat, K., Ratanamungklanon, S., Tunak, E., Songserm, T., Vivatthanavanich, V., Lekdumrongsak, T., Kesdangsakonwut, S., Tunhikorn, S. and Poovorawan, Y. 2005. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. Emerg. Infect. Dis. 11(5): 699-701.

Vines, A., Wells, K., Matrosovich, M., Castrucci, M.R., Ito, T. and Kawaoka, Y. 1998. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. J. Virol. 72(9): 7626-7631.

Viseshakul, N., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Payungporn, S., Keawchareon, J., Oraveerakul, K., Wongyanin, P., Plitkul, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. 2004. The genome sequence analysis of H5N1 avian influenza A virus isolated from the outbreak among poultry populations in Thailand. Virology. 328(2): 169-76.

Wan, X.F., Ren, T., Luo, K.J., Liao, M., Zhang, G.H., Chen, J.D., Cao, W.S., Li, Y., Jin, N.Y., Xu, D. and Xin, C.A. 2005. Genetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in southern China during the 2003-04 avian influenza outbreaks. Arch. Virol. 150(6): 1257-1266.

Webster, R.G., Shortridge, K.F. and Kawaoka, Y. 1997. Influenza: interspecies transmission and emergence of new pandemics. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 18(4): 275-279.

Wilschut, J and McElhaney, J.E. 2005. Antigenic Drift and Shift: Epidemic and Pandemic Influenza. In : Influenza. London: Elsevier Limited. 47-53.

World Health Organization (WHO). 2006. "Cumulative number of confirmed human cases of Avian Influenza A/(H5N1) reported to WHO." [Online]. Available: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_02_20/en/

Xu, X., Subbarao, Cox, N.J. and Guo, Y. 1999. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. Virology. 261(1): 15-19.

Zhou, H., Jin, M., Chen, H., Huag, Q. and Yu, Z. 2006. Genome-sequence analysis of the pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated in China in 2004. Virus. Genes. 32(1): 85-95.

Zitzow, L.A., Rowe, T., Morken, T., Shieh, W.J., Zaki, S. and Katz, J.M. 2002. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. J. Virol. 76(9): 4420-4429.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ (กรดอะมิโน) ของยีน H5 ในสัตว์ปีกที่แยกได้จากพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานคร

	CU-K2	CU-03	CU-04	CU-15	CU-16	CU-18	CU-21	CU-23	CU-35
CU-K2		99.9(99.8)	99.9(99.8)	99.6(99.4)	99.6(99.4)	99.6(99.2)	99.9(99.8)	99.9(99.8)	99.7(99.6)
CU-03	99.9(99.8)		100(100)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.6(99.4)	100(100)	100(100)	99.8(99.8)
CU-04	99.9(99.8)	100(100)		99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.6(99.4)	100(100)	100(100)	99.8(99.8)
CU-15	99.6(99.4)	99.7(99.6)	99.7(99.6)		100(100)	99.9(99.8)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.5(99.4)
CU-16	99.6(99.4)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	100(100)		99.9(99.8)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.5(99.4)
CU-18	99.6(99.2)	99.6(99.4)	99.6(99.4)	99.9(99.8)	99.9(99.8)		99.6(99.4)	99.6(99.4)	99.4(99.2)
CU-21	99.9(99.8)	100(100)	100(100)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.6(99.4)		100(100)	99.8(99.8)
CU-23	99.9(99.8)	100(100)	100(100)	99.7(99.6)	99.7(99.6)	99.6(99.4)	100(100)		99.8(99.8)
CU-35	99.7(99.6)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.5(99.4)	99.5(99.4)	99.4(99.2)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ (กรดอะมิโน) ของยีน N1ในสัตว์ปีกที่แยกได้จากพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานคร

	CU-K2	CU-03	CU-04	CU-15	CU-16	CU-18	CU-21	CU-23	CU-35
CU-K2		98.0(97.9)	98.0(97.9)	97.9(97.6)	97.9(97.6)	97.7(97.4)	99.2(99.0)	98.6(98.3)	97.8(97.2)
CU-03	98.0(97.9)		100(100)	99.9(99.7)	99.9(99.7)	99.6(99.5)	98.8(98.8)	98.3(98.1)	99.7(99.3)
CU-04	98.0(97.9)	100(100)		99.9(99.7)	99.9(99.7)	99.6(99.5)	98.8(98.8)	98.3(98.1)	99.7(99.3)
CU-15	97.9(97.6)	99.9(99.7)	99.9(99.7)		100(100)	99.7(99.7)	98.7(98.6)	98.2(97.9)	99.8(99.5)
CU-16	97.9(97.6)	99.9(99.7)	99.9(99.7)	100(100)		99.7(99.7)	98.7(98.6)	98.2(97.9)	99.8(99.5)
CU-18	97.7(97.4)	99.6(99.5)	99.6(99.5)	99.7(99.7)	99.7(99.7)		98.5(98.3)	98.4(98.1)	99.6(99.3)
CU-21	99.2(99.0)	98.8(98.8)	98.8(98.8)	98.7(98.6)	98.7(98.6)	98.5(98.3)		99.4(99.2)	98.6(98.1)
CU-23	98.6(98.3)	98.3(98.1)	98.3(98.1)	98.2(97.9)	98.2(97.9)	98.4(98.1)	99.4(99.2)		98.0(97.4)
CU-35	97.8(97.2)	99.7(99.3)	99.7(99.3)	99.8(99.5)	99.8(99.5)	99.6(99.3)	98.6(98.1)	98.0(97.4)	

