บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

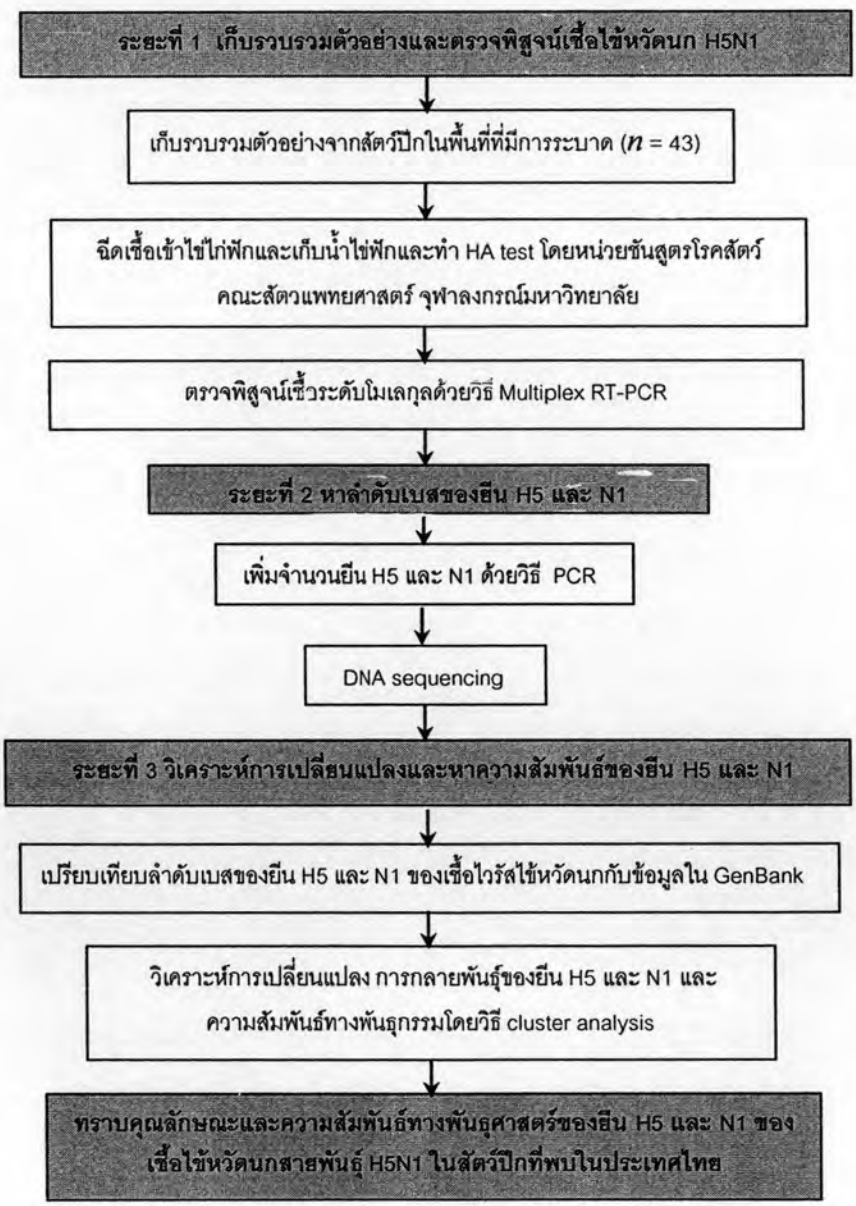
การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของยีน H5 และ N1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในประเทศไทย เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จึงแบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ

ระยะที่ 1 เก็บรวบรวมตัวอย่างและตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก

ระยะที่ 2 หาลำดับเบสของยีน H5 และ N1

ระยะที่ 3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและหาความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1

แผนภูมิวิธีการดำเนินการวิจัยแสดงไว้ในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงวิธีการดำเนินการวิจัย

ระยะที่ 1 เก็บรวบรวมตัวอย่างและตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก

1.1 การเก็บรวบรวมและเตรียมตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

เก็บและรวบรวมตัวอย่างน้ำจากไข่ฟัก (allantoic fluid) จากหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยหน่วยชันสูตรฯ ได้เก็บตัวอย่างสัตว์ปีกชนิดต่างๆด้วยวิธีการป้ายเก็บช่องทวารร่วม (cloacal swab) และ/หรือสิ่งคัดหลั่งจากหลอดลม (tracheal swab) หรืออวัยวะภายในจากซากสัตว์ปีก

แยกเชื้อไวรัสโดยการฉีดตัวอย่างเข้าไข่ไก่ฟักที่มีอายุประมาณ 9 -12 วัน จำนวน 2 ฟองต่อ 1 ตัวอย่าง และส่องไข่ไก่ทุก 24 ชม. เพื่อดูการตายของตัวอ่อน และเก็บน้ำไข่ฟักจากไข่ที่ตายภายใน 24-72 ชม. หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทั้งหมดภายใน 7 วันหลังการฉีดเชื้อ แล้วทำให้เชื้อไวรัสตายโดยการใช้ความร้อนด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 56 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (OIE, 2005) จากนั้นทดสอบทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธี Hemagglutination (HA) test และเก็บรักษาน้ำไข่ฟักไว้ที่อุณหภูมิ – 20° ซ จนกว่าจะนำไปแยกสกัด RNA เพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกในระดับโมเลกุลต่อไป โดยเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจากสัตว์ปีกชนิดต่างๆ ซึ่งพบได้ในพื้นที่ที่มีการระบาดในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 43 ตัวอย่าง

1.2 การสกัด RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

นำน้ำไข่ฟักที่ให้ผลบวกต่อการแยกเชื้อไวรัสไปสกัดแยก RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Rneasy mini kit® (Qiagen, Hilden, Germany) โดยอาศัยหลักการแยก RNA ด้วยแผ่น silica gel membrane และได้ RNA ที่ปราศจากการปนเปื้อนของโปรตีน, nuclease, ribonuclease (RNases) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายไม่น้อยกว่า 1 µg ในปริมาตรรวม 60 µl (วิธีการแยกสกัด RNA ได้แสดงไว้ในภาคผนวก)

1.3 การเตรียม cDNA จากตัวอย่างเชื้อไวรัส

สังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription ในปริมาตรทั้งหมด 20 µl เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสด้วยวิธี multiplex RT-PCR

ขั้นตอนการเตรียม cDNA ทำได้โดยเตรียมส่วนผสม RNA และ random primers ดังต่อไปนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
RNA	4 µl	>1 µg
0.5µg Random primers	1 µl	0.1 µg
ปริมาตรรวม	5 µl	

จากนั้นนำสารละลายไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler ที่ 70 ^{o} ซ เป็นเวลา 5 นาที และ 4^{o} ซ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง RNA เป้าหมาย และ random primers หลังจากนั้นเตรียมส่วนผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase ในการสร้าง cDNA จาก RNA

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Improm-II™ 5x Reaction buffer	4 µl	1x
25 mM $MgCl_2$	2 µl	2.5 mM
5 mM dNTPs	2 µl	0.5 mM
Recombinant RNAsin ®Ribonuclease Inhibitor	0.3 µl	40U/µl
Improm-II™ Reverse transcriptase	1 µl	
Nuclease free water	5.7 µl	
ปริมาตรรวม	15 µl	

นำส่วนผสมระหว่าง RNA กับ random primer ที่เตรียมไว้ข้างต้นผสมรวมกับส่วนผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA และนำไปใส่เครื่อง Thermal cycler ที่ 25^{o} ซ เป็นเวลา 5 นาทีและ 42 ^{o}ซ เป็นเวลา 60 นาที และ 70 ^{o} ซ เป็นเวลา 15 นาที นำ cDNA ที่เตรียมได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o} ซ

1.4 การตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสด้วยวิธี multiplex RT-PCR

นำ cDNA ต้นแบบมาตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสด้วยวิธี multiplex RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจหายีนจำนวน 3 ยีนคือ M H5 และ N1 ในเวลาเดียวกัน โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl ดังนี้

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
cDNA	1 µl	
10 µM ของ primers แต่ละตัว*	1.5 µl	0.5 µM
25 mM $MgCl_2$	1 µl	1 mM
2.5 x Eppendorf MasterMix	10 µl	1x
Nuclease free water	11.5 µl	
ปริมาตรรวม	25 µl	

* primers จำเพาะต่อยีน M H5 และ N1

จากนั้นนำส่วนผสมไปเพิ่มจำนวน ในเครื่อง Thermal cycler โดยการทดลองแต่ละครั้งจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) และใช้ cDNA ที่ได้จากตัวอย่าง A/Chicken/Thailand/CU-K2/04 เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ภายใต้ PCR-condition ดังต่อไปนี้

1.	Initial denaturation	94° ซ	3 นาที
2.	Denaturation	94° ซ	30 วินาที
	Annealing	55° ซ	30 วินาที
	Extension	72° ซ	30 วินาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3.	Final extension	72° ซ	7 นาที
	Holding tempurature	25° ซ	

1.5 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วย Agarose gel electrophoresis

เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 2 % ใน 1x Tris borate-EDTA จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 10 µl ผสมกับ 0.2% Orange G loading dye ใน 50 % glyceral (Carlo Ebra Reagent ®) ปริมาตร 2 µl และแยก DNA บนแผ่นเจลด้วยโดยการใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30-45 นาที จากนั้นย้อม DNA บนแผ่นเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 10 mg/ml และนำไปตรวจสอบขนาด PCR product ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

1.6 การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ด้วยวิธี multiplex-RT PCR

การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ด้วยวิธี multiplex RT-PCR จะให้ผลการตรวจหายีน M H5 และ N1 เท่ากับ 276, 189 และ 131 bp ตามลำดับ และผลที่อาจพบได้ คือ

- ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จะให้ผลบวกต่อยีนทั้ง 3 ยีนคือ M H5 และ N1
- ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ และไม่ใช่สายพันธุ์ H5N1 จะให้ผลบวกต่อยีน M ถ้าเชื้อไวรัสเป็น H5 subtype แต่เป็น NA subtype อื่นๆ จะให้ผลบวกเฉพาะยีน M และ H5 และถ้าเชื้อไวรัสเป็น N1 subtype แต่เป็น HA subtype อื่นๆ จะให้ผลบวกเฉพาะยีน M และ N1
- ตัวอย่างที่ไม่ใช่เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ จะไม่ให้ผลบวกต่อยีนทั้ง 3 ยีนคือ M H5 และ N1 (ไม่ปรากฏ band ของ PCR product)

รายละเอียดการแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยใช้วิธี multiplex RT-PCR ได้แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การแปลผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยวิธี Multiplex RT-PCR

ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัส	ยีน		
	M	H5	N1
เชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1	+	+	+
เชื้อไวรัสอินฟลูอินซ่า เอ (ไม่ใช่ H5N1)	+	-	-
เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ เฉพาะ H5 subtype	+	+	-
เชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ เฉพาะ N1 subtype	+	-	+
ไม่พบเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซ่า เอ รวมทั้งเชื้อไข้หวัดนก H5N1	-	-	-

เครื่องหมาย + หมายถึง ผลบวกของ PCR product ที่มีขนาดจำเพาะต่อยีน H5 N1 M

ระยะที่ 2 หาลำดับเบสของยีน H5 และ N1

เมื่อตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสแล้วพบว่าตัวอย่างให้ผลบวกต่อยีน M H5 N1 ในปฏิกิริยา multiplex RT PCR จึงนำ cDNA นั้นมาหาลำดับเบส โดยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

2.1 การเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ทำการเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ในปริมาตรทั้งหมด 50 µl ประกอบด้วย

	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
cDNA	2 µl	
10 µM Forward primer	1 µl	0.2 µM
10 µM Reverse primer	1 µl	0.2 µM
25 mM $MgCl_2$	2 µl	1 mM
2.5 x Eppendorf MasterMix	20 µl	1x
Nuclease free water	24 µl	
ปริมาตรรวม	50 µl	

นำส่วนผสมไปเพิ่มจำนวนโดยใส่เครื่อง Thermal cycler ภายใต้ PCR-condition และการทดลองแต่ละครั้งจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control)

PCR-condition สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน H5

1.	Initial denaturation	94° ซ	3 นาที
2.	Denaturation	94° ซ	30 วินาที
	Annealing	50° ซ	30 วินาที
	Extension	72° ซ	1.3 นาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3.	Final extension	72° ซ	7 นาที
	Holding tempurature	25° ซ	

PCR-conditon สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน N1

1.	Initial denaturation	94° ซ	3 นาที
2.	Denaturation	94° ซ	30 วินาที
	Annealing	55° ซ	30 วินาที
	Extension	72° ซ	1.3 นาที
	ทำซ้ำในข้อ 2 จำนวน 40 รอบ		
3.	Final extension	72° ซ	7 นาที
	Holding tempurature	25° ซ	

2.2 การสกัด DNA บริสุทธิ์และหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1

2.2.1 นำ PCR procuct ไปตรวจสอบขนาดและความจำเพาะด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการตัด agarose gel ในส่วนที่มี PCR product

2.2.2 ทำการสกัด DNA ออกจากแผ่นเจลโดยใช้ชุด Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Hamburg, Germany) ซึ่งอาศัยแผ่น glass fiber membrane ในการแยก DNA ออกจากสารอินทรีย์ต่างๆที่ปนอยู่ใน DNA เพื่อให้ได้ DNA บริสุทธิ์ปริมาตร 35 µl สำหรับใช้ในการหาลำดับเบส

2.2.3 นำตัวอย่าง DNA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 ng/µl ปริมาตร 20 µl พร้อมกับส่ง forward และ reverse primers ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 µM อย่างละ 10 µl นำไปหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ด้วยวิธี Dideoxy Chain Termination ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ/หรือบริษัท macrogen เมืองโซล ประเทศเกาหลีใต้

2.2.4 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับเบสด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยข้อมูลจะอยู่ในรูปของกราฟ Chromatogram (ABI file) และลำดับเบส (Text file) และนำมาตรวจสอบความถูกต้อง

และประกอบลำดับเบส (assembly) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Chromas version 1.45 และ Bioedit version 7.0.0 ตามลำดับ

ระยะที่ 3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงและหาความสัมพันธ์ของยีน H5 และ N1

3.1 เมื่อตรวจสอบความถูกต้องและประกอบลำดับเบสแล้ว จะได้ลำดับเบสของยีน H5 (~1700 bp) และยีน N1 (~1400 bp) จึงนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน H5 และ N1 ของตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่เคยมีรายงานการระบาดในประเทศไทยและรายงานจากประเทศในทวีปเอเชีย ยุโรป ซึ่งข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกมาจากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

3.2 หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน H5 และ N1 โดยหาความสัมพันธ์ในรูปของ phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining และ bootstrap ananlysis (1,000 replications) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Mega 3.1 และอ่านผลในรูปความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ใช้ในการศึกษาจาก phylogenetic tree

3.2 หาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 และ N1 โดยเลือกตัวแทนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกที่แยกได้จากพื้นที่ในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 8 ตัวอย่าง รวมทั้งเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีไทด์และกรดอะมิโนของยีน H5 และ N1จากเชื้อไข้หวัดนกในไก่จำนวน 8 ตัวอย่างด้วยวิธี pair-wise comparison และแสดงผลในรูปเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0.0

3.3 เปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของตัวอย่างเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจำนวน 43 ตัวอย่าง ร่วมกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่มีรายงานในประเทศไทย ประเทศในทวีปเอเชีย และยุโรป เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งต่างๆของยีน H5 และ N1 ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์
Mega 3.1

3.3.1 ยีน H5 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่บริเวณ 3 ตำแหน่ง คือ

- HA cleavage site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 320-330
- receptor binding site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 222-224
- glycosylation site ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 154-156

3.3.2 ยีน N1 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่บริเวณ 2 ตำแหน่ง คือ

- NA stalk region ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 49 - 68
- NA active sites ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 119 , 293, 295 และ 275

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA

1.1 2,3-dideoxynucleoside triphosphate (dNTPS), 5mM (Fermentas®, USA)

1.2 Improm-II™ 5x Reaction buffer (Promega, Madison,WI, USA)

1.3 Improm-II™ Reverse transcriptase (Promega, Madison, WI,USA)

1.4 $MgCl_2$, 25 mM (Promega, Madison, WI, USA)

1.5 Random primers, 0.5 µg (Promega, Madison, WI, USA)

1.6 Rneasy mini kit® (Qiagen, Hilden, Germany)

1.7 Recombinant RNAsin ® Ribonuclease Inhibitor, 40 u/µl
(Promega, Madison, WI,USA)

1.8 Ultrapure ™ Distrilled water DNAse, RNAse free (GIBCO ®, USA)

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสและหาลำดับเบสของยีน

2.1 Agarose gel powder

2.2 Ethidium Bromide 10 mg/ml (Sigma Aldrich Inc., USA)

2.3 GeneRuler ™ 100 bp DNA ladder (Fermentas®, USA)

2.4 2.5x Master Mix (Eppendorf®, Hamburg, Germany)

2.5 Mg^{2+} solution, 25 mM (Eppendorf®, Hamburg, Germany)

2.6 0.2% Orange G loading dye ใน 50 % glyceral (Carlo Ebra Reagent ®)

2.7 Perfectprep Gel Cleanup kit ® (Eppendorf, Hamburg, Germany)

2.8 40x Tris-boric acid – EDTA (TBE) powder (Bio Basic Inc.®, USA)

2.9 Ultra Pure ™ Distrilled water DNAse, RNAse (GIBCO ®, USA)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1 หลอดพลาสติกสำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 ml. (Axygen Scientific®, CA, USA)

3.2 หลอดพลาสติก (eppendorf tubes) ขนาด 1.5 ml

3.3 ไมโครปิเปต ขนาด 0.5-2, 2-20, 20-200 และ 100-1000 µl (Gilson®, France)

3.4 ไมโครปิเปตทิป ขนาด 2, 200 และ 1000 µl

3.5 อุปกรณ์เครื่องแก้ววิทยาศาสตร์

4. เครื่องมือที่ในการวิจัย

4.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycler) (Thermoelectron corporation®, USA)

4.2 เครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis system) (OWL Scientific Inc.®, USA)

4.3 เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat®)

4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Denville Scientific Inc.®, USA)

4.5 ตู้แช่แข็ง -20° C

4.6 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

5. นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ (primers) ที่ใช้ในงานวิจัย

นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 3 ชุด ได้แก่

5.1 Random Hexamers ซึ่งเป็น random primers ความยาว 6 bp เพื่อใช้ในการเกาะจับกับ RNA สำหรับสังเคราะห์ cDNA

5.2 Primers สำหรับการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ด้วยวิธี multiplex RT-PCR ออกแบบโดยอาศัยข้อมูลจาก Payungporn และคณะ (2004) รายละเอียดของลำดับเบส และขนาดของ PCR product แสดงไว้ในตารางที่ 4

5.3 Primers สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1 เพื่อใช้ในการหาลำดับเบส (DNA sequencing) เป็น primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน H5 และ N1 primers ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 5 คู่ โดยยีน H5 ประกอบด้วย primers จำนวน 3 คู่และยีน N1 ประกอบด้วย primers จำนวน 2 คู่ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะมีขนาด 500- 800 bp เพื่อให้เหมาะสมต่อการหาลำดับเบส รายละเอียดของตำแหน่งของ primer ที่จับบนยีน H5 และ N1 และลำดับเบสของ primers แสดงดังรูปที่ 5 และตารางที่ 5

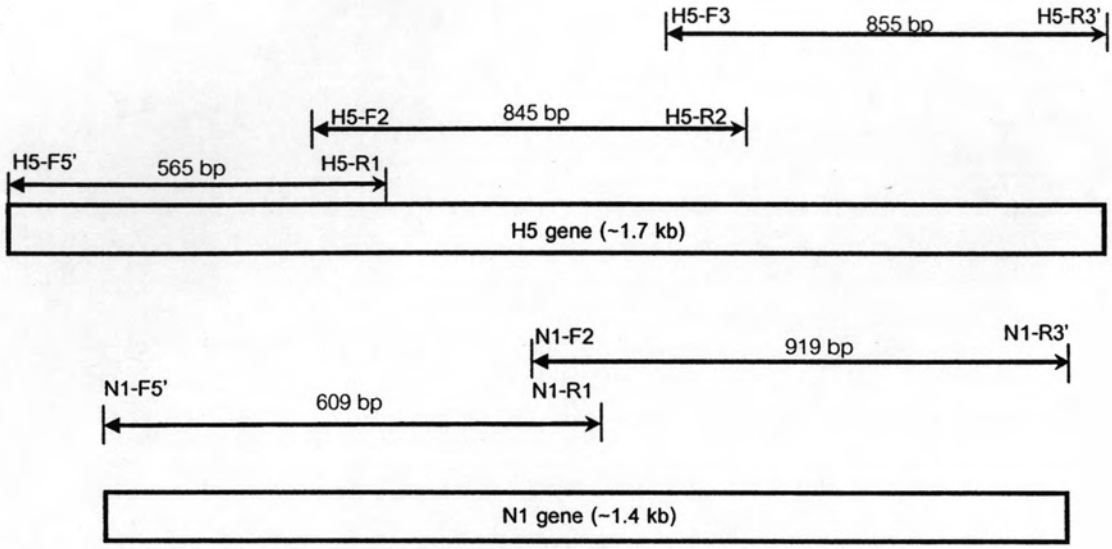
ตารางที่ 4 Primers ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ด้วย Multiplex RT-PCR

ชนิดของยีน	Primers	ลำดับเบส	ขนาด primers (bp)	ขนาดของ PCR product (bp)
M gene	MF	5'-TGATCTTCTTGAAAATTTGCAG-3'	22	276
	MR	5'-TGTTGACAAAATGACCATCG-3'	20	
H5 gene	H5F	5'-GACTCAAATGTCAAGAACCTTTA-3'	23	189
	H5R	5'-CCACTTATTTCCTCTCTGTTTAG-3'	23	
N1 gene	N1F	5'-GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC-3'	21	131
	N1R	5'-TGATAGTGTCTGTTATTATGCC-3'	21	

F = Forward primers, R= Reverse primers, bp= base pair (Payungporn et al., 2004)

ตารางที่ 5 primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน H5 และ N1

ชนิดของยีน	คู่ที่	Primer	ลำดับเบส	ขนาด primers (bp)	ตำแหน่ง bp ที่จับบนยีน	ขนาดของ PCR product (bp)
H5 gene	1	H5-F5'	5'-AGCAAAAGCAGGGGTCTGATCTG-3'	23	1-23	565
		H5-R1	5'-GCTCCTCTTTATTGTTGGGTATG-3'	23	543-565	
	2	H5-F2	5'-TGAGAAAATTCAGATCATCCCC-3'	22	409-430	845
		H5-R2	5'-CAACGGCCTCAAACTGAGTGT-3'	21	1233-1253	
	3	H5-F3	5'-ACTCCAATGGGGGCGATAAAC-3'	21	914-934	855
		H5-R3'	5'-AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTAACTAC-3'	27	1742-1768	
N1 gene	1	N1-F5'	5'-AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATG-3'	23	1-23	609
		N1-R1	5'-TGATAGTGTCTGTTATTATGCC-3'	22	588-609	
	2	N1-F2	5'-GTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC-3'	21	479-499	919
		N1-R3'	5'-AGTAGAAACAAGGAGTTTTTTGAAC-3'	25	1374-1398	



รูปที่ 5 ตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบสของยีน H5 และ N1