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ (กรดอะมิโน) ของยีน H5 ในไก่ที่แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทยช่วงปี 2004-2005

	CU-K2	CU-01	CU-03	CU-10	CU-21	CU-23	CU-39	CU-160	CU-162
CU-K2		99.7(99.6)	99.9(99.8)	99.8(99.6)	99.9(99.8)	99.9(99.8)	99.9(99.8)	99.6(99.2)	99.5(99.0)
CU-01	99.7(99.6)		99.8(99.8)	99.6(99.6)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.5(99.2)	99.4(99.0)
CU-03	99.9(99.8)	99.8(99.8)		99.8(99.8)	100(100)	100(100)	100(100)	99.7(99.4)	99.6(99.2)
CU-10	99.8(99.6)	99.6(99.6)	99.8(99.8)		99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.8(99.8)	99.6(99.2)	99.4(99.0)
CU-21	99.9(99.8)	99.8(99.8)	100(100)	99.8(99.8)		100(100)	100(100)	99.7(99.4)	99.6(99.2)
CU-23	99.9(99.8)	99.8(99.8)	100(100)	99.8(99.8)	100(100)		100(100)	99.7(99.4)	99.6(99.2)
CU-39	99.9(99.8)	99.8(99.8)	100(100)	99.8(99.8)	100(100)	100(100)		99.7(99.4)	99.6(99.2)
CU-160	99.6(99.2)	99.5(99.2)	99.7(99.4)	99.6(99.2)	99.7(99.4)	99.7(99.4)	99.7(99.4)		99.8(99.8)
CU-162	99.5(99.0)	99.4(99.0)	99.6(99.2)	99.4(99.0)	99.6(99.2)	99.6(99.2)	99.6(99.2)	99.8(99.8)	

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความคล้าย (similarity) ของนิวคลีโอไทด์ (กรดอะมิโน) ของยีน N1 ในไก่ที่แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทยช่วงปี 2004-2005

	CU-K2	CU-01	CU-03	CU-10	CU-21	CU-23	CU-39	CU-160	CU-162
CU-K2		98.0(97.9)	98.0(97.9)	97.8(97.6)	99.2(99.0)	98.6(98.3)	98.0(97.9)	97.1(96.0)	97.3(96.3)
CU-01	98.0(97.9)		100(100)	99.7(99.7)	98.8(98.8)	98.3(98.1)	100(100)	99.0(98.1)	99.2(98.3)
CU-03	98.0(97.9)	100(100)		99.7(99.7)	98.8(98.8)	98.3(98.1)	100(100)	99.0(98.1)	99.2(98.3)
CU-10	97.8(97.6)	99.7(99.7)	99.7(99.7)		98.6(98.6)	98.0(97.9)	99.7(99.7)	98.8(97.9)	98.9(98.1)
CU-21	99.2(99.0)	98.8(98.8)	98.8(98.8)	98.6(98.6)		99.4(99.2)	98.8(98.8)	97.9(96.9)	98.0(97.2)
CU-23	98.6(98.3)	98.3(98.1)	98.3(98.1)	98.0(97.9)	99.4(99.2)		98.3(98.1)	97.3(96.3)	97.5(96.5)
CU-39	98.0(97.9)	100(100)	100(100)	99.7(99.7)	98.8(98.8)	98.3(98.1)		99.0(98.1)	99.2(98.3)
CU-160	97.1(96.0)	99.0(98.1)	99.0(98.1)	98.8(97.9)	97.9(96.9)	97.3(96.3)	99.0(98.1)		99.6(99.3)
CU-162	97.3(96.3)	99.2(98.3)	99.2(98.3)	98.9(98.1)	98.0(97.2)	97.5(96.5)	99.2(98.3)	99.6(99.3)	

วิธีการสกัดแยก RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Rneasy mini kit® (Qiagen, Hilden,Germany)

สารเคมี

AVL buffer	31	มล.
AW1 buffer (concentration)	19	มล.
AW2 buffer (concentration)	13	มล.
AVE buffer	3X2	มล.
Carrier RNA (poly A)	310	ไมโครกรัม

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม AVL buffer

ละลาย Carrier RNA (poly A) ด้วย Buffer AVL 1 มล. ได้เป็นสารละลาย Carrier RNA จากนั้นดูดสารละลาย Carrier RNA ทั้งหมดใส่ลงใน Buffer AVL ละลายให้เข้ากัน

การเตรียม AW1 และ AW 2 buffer

เติม 96 -100 % เอทานอลปริมาณ 25 และ 30 มล. ลงใน AW1 และ AW2 buffer ตามลำดับ

วิธีการสกัดแยก RNA

1. เตรียมตัวอย่างน้ำไข่ฟักปริมาณ 200 µl จากนั้นเติม AVL buffer ปริมาณ 560 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15-25^{o} ซ) เป็นเวลา 10 นาที ได้สารละลายตัวอย่างปริมาณ 760 µl

2. เติม 100% เอทานอล ปริมาณ 560 µl ลงในสารละลายตัวอย่าง แล้วผสมให้เข้ากัน

3. ดูดสารลารละลายตัวอย่างปริมาณ 630 µl ลงใน QIA spin column (อยู่ในหลอดขนาด 2 มล.) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ในหลอด 2 มล.ทิ้ง และเก็บส่วนของ QIA spin column ไว้

4. ดูดสารละลายตัวอย่างที่เหลือ แล้วทำซ้ำข้อ 3

5. เติม AW1 buffer ปริมาณ 500 µl ลงใน QIA spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที เทของเหลวด้านล่างทิ้ง

6. เติม AW 2 buffer 500 µl ลงใน QIA spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000xg (14,000 rpm) 3 นาที จากนั้นเทของเหลวทิ้งและนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำเป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด AW2 buffer ให้หมด

7. นำ QIA spin column ใส่ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มล. แล้วเติม AVE buffer ปริมาณ 60 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg (8000 rpm) 1 นาที

8. จากข้อ 7 จะได้ viral RNA ปริมาณ 60 µl แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$ ซ หรือ – 70 $^{\circ}$ ซ

วิธีการสกัด DNA ออกจากแผ่นเจลโดยใช้ชุด Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Hamburg, Germany)

สารเคมี

Binding buffer	130	มล.
Wash buffer concentration	50	มล.
Elution buffer	4	มล.

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม Wash buffer concentration

เติม 95-100 % เอทานอล ปริมาณ 200 มล. ลงใน Wash buffer concentration ผสมให้เข้ากัน จะได้ Wash buffer ที่เจือจางลงและสามารถนำไปใช้ในการสกัด DNA ออกจากแผ่นอะกาโรสเจล

วิธีการสกัด DNA ออกจากแผ่นอะกาโรสเจล

1. ตัด agarose gel ในส่วนที่มี PCR product ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 2 มล. จากนั้นเติม Binding buffer ปริมาณเป็น 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดมา (เจล 1 มก.เท่ากับ 1 µl)

2. นำตัวอย่างไปไว้ใน heat block ที่อุณหภูมิ 50 ^{o} ซ เป็นเวลาประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายจนหมด และควร vortex ทุกๆ 2-3 นาที

3. เมื่อเจลละลายจนสมบูรณ์แล้ว เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาณเท่ากับน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลง (inversion)

4. นำ spin column ซึ่งมีแผ่นเมมเบรนอยู่ตรงกลาง มาใส่ในหลอดขนาด 2 มล.

5. ทำการดูดตัวอย่างลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000-10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง

6. เติม Wash buffer ปริมาณ 750 µl ลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000-10,000 x g 1 นาที จากนั้นเทของเหลวทิ้ง แล้วนำ spin column ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัด Wash buffer ให้หมด

7. นำ spin column ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 2 มล. จากนั้นเติม elution buffer ปริมาณ 30 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000-10,000 x g 1 นาที

8. จากข้อ 7 จะได้ DNA บริสุทธิ์ปริมาตร 35 µl สำหรับใช้ในการหาลำดับเบส

สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

1. Eppendorf MasterMix (2.5x) (Eppendorf®, Hamburg, Germany) ประกอบด้วย

- Taq DNA polymerase	62.5	U/ml
- KCl	125	mM
- Tris-HCl pH 8.3	75	mM
- $Mg(OAc)_2$	3.75	mM
- Igepal® -CA630	0.25	%
- each dNTP	500	µM

2. GeneRuler ™ 100 bp DNA ladder (Fermentas®, USA) ประกอบด้วย

- DNA มาตรฐาน ที่ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 800, 900 และ 1000 bp ละลายใน TE buffer

- TE buffer ประกอบด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1mM EDTA

3. Orange G loading dye 0.2% ใน glyceral 50 % (Carlo Ebra Reagent ®) ประกอบด้วย

- Orange G powder	0.2	กรัม
- Pure glycerine	50	มล.
- Distrilled water	50	มล.

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนละลายเข้ากัน
2. แบ่งใส่หลอด 1.5 มล. แล้วเก็บไว้ที่ 4^{o} ซ

ภาคผนวกที่ 2

ชนิดกรดอะมิโน	อักษรย่อ
Arginine	Arg, R
Alanine	Ala, A
Asparagine	Asp, N
Aspartic acid	Asp, D
Glutamine	Gln, Q
Glutamic acid	Glu, E
Glycine	Gly, G
Histidine	His, H
Leucine	Leu, L
Lysine	Lys, K
Proline	Pro, P
Serine	Ser, S
Threonine	Thr, T
Tyrosine	Tyr, Y
Valine	Val, V

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว นวลอนงค์ ปริโยธร เกิดเมื่อวันที่ 21 เมษายน พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีพ.ศ. 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย