

สัญญาเลขที่ MS-AR-075/2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัส
ไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในเขตภาคเหนือตอนล่าง

Study of genetic variation of hemagglutinin gene of the avian influenza viruses
H5N1 isolated in lower northern Thailand

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผศ. ดร. ดลฤดี สงวนเสริมศรี

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผศ. น.สพ. ดร. พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. นาย พรชัย ชำนาญพุด

ศูนย์สุขภาพสัตว์และสุขอนามัยที่ 6 จังหวัดพิษณุโลก

3. นาง จันทร์เพ็ญ ชำนาญพุด

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง

กรมปศุสัตว์ จังหวัดพิษณุโลก

4. นาย อรรถพล ดันใส

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง

กรมปศุสัตว์ จังหวัดพิษณุโลก

5. น.ส. สมลักษณ์ กัณธิยะวงษ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

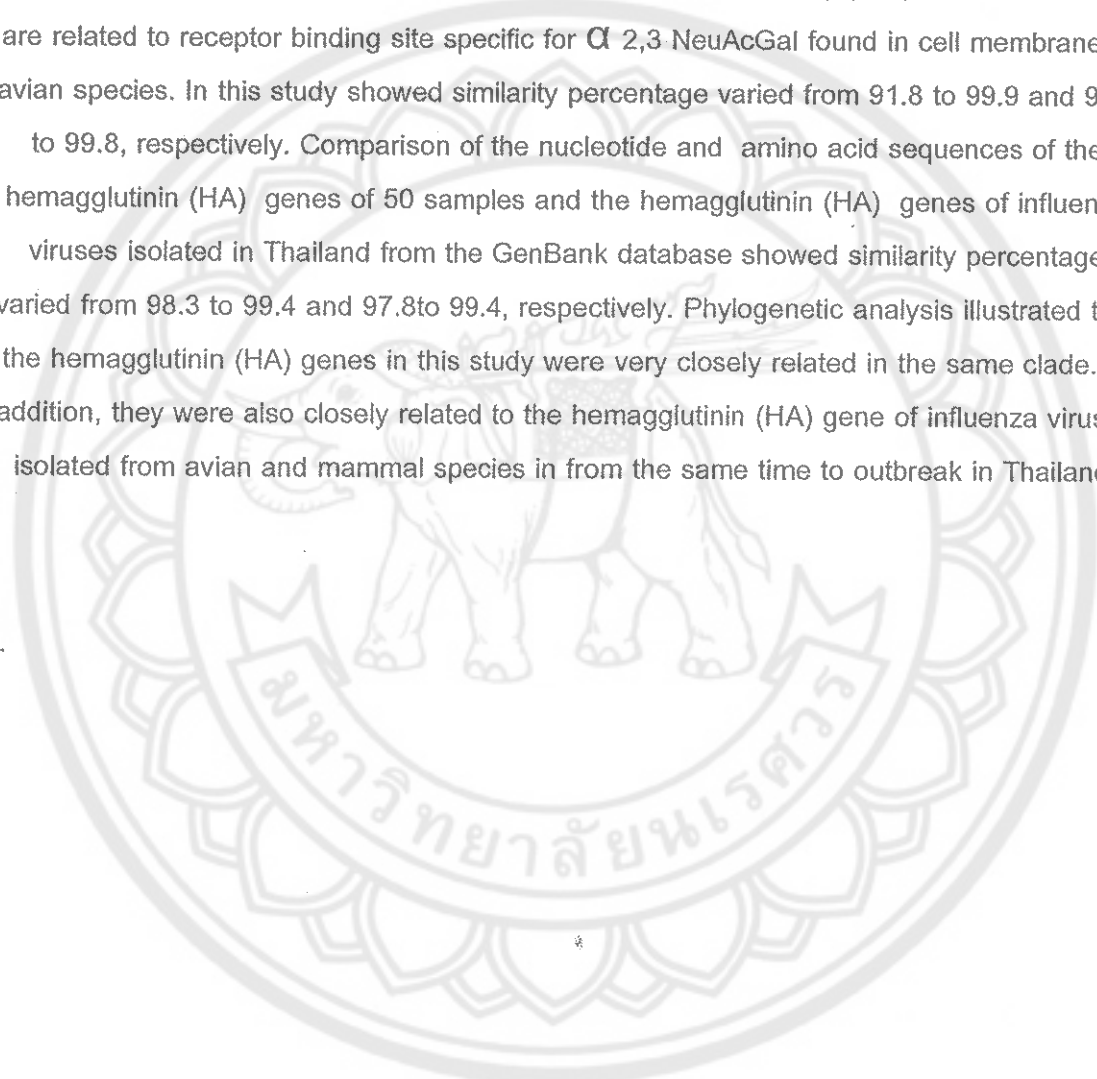
สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร .

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อวิเคราะห์รูปแบบของจีโนไทป์ และลักษณะทางพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินิน (HA) ของไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่คัดแยกได้จากการระบาดในปี พ.ศ. 2547- 2548 ในประเทศไทย ด้วยวิธีการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน HA จำนวนทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง ผลจากการศึกษาพบลักษณะการจัดเรียงตัวของชนิดกรดอะมิโนที่ HA cleavage site เป็นแบบ Polybasic amino acid ซึ่งพบสองรูปแบบคือ PQRERRRKKR และ PQREKRRKKR โดยรูปแบบแรกนั้นเป็นลักษณะที่เป็น Wild type คิดเป็นร้อยละ 86 นอกจากนี้แล้ว บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่ง ที่ 154-156 ซึ่ง Glycosylation site พบว่ามีการจัดเรียงตัวของชนิดกรดอะมิโนคือ N-S-T (Asparagine-Serine-Threonine) สำหรับตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความสัมพันธ์กับส่วนที่เป็น Receptor binding site ได้แก่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 222 และ 224 พบชนิดของกรดอะมิโนคือ Glutamine (Q) และ Glycine (G) ตามลำดับซึ่งเป็นรูปแบบที่พบในกลุ่มของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีก ในการศึกษาครั้งนี้พบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอยู่ในช่วงร้อยละ 91.8 ถึง 99.9 และเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบว่าร้อยละของความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ได้ อยู่ในช่วง 98.3 ถึง 99.4 และ 97.8 ถึง 99.4 ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่ายีน HA ที่ทำการศึกษานั้นมีความสัมพันธ์กัน นอกจากนี้แล้วในการวิเคราะห์ความผันแปรของยีน HA นั้นจะขึ้นอยู่กับค่าอัตราส่วนของ non-synonymous กับ synonymous โดยได้ทำการเปรียบเทียบในยีน HA พบว่า HA1 มีค่าเท่ากับ 0.37 ขณะที่ยีน HA2 มีค่าเท่ากับ 0.35 ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีน HA นั้นในส่วนของ HA1 subunit มีความผันแปรทางพันธุกรรมอยู่ในระดับที่สูงกว่า HA2 อยู่เพียงเล็กน้อย

ABSTRACT

The purpose of the study was to analyze genetic characterization of hemagglutinin gene of avian influenza viruses (H5N1) isolated from 2004-2005 outbreaks in Thailand in by nucleotide sequencing. At HA cleavage site, all isolates contained polybasic amino acid as PQRERRRKKR and PQREKRRKKR. Eighty-six percent of isolates are PQRERRRKKR. The amino acid at 154-156 were N-S-T (Asparagine-Serine-Threonine), which is glycosylation site. All isolates had a Glutamine (Q) at position 222 and Glycine (G) at position 224, which are related to receptor binding site specific for α 2,3 NeuAcGal found in cell membrane of avian species. In this study showed similarity percentage varied from 91.8 to 99.9 and 91.0 to 99.8, respectively. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the hemagglutinin (HA) genes of 50 samples and the hemagglutinin (HA) genes of influenza viruses isolated in Thailand from the GenBank database showed similarity percentage varied from 98.3 to 99.4 and 97.8 to 99.4, respectively. Phylogenetic analysis illustrated that the hemagglutinin (HA) genes in this study were very closely related in the same clade. In addition, they were also closely related to the hemagglutinin (HA) gene of influenza viruses isolated from avian and mammal species in from the same time to outbreak in Thailand.



Executive summary

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 จำนวนทั้งสิ้น 50 ตัวอย่างซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่คัดแยกได้จากสัตว์ปีกในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยในช่วงที่มีการระบาดของโรคระหว่างปี พ.ศ.2547-2548 โดยแบ่งออกเป็นรอบของการระบาดสามรอบด้วยกันคือ รอบที่หนึ่งในช่วงวันที่ 23 มกราคม ถึง 24 พฤษภาคม 2547 รอบที่สองในช่วงวันที่ 3 กรกฎาคม 2547 ถึง 12 เมษายน 2548 และในรอบที่สามคือ 1 กรกฎาคม ถึง 25 สิงหาคม 2548 โดยได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีแมกกลูตินินแล้วนำมาวิเคราะห์หาความผันแปรทางพันธุกรรมและหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการเปรียบเทียบกับยีนฮีแมกกลูตินินที่มีการระบาดในประเทศและประเทศในแถบภูมิภาคเอเชียที่มีการระบาดของโรคในช่วงเวลาเดียวกันนี้ ซึ่งมาจากฐานข้อมูล GenBank ผลจากการศึกษาวิจัยเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับของนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มตัวอย่างพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 91.8 - 99.9 และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนอยู่ที่ 91.0 - 99.8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะมีการระบาดของโรคในช่วงเวลาต่าง ๆ กันแต่ความผันแปรทางพันธุกรรมที่พบยังคงอยู่ในระดับที่ต่ำอยู่ และเมื่อนำมาวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยอาศัย Phylogenetic tree พบว่าตัวอย่างเชื้อไวรัสที่มาที่มีการระบาดในช่วงปี พ.ศ. 2547-2548 นั้นอยู่ในกลุ่มความสัมพันธ์เดียวกันและอยู่ใน Clade 1 viruses ถึงแม้จะมีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในบางตำแหน่งแต่ก็ยังคงลักษณะทางพันธุกรรมโดยรวมที่คล้ายกันมากกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากการระบาดของโรคที่เกิดขึ้นนั้นเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน ตัวอย่างเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษาบางตัวอย่างยังคงเป็นเชื้อไวรัสที่มีการระบาดซ้ำในพื้นที่เดียวกัน เช่น ที่จังหวัดกำแพงเพชร และจังหวัดพิษณุโลก เป็นต้น โดยพบว่าเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคทั้งสามรอบของการระบาด ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าไวรัสที่พบในรอบที่สองและที่สามนั้นยังคงเป็นไวรัสที่มีความสัมพันธ์กับไวรัสที่มีการระบาดในรอบแรก

นอกจากนี้ผลจากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีแมกกลูตินินในส่วนที่เป็น HA1 subunit และ HA2 subunit นั้นพบตำแหน่งของ Glycosylation จำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่งตำแหน่งที่สำคัญคือตำแหน่งกรดอะมิโน ที่ 154-156 ซึ่งพบที่มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นแบบ N-S-T (Asparagine-Serine-Threonine) ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะที่พบในเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีก โดยเฉพาะสายพันธุ์ H5 นอกจากนี้ยังพบได้ในเชื้อไวรัส H5N1 ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยและเวียดนามเป็นส่วนใหญ่ สำหรับการมีหรือไม่มีของตำแหน่ง Glycosylation ที่ตำแหน่งดังกล่าวนี้มีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อไวรัสซึ่งอาจจะทำให้ไวรัสสามารถหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ได้ และสำหรับตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความสัมพันธ์กับส่วนที่เป็น receptor binding site ได้แก่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 222 และ 224 พบชนิดของกรดอะมิโนคือ Glutamine (Q) และ Glycine (G) ตามลำดับซึ่งเป็นรูปแบบที่พบในกลุ่มของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกซึ่งทำให้ไวรัสสามารถจับกับ α 2,3 NeuAcGal ที่ receptor บนผิวเซลล์ของโฮสต์ และลักษณะการจัดเรียง

ตัวของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง HA cleavage site ของตัวอย่างเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษานั้นพบว่ามีสองรูปแบบคือ PQRERRRKKR และ PQREKRRKKR ถึงแม้จะมีความแตกต่างกันของชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 325 คือ Arginine (R) และ Lysine(K) แต่กรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้เป็นกรดอะมิโนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยมีองค์ประกอบทางเคมีในส่วนที่เรียกว่า positively charged R groups ซึ่งคุณสมบัติในการก่อโรครุนแรงนั้นไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใดที่พบในรายงานปัจจุบัน สำหรับรูปแบบแรกนั้นเป็นลักษณะที่เป็น Wild type คิดเป็นร้อยละ 86 จากตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1 ทั้งหมด ซึ่งลักษณะการจัดเรียงตัวแบบนี้พบได้ในกลุ่มของไวรัสที่ก่อโรครุนแรง (HPAI) ได้แก่ H5 และ H7 นอกจากนี้แล้วยังพบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ ดังตาราง 7 ยกตัวอย่างในตำแหน่งที่สำคัญๆ เช่นที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 138 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Glutamine (Q) ไปเป็น Leucine (L) โดยที่ตำแหน่งกรดอะมิโนนี้

อยู่บริเวณ Antigenic site A ซึ่งอยู่บน Globular head domain โดยมีความสัมพันธ์ในการจับ Receptor binding site และคุณสมบัติทางแอนติเจนด้วย และตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 189 ก็เป็นตำแหน่งหนึ่งที่มีความสำคัญซึ่งอยู่ติดกับ Receptor binding site และ Antigenic site B จากข้อมูลจะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Lysine (K) เป็น Methionine (M) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจจะมีผลในการจับกับ Receptor binding site และในส่วนของความผันแปรของยีน HA ผลจากการวิเคราะห์พบยีน HA1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 330 กรดอะมิโน นั้นมีอัตราส่วนของ non-synonymous (Ka) ต่อ synonymous (Ks) คือ 0.37 ในขณะที่ยีน HA2 ซึ่งมีขนาดประมาณ 222 กรดอะมิโนนั้น

มีค่า Ka/Ks เท่ากับ 0.35 ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีน HA ในส่วนของ HA1 sub unit นั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรมอยู่ในระดับที่สูงกว่า HA2 อยู่เพียงเล็กน้อย

จากผลการศึกษาทั้งหมดพอจะสรุปได้ว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินินของตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1 ที่มีการระบาดในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ.2547 ถึง พ.ศ.2548 นั้นเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าความเหมือนกันทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนพบที่มีความคล้ายกันทางด้านลักษณะทางพันธุกรรมถึงแม้ว่าจะเป็นไวรัสที่มีการระบาดต่างช่วงเวลา แต่ยังคงพบที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับกรดอะมิโนบางตำแหน่งเกิดขึ้นด้วยเช่นกัน

เนื้อหางานวิจัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้เป็นตัวอย่าง RNA จำนวน 50 ตัวอย่างของไวรัส Influenza A สายพันธุ์ H5N1 ที่สกัดได้จากช่วงที่มีการระบาดของเชื้อไข้หวัดนก Influenza A สายพันธุ์ H5N1 ในประเทศไทย พ.ศ.2547-2548 ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 3 และตารางที่ 4 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือ (ตอนล่าง) กรมปศุสัตว์ อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก จำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมด 50 ตัวอย่างนั้น เป็นตัวอย่างที่มาจากพื้นที่ในเขตภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างโดยสามารถแบ่งตามชนิดสัตว์ปีกได้ 2 กลุ่มหลักๆ คือ เป็ดและไก่ โดยตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1 ทั้งหมดนั้นมาจากช่วงการระบาดทั้งสามระลอกที่เกิดขึ้นในประเทศไทยคือ ครั้งที่ 1 เกิดขึ้น ในช่วง 23 มกราคม-24 พฤษภาคม 2547 ครั้งที่ 2 ในช่วง 3 กรกฎาคม 2547-12 เมษายน 2548 และในครั้งที่ 3 คือ 1 กรกฎาคม-25 สิงหาคม 2548 โดยที่ภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างนั้นเป็นพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสัตว์ปีกเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะไก่จากสถิติของกรมปศุสัตว์ในปี พ.ศ.2547 พบว่าในเขตพื้นที่ภาคกลางมีการเลี้ยงไก่ถึง 89,684,664 ตัว รองลงมาคือภาคเหนือ ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 28,07,9419 ตัว นอกจากนี้แล้วในปี พ.ศ.2548 มีสถิติการเลี้ยงไก่ในประเทศไทยเพิ่มขึ้น คือ ในเขตภาคกลาง มีจำนวนทั้งสิ้น 135,513,828 ตัว ภาคเหนือ 38,723,520 ดังนั้นพื้นที่การระบาดของโรคไข้หวัดนกส่วนใหญ่จึงอยู่ในเขตพื้นที่ดังกล่าวนี้

ตาราง 3 แสดงแหล่งที่มาของตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1 ที่นำมาวิจัย

ลำดับที่	จังหวัด	จำนวน(ตัวอย่าง)	ชนิดของสัตว์		
			ไก่	เป็ด	อื่นๆ
1	กำแพงเพชร	13	3	10	-
2	นครสวรรค์	7	6	1	-
3	พิจิตร	4	1	2	1(นกกระทา)
4	พิษณุโลก	9	5	3	1(นกกระจอก)
5	เพชรบูรณ์	3	2	1	-
6	สุโขทัย	7	5	1	1(นกกระทา)
7	อุตรดิตถ์	3	2	-	1(นกพิราบ)
8	อุทัยธานี	4	2	2	-
รวมทั้งสิ้น		50	26	20	4

ตาราง 4 แสดงตัวอย่างไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ชื่อ	จังหวัด	อำเภอ	ชนิดสัตว์
----------	------	---------	-------	-----------

1	A/Ck/THA/ST-01/04	สุโขทัย	กงไกรลาศ	ไก่ไข่
2	A/DK/THA/PC-01/04	พิจิตร	สามง่าม	เปิด
3	A/Pl/THA/ST-01/04	สุโขทัย	ทุ่งเสลี่ยม	นกกกระทา
4	A/DK/THA/KP-01/04	กำแพงเพชร	เมือง	เปิดไข่
5	A/Ck/THA/NW-02/04	นครสวรรค์	-	ไก่
6	A/Ck/THA/PB-01/04	เพชรบูรณ์	เมือง	ไก่เนื้อ
7	A/Ck/THA/PB-02/04	เพชรบูรณ์	เมือง	ไก่เนื้อ
8	A/Ck/THA/ST-02/04	สุโขทัย	กงไกรลาศ	ไก่
9	A/Qu/THA/PC-01/04	พิจิตร	วชิรบารมี	นกกกระทา
10	A/Pg/THA/UT-01/04	อุตรดิตถ์	-	นกพิราบ
11	A/Ts/THA/PL-01/04	พิษณุโลก	-	นกกกระทา
12	A/Dk/THA/ST-01/04	สุโขทัย	เมือง	เปิด
13	A/Ck/THA/PL-02/04	พิษณุโลก	วังทอง	ไก่ไข่

ตาราง 4 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อ	จังหวัด	อำเภอ	ชนิดสัตว์
----------	------	---------	-------	-----------

14	A/CK/THA/PL-03/04	พิจิตร	เมือง	โกไข่
15	A/CK/THA/PC-01/04	สุโขทัย	ตะพานหิน	โกไข่
16	A/CK/THA/KP-01/04	กำแพงเพชร	เมือง	โกพื้นเมือง
17	A/CK/THA/ST-2-01/04	นครสวรรค์	สวรรค์โลก	โกพื้นเมือง
18	A/CK/THA/UT-2-01-04	เพชรบูรณ์	ลับแล	โกพื้นเมือง
19	A/CK/THA/UT-2-02/04	เพชรบูรณ์	ลับแล	โกไข่
20	A/CK/THA/KP-2-03/04	สุโขทัย	คลองลาน	โกพื้นเมือง
21	A/CK/THA/KP-2-04/04	พิจิตร	เมือง	โกไข่
22	A/CK/THA/NW-2-04/04	อุตรดิตถ์	แม่वंศ์	โกพื้นเมือง
23	A/CK/THA/NW-2-05/04	พิษณุโลก	ลาดยาว	โกพื้นเมือง
24	A/CK/THA/NW-2-06/04	สุโขทัย	หนองบัว	โกเนื้อ
25	A/CK/THA/NW-2-07/04	พิษณุโลก	เมือง	โกไข่
26	A/DK/THA/NW-2-02/04	พิษณุโลก	ชุมแสง	เปิด
27	A/CK/THA/UN-2-03/04	พิจิตร	สว่างอารมณ์	โกพื้นเมือง
28	A/DK/THA/UN-2-02/04	กำแพงเพชร	ทับทัน	เปิด
29	A/DK/THA/PL-2-01/04	สุโขทัย	บางระกำ	เปิด
30	A/CK/THA/PL-2-03/04	อุตรดิตถ์	บางกระทุ่ม	โกพื้นเมือง
31	A/DK/THA/PC-2-02/04	อุตรดิตถ์	สามง่าม	เปิด
32	A/DK/THA/PB-2-0040/04	กำแพงเพชร	เมือง	เปิด
33	A/DK/THA/KP-2-0041/04	กำแพงเพชร	ไทรงาม	เปิด
34	A/DK/THA/KP-2-0043/04	นครสวรรค์	คลองขลุง	เปิด
35	A/DK/THA/PL-2-0044/04	นครสวรรค์	นครไทย	เปิด
36	A/DK/THA/PL-2-0042/04	นครสวรรค์	-	เปิด
37	A/CK/THA/ST-3-0005/05	นครสวรรค์	ศรีลัชนาลัย	โกพื้นเมือง
38	A/CK/THA/NW-3-0009/05	นครสวรรค์	เมือง	โกไข่
39	A/DK/THA/UN-3-0008/05	อุทัยธานี	ทับทัน	เปิด
40	A/CK/THA/PL-3-0012/05	อุทัยธานี	พรหมพิราม	โกพื้นเมือง
41	A/CK/THA/PL-3-0011/05	พิษณุโลก	พรหมพิราม	โกพื้นเมือง
42	A/CK/THA/UN-3-0007/05	พิษณุโลก	เมือง	โกพื้นเมือง
43	A/CK/THA/KP-3-03/05	กำแพงเพชร	คลองขลุง	โกพื้นเมือง

ตาราง 4 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อ	จังหวัด	อำเภอ	ชนิดสัตว์
----------	------	---------	-------	-----------

44	A/Ck/THA/KP-3-0006/05	กำแพงเพชร	คลองขลุง	โกพื้นเมือง
45	A/Ck/THA/KP-3-05/05	กำแพงเพชร	บึงสามัคคี	โกพื้นเมือง
46	A/Ck/THA/KP-3-07/05	กำแพงเพชร	ทรายทองฯ	โกพื้นเมือง
47	A/Ck/THA/KP-3-0008/50	กำแพงเพชร	บึงสามัคคี	โกพื้นเมือง
48	A/Ck/THA/KP-3-0009/50	กำแพงเพชร	ไทรงาม	โกพื้นเมือง
49	A/Ck/THA/KP-3-0010/50	กำแพงเพชร	บึงสามัคคี	โกพื้นเมือง
50	A/Ck/THA/ST-3-0013/50	สุโขทัย	บ้านด่านฯ	โกพื้นเมือง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่อง Thermal cycle (Eppendorf master cycle gradient)
2. เครื่องวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

(ABI PRISM DNA sequencer version 310:Applied Biosystems)

3. ชุดถ่ายภาพ UV transmission (Gel documentation: Biorad 2000)

4. ชุดอุปกรณ์สำหรับทดสอบ Electrophoresis (Biorad)

5. ตู้สำหรับทำ PCR

6. อุปกรณ์พื้นฐานทั่วไปที่มีในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยา เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge: Eppendorf 5417R), ไมโครปิเปต (micro pipette) เป็นต้น

วิธีการวิจัย

การทำการวิจัยจะเริ่มต้นตั้งแต่ขั้นตอนการสกัด RNA จนกระทั่งถึงหาลำดับนิวคลีโอไทป์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การสกัดอาร์เอ็นเอ ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาแยกได้จากการเลี้ยงเชื้อ Influenza A ในไข่ไก่อายุ 8-10 วันที่ปราศจากเชื้อเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณไวรัสแล้วนำส่วนที่เป็น Allantoic fluid ที่มีเชื้อไวรัส Influenza A เจริญอยู่นำมาสกัดเอาเฉพาะอาร์เอ็นเอของไวรัสเท่านั้น โดยใช้ชุดสกัด RNeasy mini kit (Qiagen, California, USA) โดยวิธีการสกัดจะทำตามคู่มือของชุดสกัด ดังนี้ นำ Allantoic fluid 200 ul รวมกับ RLT buffer 150 µl ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาทีหลังจากนั้น เติม 70% ethanol 350 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดเอาส่วนผสมทั้งหมดดังกล่าวใส่ลง Spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลาหนึ่งนาทีครึ่ง ทิ้งส่วนที่ตกลงมาแล้วเติม RW1 700 µl แล้วปั่นต่อโดยที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม หลังจากนั้นทิ้งส่วนที่ตกลงมา แล้วเติม RPE buffer 500 µl ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งทิ้งส่วนที่ตกลง

มาหลังจากนั้นก็ทำการปั่นซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดเอา RPE buffer ที่เหลือออกให้หมด ขั้นตอนสุดท้ายคือย้าย Spin column ออกมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml แล้วเติม RNase free water 50 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 1400 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อเป็นการล้างเอาอาร์เอ็นเอออกมา แล้วจึงเก็บส่วนที่ตกกลงในหลอด 1.5 ml ซึ่งเป็นส่วนที่มีอาร์เอ็นเอของไวรัส เก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การสังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ (complementary DNA: cDNA) วิธีการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น cDNA จะใช้ชุดส่วนผสมสำเร็จรูปในการทำ Reverse transcription (Qiagen) โดยมีส่วนผสมดังต่อไปนี้ Uni 12 primer (5' AGCAAAAGCAGG3') [47] จำนวน 2 μ l (ความเข้มข้นรวม 1 μM) ซึ่งเป็น primer ที่จะเปลี่ยนอาร์เอ็นเอทั้ง 8 ท่อนเป็น cDNA, dNTPs mixed 2 μ l (ความเข้มข้นรวม 0.5 μM), Omniscript reverse transcriptase 1 μ l (4.0 unit), 10X RT buffer 2 μ l (1X), RNA 1 μ l (1 μg) และ RNase free water ปรับปริมาตรให้ได้ส่วนผสมรวม 20 μ l เมื่อส่วนผสมประกอบทั้งหมดเข้ากันแล้ว ขั้นตอนต่อไป คือ บ่มไว้ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ภายหลังจากเสร็จกระบวนการทั้งหมดแล้ว สามารถเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่ -20°C ได้จนกว่าจะมีการนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. ขบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction: PCR) ในขั้นตอนนี้เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอให้มากพอที่จะนำมาศึกษาและมีความจำเพาะโดยจะใช้ Universal primer set [41] ที่มีความจำเพาะกับยีน HA ของเชื้อไวรัส Influenza A ดังนี้คือ Bm-HA-1/ Bm-NS-890R ส่วนองค์ประกอบของปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน HA ซึ่งยีนมีขนาดประมาณ 1.8 kb ชุดที่ใช้สำหรับการทำ PCR ยีนนี้ก็คือ Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) ปฏิกิริยาประกอบด้วย 10 PCR buffer 5 μ l (1X), 10 mM dNTPs 1 μ l (0.2mM), 50mM MgCl_2 2.0 μ l (2.0mM), 10 μM primer (HA) 1 μ l (0.2 μM), Platinum Taq 0.2 μ l (1.0 U), cDNA 3 μ l และปรับปริมาตรให้เป็น 50 μ l ด้วย ddH₂O โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนคือ 94°C นาน 2 นาทีตามด้วย 94°C นาน 30 วินาที, 50°C (Annealing temperature) นาน 40 วินาที และ 72°C นาน 3 นาที จำนวน 30 รอบและอุณหภูมิสุดท้าย 72°C นาน 10 นาที [41]

4. การวิเคราะห์ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) หลังจากที่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ primer ที่แตกต่างกันในแต่ละยีนตามที่ต้องการแล้วขั้นตอนการวัดขนาดของดีเอ็นเอก็เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะบ่งบอกได้ว่าดีเอ็นเอที่ได้มีการเพิ่มจำนวนไปนั้นเป็นชิ้นส่วนที่เราต้องการหรือไม่ จึงได้มีการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าโดย

อาศัยคุณสมบัติความเป็นขั้วไฟฟ้าของดีเอ็นเอ ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า Electrophoresis โดยแยกดีเอ็นเอผ่านตัวกลาง คือ Agarose gel (2%) โดยย้อมด้วย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 250 bp DNA ladder (Roche) และ 100 bp DNA ladder (New England Biolab) และใช้ 1X TAE buffer สำหรับการแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า จะใช้ PCR products ใส่ลงในหลุมประมาณ 10 µl รวมกับ Loadind dye เพื่อเป็นส่วนผสมในการถ่วงดีเอ็นเอ ลงกันหลุมไม่ให้ฟุ้งกระจาย ส่วนปริมาณไฟฟ้าที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอ คือ 90-110 V ใช้เวลา ประมาณ 30-45 นาที ดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV

5. การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (PCR purification) หลังจากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามที่ต้องการแล้วและทราบแล้วว่าเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เราต้องการ ขั้นตอนต่อไปเป็นการทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ โดยใช้ ExoSap-IT (GE Healthcare Life Sciences) โดยใช้เอนไซม์ 2 µl ต่อ PCR product 5 ตามคู่มือการใช้เอนไซม์

6. ปฏิกริยาการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing reaction) ก่อนที่จะนำดีเอ็นเอเข้าเครื่องเพื่อวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์นั้น ขั้นตอนในการทำ cycle sequencing จึงเป็นสิ่งจำเป็นโดยจะใช้ชุดน้ำยา Big-dye terminator sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystem, California, USA) โดยผสมส่วนประกอบดังต่อไปนี้ ddH₂O 4 µl, PCR product 2 µl Specific primer(3.2 pmol) ดังตาราง 3.2, Big-dye buffer 1 µl (0.5X) และ Big-dye terminator V 3.1 2 µl ซึ่งจะมีปริมาตรรวม 10 µl เมื่อรวมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันแล้ว ขั้นตอนให้นำเข้าเครื่อง Thermal cycle (Eppendorf master cycle gradient) ตั้งโปรแกรมไว้ที่ 96 °C นาน 1 นาทีตามด้วย 96 °C นาน 10 วินาที 50 °C นาน 5 วินาทีและ 60 °C นาน 4 นาที จำนวน 25 รอบ

7. การกำจัด Dye terminator โดยจะใช้วิธี Ethanol precipitation คือจะตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้ Ethanol เพื่อกำจัดเอาส่วนที่เหลือจากชุดน้ำยา Big-dye terminator sequencing kit version 3.1 ออกไป ซึ่งจะส่งผลในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป สิ่งแรกที่ต้องทำคือ เมื่อได้ DNA sequencing product ปริมาตร 10 µl ให้นำมาใส่หลอดขนาด 1.5 แล้วจากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 2 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม 95% Ethanol 25 µl บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และหุ้มด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันการสัมผัสกับแสง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 18000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งในขณะเดียวกันต้องระมัดระวังไม่ให้ดูดเอาส่วนที่ตกตะกอนออกไปด้วย ต่อจากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 250 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 18000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีหลังจากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง

เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นนำไประเหยเอา Ethanol ออกโดยเปิดฝาลดออกแล้วใส่ Heat block ที่ 90 °C นาน 1 นาที ซึ่งจะได้ตะกอนของดีเอ็นเอแห้งอยู่ที่หลอด ขั้นตอนสุดท้ายเติม Hidi-formamide ปริมาตร 25 μ l ผสมให้เข้ากันจนตะกอนดีเอ็นเอละลายจนหมดจากนั้นนำไปต้มที่ 90 °C นาน 2 นาที โดยปิดฝาลดไว้เพื่อป้องกันการระเหย และนำมาแช่เย็นทันทีที่ 4 °C นาน 2 นาที แล้วจึงดูดใส่หลอดเพื่อเข้าเครื่อง Genetic analyzer 310 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จะใช้เครื่องมืออัตโนมัติ ABI PRISM Genetic analyzer 310 (Applied Biosystems) ร่วมกับโปรแกรมที่ใช้ช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูล Sequencing analysis (ABI) และ BIOEDIT (version 5.0.6) เพื่อใช้ในการ Pairwise Alignment เปรียบเทียบข้อมูลและการจัดเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส Influenza ที่ได้มีการศึกษา มาก่อนหน้านี้แล้วกับฐานข้อมูลของ GenBank

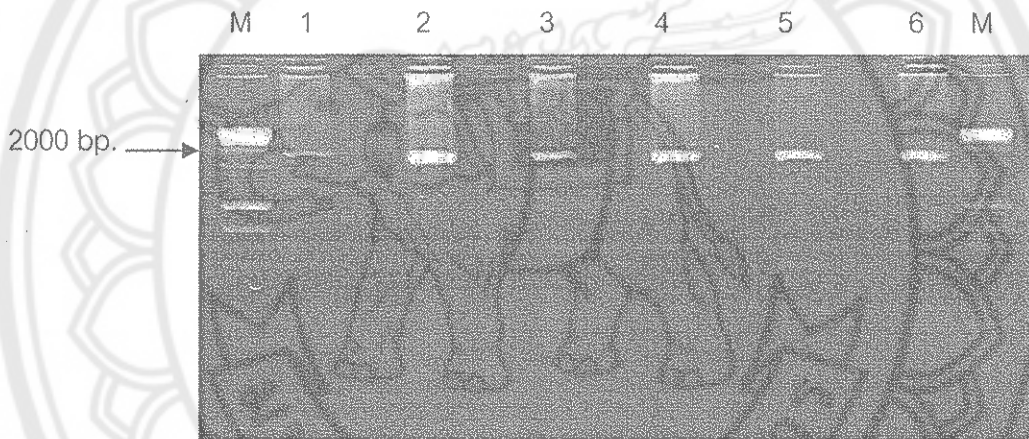
ตาราง 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ sequencing primer

Primer name	Nucleotides (5'-3')
F-Bm-HA-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGGG
F-HA-228	GCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGAC
R-HA-515	GCACTGTTCTTT(GT)TGATAAGCCATA
R-HA-735	TCCATTACTCTCGAAGTTGATTGCA
F-HA-669	GGGACATCAACACTAAACCAGA
F-HA-886	ACTCCAATGGGGGCGATAAC
F-HA-1168	GACAAAGAATCCACTCAAAGGCAA
R-HA-1295	TTCTCTATTCTCCTTTCTAAGTTGT
R-HA-1522	CGTTTCTTACACTTTCATACATTC

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน HA

ยีน HA หรือยีนฮีแมกกลูตินิน มีขนาดประมาณ 1.8 kb ซึ่งจะถูกกำหนดเป็นโปรตีนฮีแมกกลูตินินที่มีขนาดประมาณ 566 amino acid จากการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: Platinum Taq) โดยอาศัย Specific primer ที่มีความจำเพาะกับยีน HA คือ Bm-HA-1 และ Bm-NS-890R จะได้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 1.8 kb ดังภาพ 7



ภาพ 7 แสดงขนาดของยีน HA ของเชื้อไวรัส Avian Influenza A (H5N1) จากตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้แก่ ตัวเลขที่ 1-6 แสดงลำดับของตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวแทนจากตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมด 50 ตัวอย่างโดยให้ผลเหมือนกันทั้งหมด

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

เมื่อได้ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจำลองกรดอะมิโนด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์แล้วนั้น จึงได้ submit ลงในฐานข้อมูล GeneBank เพื่อให้เป็นตัวอย่างอ้างอิง ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 แสดงแหล่งที่มาของตัวอย่างและ accession number ที่ได้ submit ใน GenBank

ลำดับที่	Accession number	ชื่อ	จังหวัด	อำเภอ	ชนิดสัตว์
1	AY553785	A/CK/THA/ST-01/04	สุโขทัย	กงไกรลาศ	ไก่ไข่
2	AY553786	A/DK/THA/PC-01/04	พิจิตร	สามง่าม	เป็ด
3	AY553791	A/PI/THA/ST-01/04	สุโขทัย	ทุ่งเสลี่ยม	นกกกระทา
4	AY553797	A/DK/THA/KP-01/04	กำแพงเพชร	เมือง	เป็ดไข่
5	AY553798	A/CK/THA/NW-02/04	นครสวรรค์	-	ไก่
6	AY553799	A/CK/THA/PB-01/04	เพชรบูรณ์	เมือง	ไก่เนื้อ
7	AY553800	A/CK/THA/PB-02/04	เพชรบูรณ์	เมือง	ไก่เนื้อ
8	AY553801	A/CK/THA/ST-02/04	สุโขทัย	กงไกรลาศ	ไก่
9	FJ265565	A/PI/THA/PC-01/04	พิจิตร	วชิรบำรุง	นกกกระทา
10	FJ265566	A/Pg/THA/UT-01/04	อุตรดิตถ์	-	นกพิราบ
11	FJ265567	A/Ts/THA/PL-01/04	พิษณุโลก	-	นกกะจอก
12	AY553792	A/DK/THA/ST-01/04	สุโขทัย	เมือง	เป็ด
13	AY553793	A/CK/THA/PL-02/04	พิษณุโลก	วังทอง	ไก่ไข่
14	AY553794	A/CK/THA/PL-03/04	พิษณุโลก	เมือง	ไก่ไข่
15	AY553795	A/CK/THA/PC-01/04	พิจิตร	ตะพานหิน	ไก่ไข่
16	AY553796	A/CK/THA/KP-01/04	กำแพงเพชร	เมือง	ไก่พื้นเมือง
17	DQ017277	A/CK/THA/ST-2-01/04	สุโขทัย	สวรรคโลก	ไก่พื้นเมือง
18	DQ017281	A/CK/THA/UT-2-01-04	อุตรดิตถ์	ลับแล	พื้นเมือง
19	DQ017282	A/CK/THA/UT-2-02/04	อุตรดิตถ์	ลับแล	ไก่ไข่
20	DQ017274	A/CK/THA/KP-2-03/04	กำแพงเพชร	คลองลาน	ไก่พื้นเมือง
21	DQ017304	A/CK/THA/KP-2-04/04	กำแพงเพชร	เมือง	ไก่ไข่
22	DQ017271	A/CK/THA/NW-2-04/04	นครสวรรค์	แม่वंศ์	ไก่พื้นเมือง
23	DQ017294	A/CK/THA/NW-2-05/04	นครสวรรค์	ลาดยาว	ไก่พื้นเมือง

ตาราง 6 (ต่อ)

ลำดับที่	Accession number	ชื่อ	จังหวัด	อำเภอ	ชนิดสัตว์
24	DQ017302	A/CK/THA/NW-2-06/04	นครสวรรค์	หนองบัว	ไก่เนื้อ
25	DQ017307	A/CK/THA/NW-2-07/04	นครสวรรค์	เมือง	ไก่ไข่
26	DQ017300	A/DK/THA/NW-2-02/04	นครสวรรค์	ชุมแสง	เปิด
27	DQ017293	A/CK/THA/UN-2-03/04	อุทัยธานี	สร้างอารมณ์	ไก่พื้นเมือง
28	DQ017303	A/DK/THA/UN-2-02/04	อุทัยธานี	ทับทัน	เปิด
29	DQ017272	A/DK/THA/PL-2-01/04	พิษณุโลก	บางระกำ	เปิด
30	DQ017283	A/CK/THA/PL-2-03/04	พิษณุโลก	บางกระทุ่ม	ไก่พื้นเมือง
31	DQ017285	A/DK/THA/PC-2-02/04	พิจิตร	สามง่าม	เปิด
32	EF582394	A/DK/THA/PB-2-0040/04	เพชรบูรณ์	เมือง	เปิด
33	EF582395	A/DK/THA/KP-2-0041/04	กำแพงเพชร	ไทรงาม	เปิด
34	EF582397	A/DK/THA/KP-2-0043/04	กำแพงเพชร	คลองขลุง	เปิด
35	EF582398	A/DK/THA/PL-2-0044/04	พิษณุโลก	นครไทย	เปิด
36	EF582396	A/DK/THA/PL-2-0042/04	พิษณุโลก	-	เปิด
37	FJ265568	A/CK/THA/ST-3-0005/05	สุโขทัย	ศรีสำริด	ไก่พื้นเมือง
38	FJ265569	A/CK/THA/NW-3-0009/05	นครสวรรค์	เมือง	ไก่ไข่
39	FJ265570	A/DK/THA/UN-3-0008/05	อุทัยธานี	ทับทัน	เปิด
40	FJ265571	A/CK/THA/PL-3-0012/05	พิษณุโลก	พรหมพิราม	ไก่พื้นเมือง
41	EF582406	A/CK/THA/PL-3-0011/05	พิษณุโลก	พรหมพิราม	ไก่พื้นเมือง
42	FJ265572	A/CK/THA/UN-3-0007/05	อุทัยธานี	เมือง	ไก่พื้นเมือง
43	DQ251796	A/CK/THA/KP-3-03/05	กำแพงเพชร	คลองขลุง	ไก่พื้นเมือง
44	FJ265573	A/CK/THA/KP-3-0006/05	กำแพงเพชร	คลองขลุง	ไก่พื้นเมือง
45	DQ251798	A/CK/THA/KP-3-05/05	กำแพงเพชร	บึงสามัคคี	ไก่พื้นเมือง
46	DQ251800	A/CK/THA/KP-3-07/05	กำแพงเพชร	ทรายทองฯ	ไก่พื้นเมือง
47	FJ265574	A/CK/THA/KP-3-0008/50	กำแพงเพชร	บึงสามัคคี	ไก่พื้นเมือง
48	FJ265575	A/CK/THA/KP-3-0009/50	กำแพงเพชร	ไทรงาม	ไก่พื้นเมือง
49	FJ265576	A/CK/THA/KP-3-0010/50	กำแพงเพชร	บึงสามัคคี	ไก่พื้นเมือง
50	FJ265577	A/CK/THA/ST-3-0013/50	สุโขทัย	บ้านด่านฯ	ไก่พื้นเมือง

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HA

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HA ของเชื้อไวรัส H5N1 ที่นำมาศึกษาโดยระบาด ในช่วงปี พ.ศ. 2547-2548 นั้นมีขนาดประมาณ 1704 bp โดยจะแสดงในภาคผนวก สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HA นั้นจะอาศัยปฏิกิริยา DNA cycle sequencing reaction โดยใช้ sequencing primer ดังตารางที่ 5

2. ลำดับของกรดอะมิโนของยีน HA

การหาลำดับของกรดอะมิโนของยีน HA ผลที่ได้คือมีขนาด 552 amino acid ซึ่งแสดงในภาคผนวก นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน HA จากตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1 ทั้ง 50 ตัวอย่างด้วยกัน พบว่ามีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆทั้งในส่วนที่เป็น HA1 และ HA2 ซึ่งความแตกต่างของกรดอะมิโนที่พบเหล่านี้สามารถจัดแบ่งออกเป็น 33 กลุ่มตามตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ ดังตารางที่ 7 โดยจะเห็นว่าในบางตำแหน่งเช่นตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 367 นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเป็นสองแบบ โดยเปลี่ยนจาก Aspartic acid ไปเป็น Glutamic acid และ Asparagine นอกจากนี้แล้วตำแหน่งของกรดอะมิโนที่พบมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือตำแหน่งที่ 325 ซึ่งอยู่บริเวณ HA cleavage site ซึ่งเปลี่ยนจาก Arginine เป็น Lysine โดยคิดเป็นร้อยละ 14 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาศึกษา สำหรับลักษณะการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง HA cleavage site ของตัวอย่างเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษานั้นพบว่ามีสองรูปแบบคือ PQRERRRKKR และ PQREKRRKKR ซึ่งรูปแบบแรกนั้นเป็นลักษณะที่เป็น Wild type คิดเป็นร้อยละ 86 ของตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1 ทั้งหมดที่ศึกษา โดยที่รูปแบบการจัดเรียงตัวแบบ PQRERRRKKR เป็นลักษณะที่มีรายงานว่าพบในปี พ.ศ.2546-2547 ที่ฮ่องกง เวียดนาม และไทย ในขณะที่ PQREKRRKKR พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Arginine(R) เป็น Lysine(K) โดยที่กรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้เป็นกรดอะมิโนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันคือองค์ประกอบทางเคมีในส่วนที่เรียกว่า positively charged R groups คุณสมบัติในการก่อโรคของเชื้อไวรัส H5N1 ที่มีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนทั้งสองชนิดนั้นไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งมีรายงานว่าพบในประเทศไทยในพ.ศ.2547 ซึ่งการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนี้ถึงแม้จะยังไม่ทราบถึงผลกระทบจากสิ่งที่เกิดขึ้นอย่างแน่นอนแต่คาดว่าน่าจะมีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัส H5N1 ในกรณีที่มีการติดเชื้อในคน ซึ่งเชื้อไวรัสเองก็มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมและในการดำรงเผ่าพันธุ์ นอกจากนี้จากตารางจะเห็นว่า ที่ตำแหน่ง กรดอะมิโนที่ 138 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Glutamine (Q)ไปเป็น Leucine (L) โดยที่ตำแหน่งกรดอะมิโนนี้ อยู่บริเวณ Antigenic site A ซึ่งอยู่บน Globular head domain โดยมีความสัมพันธ์ในการจับ Receptor binding site และคุณสมบัติทางแอนติเจนด้วย ปกติในเชื้อไวรัส H5N1 ที่มี

การระบาดในปี พ.ศ.2547-2548 นั้นจะพบกรดอะมิโนชนิด Glutamine (Q) ที่ตำแหน่งนี้ ซึ่งจากการวิจัยเชื้อไวรัสทั้ง 50 ตัวอย่างพบว่าเกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อไวรัส H5N1 สองตัวอย่างซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่คัดแยกได้ในปี พ.ศ.2548 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 4 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 189 ก็เป็นตำแหน่งหนึ่งที่มีความสำคัญซึ่งอยู่ติดกับ Receptor binding site และ Antigenic site B จากข้อมูลจะเห็นว่ามี การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Lysine (K) เป็น Methionine (M) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจจะมีผลในการจับกับ Receptor binding site ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของเชื้อไวรัส ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจทำให้รูปร่างของ Receptor เปลี่ยนไป ระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ไม่สามารถจดจำได้ ก็จะทำให้ให้ไวรัสนี้หลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน ซึ่งมีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรค

ตาราง 7 แสดงตำแหน่งและชนิดของกรดอะมิโนที่เกิดการกลายพันธุ์จากตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1 ที่นำมาศึกษาจำนวนทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง

กลุ่ม	ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เกิดการกลายพันธุ์	ตัวอย่างที่	ชนิดของสัตว์ที่ติดเชื้อ		
			ไก่	เป็ด	ชนิดอื่นๆ
1	7Y→S	13	1	-	-
2	86V→I	13,15,34,38,50	3	2	-
3	92P→S	19	-	1	-
4	103H→L	28	1	-	-
5	115Q→H	34,35,36	1	2	-
6	119K→R	15	-	1	-
7	138Q→L	37,43	2	-	-
8	140K→R	37	1	-	-
9	146N→S	43	1	-	-
10	185A→T	3,10,22,43,44,46	3	2	1
11	189K→M	31,38	1	1	-
12	200V→I	31,38	1	1	-
13	210V→I	3,10,22,43,44,46	3	2	1
14	227E→G	19	-	1	-
15	232I→L	16	1	-	-
16	243S→R	29	1	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่ม	ตำแหน่งกรดอะมิโน ที่เกิดการกลายพันธุ์	ตัวอย่าง	ชนิดของสัตว์ที่ติดเชื้		
			ไก่	เป็ด	ชนิดอื่นๆ
17	244N→F	19	-	1	-
18	295H→P	48	1	-	-
19	310R→K	22,40	1	1	-
20	312V→I	37	1	-	-
21	325R→K	8,9,25,30,34,35,38	4	1	2
22	367D→E	22	1	1	-
	367D→N	26			
23	368K→Q	21	-	1	-
24	371T→S	18,19,21,23,26,50	3	2	-
25	383N→H	32	-	1	-
26	388D→N	17,22,24,26,27,32,41,43,44	7	2	-
27	412K→Q	21	1	-	-
28	429L→M	12,23,30,38	3	1	-
29	482V→I	43	1	-	-
30	498L→I	1,10	1	-	1
31	511I→T	22,44,46,47,49	4	1	-
32	528A→T	7,19,21	1	1	1
33	542S→F	44	1	-	-

ตาราง 8 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน
ของยีน HA จากตัวอย่างที่นำมาศึกษากับฐานข้อมูล GenBank

Avian influenza H5N1 viruses	Tg/Thai/04 ¹		Ts/Thai/05 ²		Ck/VN/04 ³		JP52a/05 ⁴	
	% nt	% aa	% nt	% aa	% nt	% aa	% nt	% aa
A/CK/THA/ST-01/04	99.7	99.6	99.5	99.4	99.0	99.2	99.4	98.9
A/DK/THA/PC-01/04	99.7	99.8	99.5	99.6	99.0	99.4	99.0	99.0
A/PI/THA/ST-01/04	99.6	99.4	99.5	99.2	99.3	99.0	98.9	98.7
A/DK/THA/KP-01/04	99.7	99.8	99.5	99.6	99.4	99.4	99.0	99.0
A/CK/THA/NW-02/04	99.7	99.8	99.5	99.6	99.4	99.4	99.0	99.0
A/CK/THA/PB-01/04	99.7	99.8	99.5	99.6	99.4	99.4	99.0	99.0
A/CK/THA/PB-02/04	99.6	99.6	99.5	99.4	99.3	99.4	98.9	98.9
A/CK/THA/ST-02/04	99.6	99.6	99.5	99.4	99.3	99.2	98.9	98.9
A/PI/THA/PC-01/04	99.6	99.6	99.5	99.4	99.3	99.2	98.9	98.9
A/Pg/THA/UT-01/04	99.5	99.2	99.3	99.0	99.2	98.9	98.8	98.5
A/Ts/THA/PL-01/04	99.6	99.8	99.5	99.6	99.3	99.4	98.9	99.0
A/DK/THA/ST-01/04	99.7	99.6	99.5	99.4	99.4	99.2	99.0	98.9
A/CK/THA/PL-02/04	99.7	99.4	99.5	99.2	99.4	99.0	99.0	98.7
A/CK/THA/PL-03/04	99.7	99.8	99.5	99.6	99.4	99.4	99.0	99.0
A/CK/THA/PC-01/04	99.6	99.4	99.4	99.2	99.3	99.0	98.9	98.7
A/CK/THA/KP-01/04	99.6	99.6	99.4	99.4	99.3	99.2	98.9	98.9
A/CK/THA/ST-2-01/04	99.7	99.6	99.5	99.4	99.4	99.2	99.0	98.9
A/CK/THA/UT-2-01-04	99.5	99.6	99.3	99.4	99.2	99.2	98.8	98.9
A/CK/THA/UT-2-02/04	99.4	99.9	99.2	98.7	99.1	98.7	98.7	98.5
A/CK/THA/KP-2-03/04	99.6	99.8	99.4	99.6	99.3	99.4	98.9	99.0
A/CK/THA/KP-2-04/04	99.6	99.2	99.4	99.0	99.3	99.0	98.9	98.5
A/CK/THA/NW-2-04/04	99.0	98.5	98.9	98.3	98.7	98.1	98.3	97.8
A/CK/THA/NW-2-05/04	99.7	99.4	99.5	99.2	99.4	99.0	99.0	98.7
A/CK/THA/NW-2-06/04	99.5	99.6	99.3	99.4	99.2	99.2	98.8	98.9
A/CK/THA/NW-2-07/04	99.6	99.6	99.4	99.4	99.2	99.2	98.9	98.9
A/DK/THA/NW-2-02/04	99.6	99.2	99.4	99.0	99.3	98.9	98.9	98.5
A/CK/THA/UN-2-03/04	99.7	99.6	99.5	99.4	99.4	99.2	99.0	98.9
A/DK/THA/UN-2-02/04	99.6	99.6	99.5	99.4	99.3	99.2	98.9	98.9

ตาราง 8 (ต่อ)

Avian influenza H5N1 viruses	Tg/Thai/04 ¹		Ts/Thai/05 ²		Ck/VN/04 ³		JP52a/05 ⁴	
	% nt	% aa	% nt	% aa	% nt	% aa	% nt	% aa
A/DK/THA/PL-2-01/04	99.6	99.6	99.4	99.4	99.3	99.2	98.9	98.9
A/Ck/THA/PL-2-03/04	99.5	99.4	99.3	99.2	99.2	99.0	98.7	98.7
A/Dk/THA/PC-2-02/04	99.4	99.4	99.2	99.2	99.1	99.0	98.7	98.7
A/Dk/THA/PB-2-0040/04	99.6	99.2	99.4	99.0	99.3	98.9	98.9	98.5
A/Dk/THA/KP-2-0041/04	99.7	99.8	99.5	99.6	99.4	99.4	99.0	99.0
A/Dk/THA/KP-2-0043/04	99.5	99.2	99.3	99.0	99.2	98.9	98.7	98.5
A/Dk/THA/PL-2-0044/04	99.6	99.4	99.4	99.2	99.3	99.0	98.9	98.7
A/Dk/THA/PL-2-0042/04	99.5	99.6	99.3	99.4	99.2	99.2	98.7	98.9
A/Ck/THA/ST-3-0005/05	99.3	99.2	99.2	99.0	99.0	98.9	98.6	98.7
A/Ck/THA/NW-3-0004/05	99.2	98.9	99.0	98.7	99.9	98.5	98.5	98.1
A/Dk/THA/UN-3-0003/05	99.6	99.8	99.6	99.6	99.3	99.4	98.9	99.0
A/Ck/THA/PL-3-0012/05	99.5	99.6	99.3	99.4	99.2	99.2	98.7	98.9
A/Ck/THA/PL-3-0011/05	99.5	99.6	99.3	99.4	99.2	99.2	98.8	98.9
A/Ck/THA/UN-3-0007/05	99.7	99.8	99.5	99.6	99.4	99.4	99.0	99.0
A/Ck/THA/KP-3-03/05	98.9	98.7	98.7	98.5	98.6	98.3	98.2	98.0
A/Ck/THA/KP-3-0006/05	99.1	98.9	98.9	98.7	98.8	98.5	98.4	98.1
A/Ck/THA/KP-3-05/05	99.8	99.8	99.6	99.6	99.5	99.4	99.0	99.0
A/Ck/THA/KP-3-07/05	99.3	99.2	99.2	99.0	99.0	98.9	98.6	98.5
A/Ck/THA/KP-3-0008/50	99.6	99.6	99.4	99.4	99.3	99.2	98.9	98.9
A/Ck/THA/KP-3-0009/50	99.5	99.6	99.3	99.4	99.2	99.2	98.8	98.9
A/Ck/THA/KP-3-0010/50	99.6	99.6	99.5	99.4	99.3	99.2	98.9	98.9
A/Ck/THA/ST-3-0013/50	99.6	99.4	99.4	99.2	99.3	99.0	98.9	98.7

1: A/tiger/Thailand/2004(H5N1) Accession No. AY972539.

2: A/tree sparrow/Thailand/2005(H5N1) Accession No. EF178506

3: A/chicken/Vietnam/2004(H5N1) Accession No. AY818136

4: A/Cambodia/JP52a/2005(H5N1) Accession No. EF456805

จากตารางจะเห็นว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HA จากตัวอย่างเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษาทั้งหมดนั้นมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจากฐานข้อมูลใน GenBank เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง A/tiger/Thailand/2004(H5N1) พบมีความมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 98.9 -99.8 % และลำดับกรดอะมิโน 98.5 – 99.9 % และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ A/tree sparrow/Thailand/2005(H5N1) พบว่ามีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 98.7 -99.6 % และกรดอะมิโน 98.3 -99.6 % ซึ่งตัวอย่างที่นำมาอ้างอิงนั้นเป็นตัวอย่างที่พบในประเทศไทยและมีช่วงการระบาดที่อยู่ในเวลาเดียวกันกับเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษา นอกจากนี้แล้วยังได้มีการเปรียบเทียบกับตัวอย่างเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในประเทศเพื่อนบ้านที่อยู่ในภูมิภาคเดียวกันดังนี้คือ ตัวอย่างที่มาจากประเทศเวียดนาม A/chicken/Vietnam/2004(H5N1) ซึ่งค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 98.6 -99.9 % และ 98.31-99.4 % ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1 ที่นำมาเปรียบเทียบกับอีกหนึ่งตัวอย่างคือ A/Cambodia/JP52a/2005(H5N1) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่มาจากประเทศกัมพูชาโดยพบว่าเป็นเชื้อไวรัสที่มีการติดเชื้อในคน ซึ่งนำมามาเปรียบเทียบหาค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนแล้วนั้นพบว่ามีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 98.3 -99.4 % และกรดอะมิโนอยู่ที่ 97.8 -99.0% ซึ่งจากการเปรียบเทียบตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาศึกษานั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัส A/Cambodia/JP52a/2005(H5N1) มีค่าความเหมือนกันน้อยที่สุดซึ่งก็เนื่องมาจากเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษานั้นเป็นไวรัสที่คัดแยกได้ในสัตว์ปีกในขณะที่เชื้อไวรัสที่นำมาเปรียบเทียบเป็นไวรัสที่มาจากคน แต่ความแตกต่างกันนั้นก็ถือว่าอยู่ในระดับที่ต่ำซึ่งก็มีความแตกต่างกันไม่มากกับเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในแถบภูมิภาคเดียวกัน

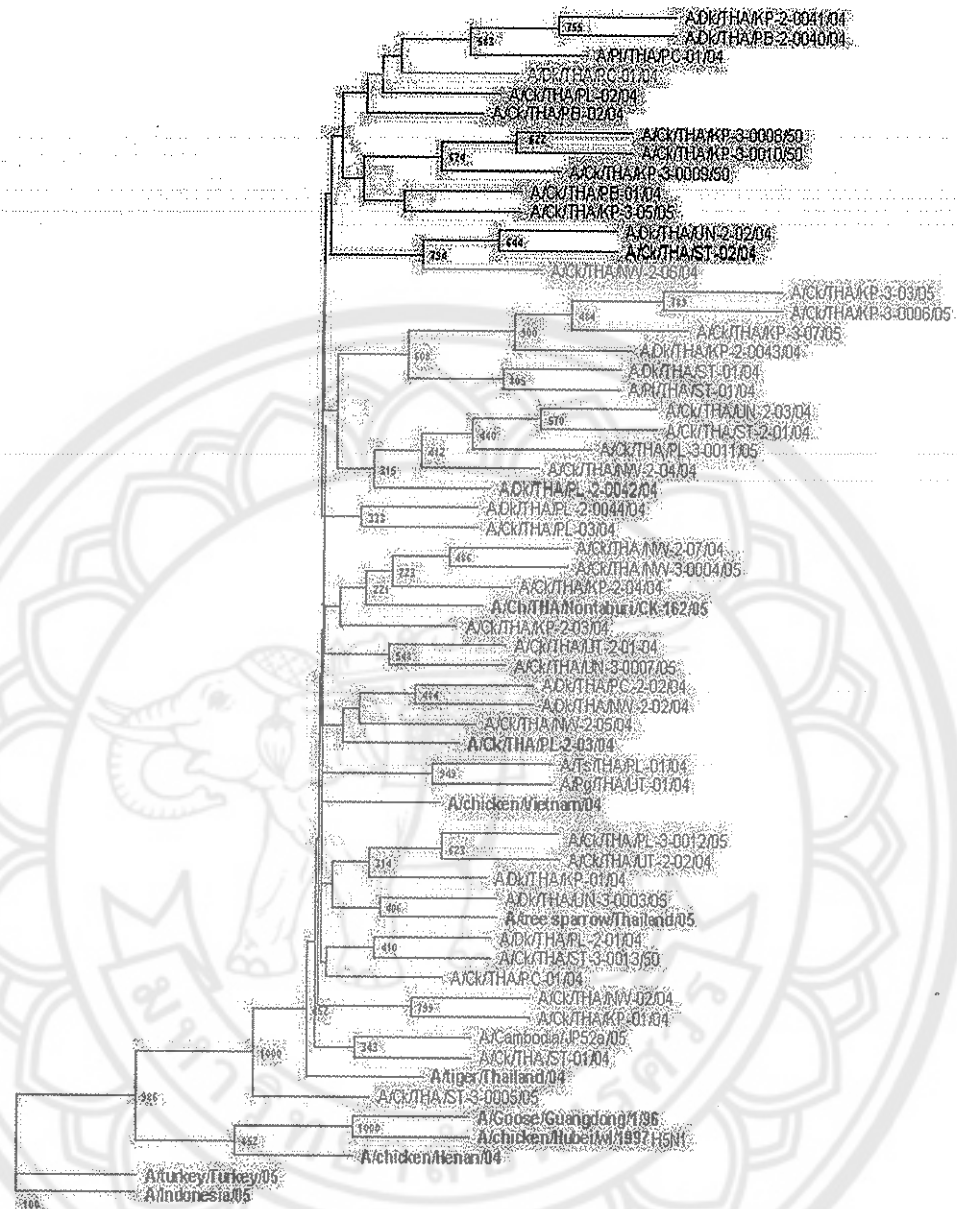
3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HA ของเชื้อไวรัส H5N1 ทั้ง 50 ตัวอย่างนั้นได้นำมาทำการศึกษาค้นหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัส H5N1 ที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ซึ่งมาจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ หรือ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP (V.3.61) โดยใช้ maximum parsimony algorithms ซึ่งทำการศึกษาโดยใช้ Bootstrap value 1000 ครั้ง ผลจากการศึกษาที่ได้ดังภาพ 8 จะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัส H5N1 ที่นำมาศึกษานั้นส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กันในกลุ่มเดียวกันกับตัวอย่างเชื้อไวรัสจากฐานข้อมูลใน GenBank ซึ่งพบในประเทศไทยและเวียดนามในช่วงที่มีการระบาดในเวลาเดียวกันซึ่งเป็นไวรัส H5N1 ที่อยู่ใน Clade 1 ด้วยการจัดจำแนกความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยทั้งเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในปี พ.ศ. 2547 นั้นมีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในรอบที่ 3 ปี พ.ศ.2548 ซึ่งแตกต่างไปจากกลุ่มของเชื้อ

ไวรัส A/chicken/Henan/04, A/tukey/Tukey/05 และ A/Indonesia/05 ทั้งนี้เนื่องจากว่าไวรัสที่มีการระบาดในจีน ตุรกี และอินโดนีเซียนั้นถึงแม้จะมีรูปแบบจีโนไทป์ที่เหมือนกันคือ genotype Z แต่ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในการจัดกลุ่มความทางด้านชีววิทยาหรือ Clade มีความแตกต่างกัน ดังต่อไปนี้ เชื้อไวรัสที่ระบาดในอินโดนีเซียนั้นอยู่ใน Clade 2.1 viruses โดยที่เชื้อไวรัสมีรหัสพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับเชื้อไวรัสจากมณฑลยูนาน (Yunan) และฮุนนาน (Hunan) ในประเทศจีน ในขณะที่ไวรัสที่พบในตุรกีนั้นเป็นไวรัสที่อยู่ใน Clade 2.3 viruses ซึ่งระบาดในกลุ่มประเทศยุโรป ตะวันออกกลางและแอฟริกา เชื้อไวรัสกลุ่มนี้มีรหัสพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสจากมณฑลจิงไห่ (Qing Hai) ในประเทศจีนซึ่งจัดว่าอยู่ใน Clade 2 เหมือนกันแต่แตกต่างกันที่ Subcladen กล่าวคือ ถึงแม้ว่าจะมีการระบาดในเวลาเดียวกันแต่ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน HA นั้นค่อนข้างจะต่างกัน ซึ่งแตกต่างไปจากเชื้อไวรัส A/chicken/Vietnam/04 ที่ยังอยู่เคียงกันกับกลุ่มของเชื้อไวรัสที่มาจากประเทศไทยและจากตัวอย่างเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษา ทั้งนี้ก็เนื่องจากประเทศไทยและเวียดนามเป็นกลุ่มประเทศแรกๆที่เริ่มเกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนกในปี พ.ศ.2547 เชื้อไวรัสที่คัดแยกได้หลังจากนี้จากประเทศอื่นๆจึงมีความแตกต่างกันทางด้านลักษณะทางพันธุกรรมทั้งนี้ เป็นผลมาจากการวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสนั่นเอง โดยดูได้จาก Phylogenetic tree ที่ได้ จะเห็นว่า A/Goose/Guangdong/1/96 และ A/chicken/Hubei/w/04 ซึ่งตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1 ที่พบว่ามี การระบาดเริ่มแรกนั้นในปี ค.ศ.1996 และ ค.ศ.1997 ที่ประเทศจีนและฮ่องกงนั้นมีความแตกต่างกันกับเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษาและเชื้อไวรัสที่มาจากฐานข้อมูล GenBank ตัวอย่างอื่นๆด้วยโดยจัด อยู่ต่าง Clade ซึ่งก็มาจากการที่ไวรัสเกิดการกลายพันธุ์เพื่อสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมและการแพร่พันธุ์หรือเกิดจากการวิวัฒนาการนั่นเอง

นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการศึกษาถึงค่าความผันแปรทางพันธุกรรมว่ามีมากน้อยเพียงใด โดยได้ทำการเปรียบเทียบในยีน HA ทั้ง 2 subunit คือ HA1 และ HA2 ซึ่งความผันแปรของยีน HA นั้นจะขึ้นอยู่กับค่าอัตราส่วนของ non-synonymous กับ synonymous โดยที่ non-synonymous หมายถึงการที่ลำดับ nucleotide เปลี่ยนแปลงไปและทำให้ชนิดของกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย ในขณะที่ synonymous หมายถึงการที่ลำดับของ nucleotide เปลี่ยน แต่ชนิดกรดอะมิโน ยังคงเดิมเนื่องจากว่า กรดอะมิโนบางชนิดนั้นสามารถใช้ codon ได้มากกว่าหนึ่ง codon ซึ่งหาก อัตราส่วนของ non-synonymous ต่อ synonymous มีค่ามากแสดงว่าเกิดความผันแปรทาง พันธุกรรมของยีนในระดับสูง ทั้งนี้เนื่องจากว่าเกิดการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนเมื่อลำดับ nucleotide ที่เปลี่ยนไปมีจำนวนสูงกว่า แต่ถ้าอัตราส่วนของ non-synonymous/synonymous

มีค่าน้อย แสดงว่าความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนนั้นอยู่ในระดับต่ำลงมา ในการศึกษาความถึงความผันแปรของยีน HA นี้อาศัยการวิเคราะห์โดยโปรแกรมสำเร็จรูป K-Estimator v6.0 [42] ผลจากการวิเคราะห์ยีน HA1 ซึ่งมีขนาด 330 กรดอะมิโน อัตราส่วนของ non-synonymous ต่อ synonymous คือ 0.37 โดยที่ยีน HA2 ที่มีขนาด 222 กรดอะมิโนนั้นมีค่า non-synonymous ต่อ synonymous เท่ากับ 0.35 ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีน HA นั้นในส่วนของ HA1 subunit มีความผันแปรทางพันธุกรรมอยู่ในระดับที่สูงกว่า HA2 อยู่เพียงเล็กน้อย





Nucleotide substations

ภาพ 8 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HA ของไวรัส H5N1 ที่มีการระบาดในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2547-2548 กับไวรัส H5N1 จากฐานข้อมูล GenBank: ด้วยโปรแกรม PHYLIP (V.3.61) โดยใช้ maximum parsimony algorithms และ Bootstrap value 1000 ครั้ง (สเกล: จำนวนของ Nucleotide substations/site)

ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินินที่สัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรค

จากผลการวิจัยในการหาลำดับกรดอะมิโนของยีน HA จากตัวอย่างเชื้อไวรัส ไข้หวัดนก H5N1 ทั้ง 50 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพ 9 ซึ่งพบตำแหน่งของ Glycosylation จำนวน 7 ตำแหน่ง สำหรับตำแหน่ง Glycosylation site ที่พบใน HA นี้มีส่วนสำคัญในการฟอร์มรูปร่างทางโครงสร้างของโปรตีนซึ่งหากเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุลโปรตีนขึ้นไวรัสอาจจะหลบหลีกจากการจดจำของระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ได้ สำหรับตำแหน่งของ Glycosylation ที่สำคัญคือตำแหน่งกรดอะมิโน ที่ 154-156 ซึ่งพบว่ามีกรดอะมิโนเป็นแบบ N-S-T (Asparagine-Serine-Threonine) ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะที่พบในเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกโดยเฉพาะสายพันธุ์ H5 นอกจากนี้ยังพบได้ในเชื้อไวรัส H5N1 ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยและเวียดนามเป็นส่วนใหญ่ สำหรับการมีหรือไม่มีของตำแหน่ง Glycosylation ที่ตำแหน่งดังกล่าวนี้มีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อไวรัสดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้นหากโครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 154-156 นั้นซึ่งเป็นบริเวณที่เป็น Antigenic site B มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนหากหน้าตาของโปรตีนเปลี่ยนการจดจำของระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ก็อาจจะด้อยลงดังนั้นไวรัสสามารถที่จะหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันได้ นอกจากนี้แล้วการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ยังเกี่ยวข้องกับการปรับตัวของไวรัสเพื่อที่จะติดเชื้อได้ในสัตว์ปีกบนแผ่นดินได้ดีและก่อโรครุนแรงมากขึ้นอีกด้วย

สำหรับตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความสัมพันธ์กับส่วนที่เป็น Receptor binding site ได้แก่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 222 และ 224 จากผลการศึกษาดูตัวอย่างทั้งสิ้น 50 ตัวอย่างนั้นพบชนิดของกรดอะมิโนคือ Glutamine (Q) และ Glycine (G) ตามลำดับซึ่งเป็นรูปแบบที่พบในกลุ่มของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกซึ่งทำให้ไวรัสสามารถจับกับ α 2,3 NeuAcGal ที่ Receptor บนผิวเซลล์ของโฮสต์จากงานวิจัยของ Clayton W. Naeye และ คณะดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้นพิสูจน์ให้เห็นได้ว่าไวรัส H3 ที่นำมาศึกษานั้นเป็นไวรัสที่มียีนฮีแมกกลูตินินที่มาจากไวรัสในสัตว์ปีกซึ่งน่าจะเกิดจากกระบวนการ Reassortment หรือมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนกันระหว่างไวรัส 2 ชนิดที่ติดเชื้อในเซลล์เดียวกัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสอย่างรวดเร็ว จึงอาจเป็นไปได้ว่าหาก เชื้อไวรัส H5 ที่มีการระบาดในปัจจุบันเกิดกลายพันธุ์โดยเฉพาะที่กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 222 และ 224 ซึ่งเป็น Receptor binding site นั้นอาจส่งผลกระทบต่อความรุนแรงในการก่อโรคหรือไวรัสสามารถติดเชื้อได้ในเซลล์สัตว์หลากหลายชนิดมากขึ้น

นอกจากนั้นจากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัส H5N1 จากจำนวนตัวอย่างทั้ง 50 ตัวอย่างนั้นพบว่าบริเวณที่เรียกว่า HA cleavage sites มีลักษณะการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นแบบที่เรียกว่า Polybasic amino acid โดยที่มีกรดอะมิโนเช่น โดซีน และ อาร์จินีน เรียงตัวแบบซ้ำๆกัน ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะพบได้ในเชื้อไวรัสในกลุ่มที่ก่อโรครุนแรง เช่น H5 และ H7 จากผลการศึกษาพบรูปแบบของ Polybasic amino acid สองชนิด คือ PQRERRRKKR และ PQREKRRKKR ซึ่งรูปแบบแรกนั้นเป็นลักษณะที่เป็น Wild type คิดเป็นร้อยละ 86 ของตัวอย่างเชื้อไวรัส H5N1ทั้งหมดที่ศึกษาโดยที่รูปแบบการจัดเรียงตัวแบบ PQRERRRKKR เป็นลักษณะที่มีรายงานว่าพบในปี พ.ศ.2546-2547 ที่ฮ่องกง เวียดนาม และไทย ในขณะที่ PQREKRRKKR พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Arginine(R) เป็น Lysine(K) ซึ่งจากการวิจัยพบร้อยละ 14 จากจากตัวอย่างทั้งหมดโดยส่วนใหญ่แล้วเป็นเชื้อไวรัสที่คัดแยกได้ในช่วงการระบาดรอบที่ 2 ของประเทศไทยในปี พ.ศ.2548 ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส H5N1 นี้เป็นไวรัสที่อยู่ในจีโนไทป์ Z ซึ่งมีการระบาดในประเทศไทยโดยพบว่ายีนฮีแมกกลูตินินยังคงลักษณะทางพันธุกรรมเช่นเดียวกับกับจีโนไทป์ต้นแบบในปี ค.ศ.1996 ดังนั้นการกลายพันธุ์จึงเป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส และไวรัสเองยังคงลักษณะบางประการที่เอื้อต่อการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมและการแพร่กระจายพันธุ์

HA1	10	20	30	40	50	60	70	
.....	10	20	30	40	50	60	70	
DOICIGYHAN NSTEQVDTIM ERNVTVTHAQ DILEKTHNGK LCDLDGKPL ILRDCSVAGW LLGNPMCDFE								A/Ck/THA/ST-01/04
.....								A/Dk/THA/PC-01/04
.....								A/Pt/THA/ST-01/04
.....								A/Ck/THA/NW-02/04
.....								A/Ck/THA/PB-01/04
.....								A/Ck/THA/PB-02/04
.....								A/Pt/THA/PC-01/04
.....								A/Pg/THA/UT-01/04
.....								A/Ts/THA/PL-01/04
.....								A/Dk/THA/ST-01/04
.....								A/Ck/THA/PL-02/04
.....								A/Ck/THA/PL-03/04
.....								A/Ck/THA/PC-01/04
.....								A/Ck/THA/KP-01/04
.....								A/Dk/THA/KP-01/04
.....								A/Ck/THA/ST-02/04
.....								A/Ck/THA/ST-2-01/04
.....								A/Ck/THA/UT-2-01-04
.....								A/Dk/THA/PB-2-0040/04
.....								A/Ck/THA/UT-2-02/04
.....								A/Dk/THA/KP-2-0041/04
.....								A/Dk/THA/KP-2-0043/04
.....								A/Dk/THA/PL-2-0044/04
.....								A/Ck/THA/KP-2-03/04
.....								A/Ck/THA/KP-2-04/04
.....								A/Dk/THA/PL-2-0042/04
.....								A/Ck/THA/NW-2-04/04
.....								A/Ck/THA/NW-2-05/04
.....								A/Ck/THA/NW-2-06/04
.....								A/Ck/THA/NW-2-07/04
.....								A/Dk/THA/NW-2-02/04
.....								A/Ck/THA/UN-2-03/04
.....								A/Dk/THA/UN-2-02/04
.....								A/Dk/THA/PL-2-01/04
.....								A/Ck/THA/PL-2-03/04
.....								A/Dk/THA/PC-2-02/04
.....								A/Ck/THA/ST-3-0005/05
.....								A/Ck/THA/NW-3-0009/05
.....								A/Dk/THA/UN-3-0008/05
.....								A/Ck/THA/PL-3-0012/05
.....								A/Ck/THA/PL-3-0011/05
.....								A/Ck/THA/UN-3-0007/05
.....								A/Ck/THA/KP-3-03/05
.....								A/Ck/THA/KP-3-0006/05
.....								A/Ck/THA/KP-3-05/05
.....								A/Ck/THA/KP-3-07/05
.....								A/Ck/THA/KP-3-0008/05
.....								A/Ck/THA/KP-3-0009/05
.....								A/Ck/THA/KP-3-0010/05
.....								A/Ck/THA/ST-3-0013/05

ภาพ 9 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน HA ทั้ง 50 ตัวอย่าง
 บริเวณที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งของ Glycosylation, กล่องเส้นประแสดงตำแหน่ง
 HA cleavage site และกล่องทึบแสดงตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับ Receptor binding site

80	90	100	110	120	130	140	
INVPESYIV	EKANPVNDLC	YPGDFNDYEE	LKHLLSRINH	FEKIQIIPKS	SWSSEASLG	VSSACPYQOK	A/Ck/THA/ST-01/04
							A/Dk/THA/PC-01/04
							A/Pt/THA/ST-01/04
							A/Ck/THA/NW-02/04
							A/Ck/THA/PB-01/04
							A/Ck/THA/PB-02/04
							A/Pt/THA/PC-01/04
							A/Pg/THA/UT-01/04
							A/Ts/THA/PL-01/04
							A/Dk/THA/ST-01/04
							A/Ck/THA/PL-02/04
							A/Ck/THA/PL-03/04
	I						A/Ck/THA/PC-01/04
							A/Ck/THA/KP-01/04
				R			A/Dk/THA/KP-01/04
							A/Ck/THA/ST-02/04
							A/Ck/THA/ST-2-01/04
							A/Ck/THA/UT-2-01-04
	S						A/Dk/THA/PB-2-0040/04
							A/Ck/THA/UT-2-02/04
							A/Dk/THA/KP-2-0041/04
							A/Dk/THA/KP-2-0043/04
							A/Dk/THA/PL-2-0044/04
							A/Ck/THA/KP-2-03/04
							A/Ck/THA/KP-2-04/04
							A/Dk/THA/PL-2-0042/04
							A/Ck/THA/NW-2-04/04
			L				A/Ck/THA/NW-2-05/04
							A/Ck/THA/NW-2-06/04
							A/Ck/THA/NW-2-07/04
							A/Dk/THA/NW-2-02/04
							A/Ck/THA/UN-2-03/04
							A/Dk/THA/UN-2-02/04
							A/Dk/THA/PL-2-01/04
	I			H			A/Ck/THA/PL-2-03/04
				H			A/Dk/THA/PC-2-02/04
						L R	A/Ck/THA/ST-3-0005/05
	I						A/Ck/THA/NW-3-0009/05
							A/Dk/THA/UN-3-0008/05
							A/Ck/THA/PL-3-0012/05
							A/Ck/THA/PL-3-0011/05
							A/Ck/THA/UN-3-0007/05
						L	A/Ck/THA/KP-3-03/05
							A/Ck/THA/KP-3-0006/05
							A/Ck/THA/KP-3-05/05
							A/Ck/THA/KP-3-07/05
							A/Ck/THA/KP-3-0008/05
							A/Ck/THA/KP-3-0009/05
							A/Ck/THA/KP-3-0010/05
	I						A/Ck/THA/ST-3-0013/05

ภาพ 9 (ต่อ)

๖ SF
๙๙5
.๖๖75
๐14๖5
2553



25
สำนักหอสมุด

- 5 JUL 2011

150	160	170	180	190	200	210
SSFFRNVVWL	IKKNSTYPTI	KRSYNNINQE	DLVLVGIHH	PNDAAEQTKL	YQNPTTYISV	GTSLNQRV
				T		I
						A/Ck/THA/ST-01/04
						A/Dk/THA/PC-01/04
						A/Pt/THA/ST-01/04
						A/Ck/THA/NW-02/04
						A/Ck/THA/PB-01/04
						A/Ck/THA/PB-02/04
						A/Pt/THA/PC-01/04
						A/Pg/THA/UT-01/04
						A/Ts/THA/PL-01/04
				T		I
						A/Dk/THA/ST-01/04
						A/Ck/THA/PL-02/04
						A/Ck/THA/PL-03/04
						A/Ck/THA/PC-01/04
						A/Ck/THA/KP-01/04
						A/Dk/THA/KP-01/04
						A/Ck/THA/ST-02/04
						A/Ck/THA/ST-2-01/04
						A/Ck/THA/UT-2-01-04
						A/Dk/THA/PB-2-0040/04
						A/Ck/THA/UT-2-02/04
						A/Dk/THA/KP-2-0041/04
				T		I
						A/Dk/THA/KP-2-0043/04
						A/Dk/THA/PL-2-0044/04
						A/Ck/THA/KP-2-03/04
						A/Ck/THA/KP-2-04/04
						A/Dk/THA/PL-2-0042/04
						A/Ck/THA/NW-2-04/04
						A/Ck/THA/NW-2-05/04
						A/Ck/THA/NW-2-06/04
						A/Ck/THA/NW-2-07/04
				M		I
						A/Dk/THA/NW-2-02/04
						A/Ck/THA/UN-2-03/04
						A/Dk/THA/UN-2-02/04
						A/Dk/THA/PL-2-01/04
						A/Ck/THA/PL-2-03/04
						A/Dk/THA/PC-2-02/04
						A/Ck/THA/ST-3-0005/05
				M		I
						A/Ck/THA/NW-3-0009/05
						A/Dk/THA/UN-3-0008/05
						A/Ck/THA/PL-3-0012/05
						A/Ck/THA/PL-3-0011/05
						A/Ck/THA/UN-3-0007/05
S				T		I
				T		I
				T		I
						A/Ck/THA/KP-3-03/05
						A/Ck/THA/KP-3-0006/05
						A/Ck/THA/KP-3-05/05
						A/Ck/THA/KP-3-07/05
						A/Ck/THA/KP-3-0008/05
						A/Ck/THA/KP-3-0009/05
						A/Ck/THA/KP-3-0010/05
						A/Ck/THA/ST-3-0013/05

ภาพ 9 (ต่อ)

220	230	240	250	260	270	280
PRIATRSKVN	GOSGEMEFFW	TILKPNDAIN	FESNGNFIAP	EYAYKIVKKG	DSTIMKSELE	YGNCNTKCQT
						A/Ck/THA/ST-01/04
						A/Dk/THA/PC-01/04
						A/Pt/THA/ST-01/04
						A/Ck/THA/NW-02/04
						A/Ck/THA/PB-01/04
						A/Ck/THA/PB-02/04
						A/Pt/THA/PC-01/04
						A/Pg/THA/UT-01/04
						A/Ts/THA/PL-01/04
						A/Dk/THA/ST-01/04
						A/Ck/THA/PL-02/04
						A/Ck/THA/PL-03/04
						A/Ck/THA/PC-01/04
						A/Ck/THA/KP-01/04
						A/Dk/THA/KP-01/04
		L				A/Ck/THA/ST-02/04
						A/Ck/THA/ST-2-01/04
	G		F			A/Ck/THA/UT-2-01-04
						A/Dk/THA/PB-2-0040/04
						A/Ck/THA/UT-2-02/04
						A/Dk/THA/KP-2-0041/04
						A/Dk/THA/KP-2-0043/04
						A/Dk/THA/PL-2-0044/04
						A/Ck/THA/KP-2-03/04
						A/Ck/THA/KP-2-04/04
						A/Dk/THA/PL-2-0042/04
						A/Ck/THA/NW-2-04/04
						A/Ck/THA/NW-2-05/04
			R			A/Ck/THA/NW-2-06/04
						A/Ck/THA/NW-2-07/04
						A/Dk/THA/NW-2-02/04
						A/Ck/THA/UN-2-03/04
						A/Dk/THA/UN-2-02/04
						A/Dk/THA/PL-2-01/04
						A/Ck/THA/PL-2-03/04
						A/Dk/THA/PC-2-02/04
						A/Ck/THA/ST-3-0005/05
						A/Ck/THA/NW-3-0009/05
						A/Dk/THA/UN-3-0008/05
						A/Ck/THA/PL-3-0012/05
						A/Ck/THA/PL-3-0011/05
						A/Ck/THA/UN-3-0007/05
						A/Ck/THA/KP-3-03/05
						A/Ck/THA/KP-3-0006/05
						A/Ck/THA/KP-3-05/05
						A/Ck/THA/KP-3-07/05
						A/Ck/THA/KP-3-0008/05
						A/Ck/THA/KP-3-0009/05
						A/Ck/THA/KP-3-0010/05
						A/Ck/THA/ST-3-0013/05

ภาพ 9 (ต่อ)

HA2

↗

290	300	310	320	330	340	350	
FMGAINSSMP	FHNIHPLTIG	ECEKYVKSNR	LVLATGLRNS	EQRERRRKR	GLFGAIGFI	EGGWQGMVDG	A/Ck/THA/ST-01/04
							A/Dk/THA/PC-01/04
							A/Pt/THA/ST-01/04
							A/Ck/THA/NW-02/04
							A/Ck/THA/PB-01/04
							A/Ck/THA/PB-02/04
							A/Pt/THA/PC-01/04
				K			A/Pg/THA/UT-01/04
				K			A/Ts/THA/PL-01/04
							A/Dk/THA/ST-01/04
							A/Ck/THA/PL-02/04
							A/Ck/THA/PL-03/04
							A/Ck/THA/PC-01/04
							A/Ck/THA/KP-01/04
							A/Dk/THA/KP-01/04
							A/Ck/THA/ST-02/04
							A/Ck/THA/ST-2-01/04
							A/Ck/THA/UT-2-01-04
							A/Dk/THA/PB-2-0040/04
							A/Ck/THA/UT-2-02/04
							A/Dk/THA/KP-2-0041/04
		K					A/Dk/THA/KP-2-0043/04
							A/Dk/THA/PL-2-0044/04
				K			A/Ck/THA/KP-2-03/04
							A/Ck/THA/KP-2-04/04
							A/Dk/THA/PL-2-0042/04
							A/Ck/THA/NW-2-04/04
							A/Ck/THA/NW-2-05/04
							A/Ck/THA/NW-2-06/04
				K			A/Ck/THA/NW-2-07/04
							A/Dk/THA/NW-2-02/04
							A/Ck/THA/UN-2-03/04
				K			A/Dk/THA/UN-2-02/04
							A/Dk/THA/PL-2-01/04
				K			A/Ck/THA/PL-2-03/04
							A/Dk/THA/PC-2-02/04
			I				A/Ck/THA/ST-3-0005/05
				K			A/Ck/THA/NW-3-0009/05
							A/Dk/THA/UN-3-0008/05
			K				A/Ck/THA/PL-3-0012/05
							A/Ck/THA/PL-3-0011/05
							A/Ck/THA/UN-3-0007/05
							A/Ck/THA/KP-3-03/05
							A/Ck/THA/KP-3-0006/05
							A/Ck/THA/KP-3-05/05
							A/Ck/THA/KP-3-07/05
							A/Ck/THA/KP-3-0008/05
	P						A/Ck/THA/KP-3-0009/05
							A/Ck/THA/KP-3-0010/05
							A/Ck/THA/ST-3-0013/05

ภาพ 9 (ต่อ)

360	370	380	390	400	410	420	
WYGYHHSNEQ	GSGYAADKES	TQKALDGVIN	KVNSIIDKMN	TQFEAVGREF	NNLERRIENL	NKKMEDGFLD	A/Ck/THA/ST-01/04
							A/Dk/THA/PC-01/04
							A/Pt/THA/ST-01/04
							A/Ck/THA/NW-02/04
							A/Ck/THA/PB-01/04
							A/Ck/THA/PB-02/04
							A/Pt/THA/PC-01/04
							A/Pg/THA/UT-01/04
							A/Ts/THA/PL-01/04
							A/Dk/THA/ST-01/04
							A/Ck/THA/PL-02/04
							A/Ck/THA/PL-03/04
							A/Ck/THA/PC-01/04
							A/Ck/THA/KP-01/04
							A/Dk/THA/KP-01/04
							A/Ck/THA/ST-02/04
			N				A/Ck/THA/ST-2-01/04
	S						A/Ck/THA/UT-2-01-04
	S						A/Dk/THA/PB-2-0040/04
							A/Ck/THA/UT-2-02/04
						Q	A/Dk/THA/KP-2-0041/04
	EQ		N				A/Dk/THA/KP-2-0043/04
	S						A/Dk/THA/PL-2-0044/04
			N				A/Ck/THA/KP-2-03/04
							A/Ck/THA/KP-2-04/04
	N	S	N				A/Dk/THA/PL-2-0042/04
			N				A/Ck/THA/NW-2-04/04
							A/Ck/THA/NW-2-05/04
							A/Ck/THA/NW-2-06/04
							A/Ck/THA/NW-2-07/04
							A/Dk/THA/NW-2-02/04
		L	H	N			A/Ck/THA/UN-2-03/04
							A/Dk/THA/UN-2-02/04
							A/Dk/THA/PL-2-01/04
							A/Ck/THA/PL-2-03/04
							A/Dk/THA/PC-2-02/04
							A/Ck/THA/ST-3-0005/05
							A/Ck/THA/NW-3-0009/05
							A/Dk/THA/UN-3-0008/05
							A/Ck/THA/PL-3-0012/05
			N				A/Ck/THA/PL-3-0011/05
							A/Ck/THA/UN-3-0007/05
			N				A/Ck/THA/KP-3-03/05
			N				A/Ck/THA/KP-3-0006/05
							A/Ck/THA/KP-3-05/05
							A/Ck/THA/KP-3-07/05
							A/Ck/THA/KP-3-0008/05
							A/Ck/THA/KP-3-0009/05
							A/Ck/THA/KP-3-0010/05
	S						A/Ck/THA/ST-3-0013/05

ภาพ 9 (ต่อ)

430	440	450	460	470	480	490	
VWTYNAELLV	LMENERTLDF	HDSNVKNLYD	KVRLQLRDNA	KELGNGCPEF	YHKCDNECME	SVRNGTYDYP	A/Ck/THA/ST-01/04
.....	A/Dk/THA/PC-01/04
.....	A/Pt/THA/ST-01/04
.....	A/Ck/THA/NW-02/04
.....	A/Ck/THA/PB-01/04
.....	A/Ck/THA/PB-02/04
.....	A/Pt/THA/PC-01/04
.....	A/Pg/THA/UT-01/04
.....	A/Ts/THA/PL-01/04
.....	A/Dk/THA/ST-01/04
.....	A/Ck/THA/PL-02/04
.....	M.	A/Ck/THA/PL-03/04
.....	A/Ck/THA/PC-01/04
.....	A/Ck/THA/KP-01/04
.....	A/Dk/THA/KP-01/04
.....	A/Ck/THA/ST-02/04
.....	A/Ck/THA/ST-2-01/04
.....	A/Ck/THA/UT-2-01-04
.....	A/Dk/THA/PB-2-0040/04
.....	A/Ck/THA/UT-2-02/04
.....	A/Dk/THA/KP-2-0041/04
.....	A/Dk/THA/KP-2-0043/04
.....	M.	A/Dk/THA/PL-2-0044/04
.....	A/Ck/THA/KP-2-03/04
.....	A/Ck/THA/KP-2-04/04
.....	A/Dk/THA/PL-2-0042/04
.....	A/Ck/THA/NW-2-04/04
.....	A/Ck/THA/NW-2-05/04
.....	A/Ck/THA/NW-2-06/04
.....	M.	A/Ck/THA/NW-2-07/04
.....	A/Dk/THA/NW-2-02/04
.....	A/Ck/THA/UN-2-03/04
.....	A/Dk/THA/UN-2-02/04
.....	A/Dk/THA/PL-2-01/04
.....	A/Ck/THA/PL-2-03/04
.....	A/Dk/THA/PC-2-02/04
.....	M.	A/Ck/THA/ST-3-0005/05
.....	A/Ck/THA/NW-3-0009/05
.....	A/Dk/THA/UN-3-0008/05
.....	A/Ck/THA/PL-3-0012/05
.....	A/Ck/THA/PL-3-0011/05
.....	A/Ck/THA/UN-3-0007/05
.....	I.	A/Ck/THA/KP-3-03/05
.....	A/Ck/THA/KP-3-0006/05
.....	A/Ck/THA/KP-3-05/05
.....	A/Ck/THA/KP-3-07/05
.....	A/Ck/THA/KP-3-0008/05
.....	A/Ck/THA/KP-3-0009/05
.....	A/Ck/THA/KP-3-0010/05
.....	A/Ck/THA/ST-3-0013/05

ภาพ 9 (ต่อ)

500	510	520	530	540	550	
QYSEARIKR	EEISGVKLES	IGIYQILSIY	STVASSLALA	IMVAGLSLWM	CSNGSLQCRI CI	A/CK/THA/ST-01/04
L.						A/DK/THA/PC-01/04
L.						A/Pt/THA/ST-01/04
L.						A/CK/THA/NW-02/04
L.						A/CK/THA/PB-01/04
L.						A/CK/THA/PB-02/04
L.			T.			A/Pt/THA/PC-01/04
L.						A/Pg/THA/UT-01/04
L.						A/Ts/THA/PL-01/04
L.						A/DK/THA/ST-01/04
L.						A/CK/THA/PL-02/04
L.						A/CK/THA/PL-03/04
L.						A/CK/THA/PC-01/04
L.						A/CK/THA/KP-01/04
L.						A/DK/THA/KP-01/04
L.						A/CK/THA/ST-02/04
L.						A/CK/THA/ST-2-01/04
L.						A/CK/THA/UT-2-01-04
L.			T.			A/DK/THA/PB-2-0040/04
L.						A/CK/THA/UT-2-02/04
L.			T.			A/DK/THA/KP-2-0041/04
L.	T.					A/DK/THA/KP-2-0043/04
L.						A/DK/THA/PL-2-0044/04
L.						A/CK/THA/KP-2-03/04
L.						A/CK/THA/KP-2-04/04
L.						A/DK/THA/PL-2-0042/04
L.						A/CK/THA/NW-2-04/04
L.						A/CK/THA/NW-2-05/04
L.						A/CK/THA/NW-2-06/04
L.						A/CK/THA/NW-2-07/04
L.						A/DK/THA/NW-2-02/04
L.						A/CK/THA/UN-2-03/04
L.						A/DK/THA/UN-2-02/04
L.						A/DK/THA/PL-2-01/04
L.						A/CK/THA/PL-2-03/04
L.						A/DK/THA/PC-2-02/04
L.						A/CK/THA/ST-3-0005/05
L.						A/CK/THA/NW-3-0009/05
L.						A/DK/THA/UN-3-0008/05
L.						A/CK/THA/PL-3-0012/05
L.						A/CK/THA/PL-3-0011/05
L.						A/CK/THA/UN-3-0007/05
L.						A/CK/THA/KP-3-03/05
L.	T.			F.		A/CK/THA/KP-3-0006/05
L.						A/CK/THA/KP-3-05/05
L.	T.					A/CK/THA/KP-3-07/05
L.	T.					A/CK/THA/KP-3-0008/05
L.						A/CK/THA/KP-3-0009/05
L.	T.					A/CK/THA/KP-3-0010/05
L.						A/CK/THA/ST-3-0013/05

ภาพ 9 (ต่อ)

GenBank data print out

LOCUS FJ265565 1765 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus (A/quail/Thailand/Phichit-01/2004 (H5N1)) segment
 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265565
 VERSION FJ265565.1 GI:209164543
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus (A/quail/Thailand/Phichit-01/2004 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus (A/quail/Thailand/Phichit-01/2004 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1765)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1765)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1765
 /organism="Influenza A virus
 (A/quail/Thailand/Phichit-01/2004 (H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/quail/Thailand/Phichit-01/2004"
 /serotype="H5N1"
 /host="quail"
 /db_xref="taxon:470556"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2004"
 gene 15..1721
 /gene="HA"
 CDS 15..1721
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41122.1"
 /db_xref="GI:209164544"

 /translation="MEKIVLLFAIVSLVKSQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGDKVPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPV
 NDLCPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSEASLGVSSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGT
 STLNQLRVPRIATR SKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
 DSTIMKSELEYGNCNTKQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLLV L ATGLR

NSPQRERRRRKKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSQGYAADKESTQKAID
 GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN
 ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
 SEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLFLAIMVAGLSLWMCNSGSLQCRI

CI"

ORIGIN

1 ttcaatctgt caaatggag aaaatagtgc ttctttttgc aatagtcagt cttgttaaaa
 61 gtgatcagat ttgcattggt taccatgcaa acaactcgac agagcagggt gacacaataa
 121 tggaaaagaa cgttactggt acacatgccc aagacatact ggaaaagaca cacaacggga
 181 agctctgcca tctagatgga gtgaagcctc taattttgag agattgtagt gtagctggat
 241 ggctcctcgg aaacccaatg tgtgacgaat tcatcaatgt gccggaatgg tcttacatag
 301 tggagaaggc caatccagtc aatgacctct gttaccagg ggatttcaat gactatgaag
 361 aattgaaaca cctattgagc agaataaacc attttgagaa aattcagatc atccccaaaa
 421 gttcttggtc cagtcatgaa gcctcattag gggtgagctc agcatgtcca taccagggaa
 481 agtctctcctt tttcagaaat gtggataggc ttatcaaaaa gaacagtaca taccaacaa
 541 taaagaggag ctacaataat accaaccaag aagatctttt ggtactgtgg gggattcacc
 601 atcctaataga tgcggcagag cagacaaagc tctatcaaaa cccaaccacc tatatctccg
 661 ttgggacatc aacactaaac cagagattgg taccaagaat agctactaga tccaaagtaa
 721 acgggcaaag tgaagggatg gagttcttct ggacaatttt aaaaccgaat gatgcaatca
 781 acttcgagag taatggaaat ttcattgctc cagaatatgc atacaaaatt gtcaagaaag
 841 gggactcaac aattatgaaa agtgaattgg aatatggtaa ctgcaacacc aagtgtcaaa
 901 ctccaatggg ggcgataaac tctagtatgc cattccacaa tataaccctc ctaccatcg
 961 gggaaatgcc caaatatgtg aaatcaaaaa ggttagtcct tgcgactggg ctcaagaaata
 1021 gccctcaaag agagagaaga agaaaaaaga gaggattatt tggagctata gcaggtttta
 1081 tagagggagg atggcaggga atggtagatg gttggtatgg gtaccaccat agcaatgagc
 1141 aggggagtgg gtacgctgca gacaaagaat ccaactcaaaa ggcaatagat ggagtcacca
 1201 ataaggtaa ctcgatcatt gacaaaatga acaactcagtt tgaggccggt ggaagggat
 1261 ttaacaactt agaaaggaga atagagaatt taacaagaa gatggaagac gggttcctag
 1321 atgtctggac ttataatgct gaacttctgg ttctcatgga aatgagaga actctagact
 1381 ttcatgactc aaatgtcaag aacctttacg acaaggcccg actacagctt agggataatg
 1441 caaaggagct gggtaacggt tgtttcgagt tctatcataa atgtgataat gaatgtatgg
 1501 aaagtgtaaag aaacggaacg tatgactacc cgcagtattc agaagaagca agactaaaa
 1561 gagaggaaat aagtggagta aaattggaat caataggaat ttaccaataa ctgtcaattt
 1621 attctacagt ggcgagttcc ctaacactgg caatcatggt agctggtcta tcttatgga
 1681 tgtgctccaa tgggtcatta caatgcagaa tttgattta aatttgtgag ttcagattgt
 1741 agttaaaaaa acccttgttt ctact

//

LOCUS FJ265566 1765 bp crNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus (A/pigeon/Thailand/Uttaradit-01/2004 (H5N1))
 segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265566
 VERSION FJ265566.1 GI:209164545
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus (A/pigeon/Thailand/Uttaradit-01/2004 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus (A/pigeon/Thailand/Uttaradit-01/2004 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1765)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1765)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1765
 /organism="Influenza A virus
 (A/pigeon/Thailand/Uttaradit-01/2004 (H5N1))"
 /mol_type="viral crNA"
 /strain="A/pigeon/Thailand/Uttaradit-01/2004"
 /serotype="H5N1"
 /host="pigeon"
 /db_xref="taxon:470555"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2004"
 gene 15..1721
 /gene="HA"
 CDS 15..1721
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41123.1"
 /db_xref="GI:209164546"

/translation="MEKIVLLFAIVSLVKSQDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTH
 AQDILEKTHNGKLCDDLGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDFINVPWSYIVEKANPV
 NDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTYISVGT
 STLNQRLVPRIATRSKVNQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
 DSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGCEPKYVKSRLVLTGLR
 NSPQREKRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGGYAADKESTQKAID
 GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN

ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEYFHKCDNECMESVRNGTYDYPQY

SEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNSNGSLQCRI

CI"

ORIGIN

1 ttcaatctgt caaaatggag aaaatagtgc ttctttttgc aatagtcagt cttgttaaaa
 61 gtgatcagat ttgcattggt taccatgcaa acaactcgac agagcagggt gacacaataa
 121 tggaaaagaa cgttactggt acacatgccc aagacatact ggaaaagaca cacaacggga
 181 agctctgca tctagatgga gtgaagcctc taattttgag agattgtagt gtagctggat
 241 ggctoctcgg aaacccaatg tgtgacgaat tcatcaatgt gccggaatgg tcttaccatag
 301 tggagaaggc caatccagtc aatgacctct gttaccagg ggatttcaat gactatgaag
 361 aattgaaaca cctattgagc agaataaacc attttgagaa aattcagatc atccccaaaa
 421 gttcttggtc cagtcatgaa gcctcattag ggggtgagctc agcatgtcca taccagggaa
 481 agtccctcctt ttfcagaaat gtggtagtgc ttatcaaaaa gaacagtaca taccacaaca
 541 taaagaggag ctacaataat accaaccaag aagatctttt ggtactgtgg gggattcacc
 601 atcctaata tgcggcagag cagacaaagc tctatcaaaa cccaaccacc tatatttccg
 661 ttgggacatc aactactaac cagagattgg taccagaat agctactaga tccaaagtaa
 721 acgggcaaag tggaggatg gagttcttct ggacaatttt aaaaccgaat gatgcaatca
 781 acttcgagag taatggaaat ttcattgctc cagaatagc atacaaaatt gcaagaaag
 841 gggactcaac aattatgaaa agtgaattgg aatattgtaa ctgcaacacc aagtgtcaaa
 901 ctccaatggg ggogataaac tctagtagc cattccaca tataccctc ctcaccatcg
 961 gggaatgcc caaatatgtg aaatcaaa ca gattagtcct tgcgactggg ctcaaaaa
 1021 gccctcaaag agagaaaaga agaaaaaga gaggattatt tggagctata gcaggtttta
 1081 tagagggagg atggcagggg atggtagatg gttggtagt gtaccaccat agcaatgaac
 1141 aggggagtg gtacgctgca gacaaaagat ccactcaaaa ggcaatagat ggagtcacca
 1201 ataaggtcaa ctgatcatt gacaaaatga acaactcagt tgaggccgtt ggaagggat
 1261 ttaacaactt agaaaggaga atagagaatt taacaagaa gatggaagac gggttcctag
 1321 atgtctggac ttataatgct gaacttctgg ttctcatgga aatagagaga actctagact
 1381 ttcattgactc aaatgtcaag aacctttacg acaaggtccg actacagctt agggataatg
 1441 caaaggagct gggtaacggt tgtttcagat tctatcataa atgtgataat gaatgtatgg
 1501 aaagcgtaag aaacggaacg tatgactacc cgcagatttc agaagaagca agactaaaaa
 1561 gagaggaat aagtggagta aaattggaat caataggaat ttaccaata ctgtcaattt
 1621 attctacagt ggcgagttcc ctgactctgg caatcatggt agctggctca tccttatgga
 1681 tgtgctcaa tgggtcgta caatgcagaa tttgcattta aatttgtgag ttcagattgt
 1741 agttaaaaac acccttggtt ctact

//

LOCUS FJ265567 1742 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus (A/sparrow/Thailand/Phitsanulok-01/2004 (H5N1))
 segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265567
 VERSION FJ265567.1 GI:209164547
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus (A/sparrow/Thailand/Phitsanulok-01/2004 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus (A/sparrow/Thailand/Phitsanulok-01/2004 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1742)
 AUTHORS Sanguansermsri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermsri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1742)
 AUTHORS Sanguansermsri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermsri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1742
 /organism="Influenza A virus
 (A/sparrow/Thailand/Phitsanulok-01/2004 (H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/sparrow/Thailand/Phitsanulok-01/2004"
 /serotype="H5N1"
 /host="sparrow"
 /db_xref="taxon:470558"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2004"
 gene 13..1719
 /gene="HA"
 CDS 13..1719
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41124.1"
 /db_xref="GI:209164548"
 /translation="MEKIVLLFAIVSLVKSQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDDLVGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPV
 NDLCPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTYISVGT
 STLNQLRVPRIATRSKVNQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
 DSTIMKSELEYGNCNTKQCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVLTGLR
 NSPQREKRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQKAID
 GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN

ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY

SEEARKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNSGLQCRI

CI"

ORIGIN

1 caatctgtca aaatggagaa aatagtgctt ctttttgcaa tagtcagtct tghtaaaagt
61 gatcagattt gcattggta ccatgcaaac aactcgacag agcaggttga cacaataatg
121 gaaaagaacg ttactgttac acatgcccaa gacatactgg aaaagacaca caacgggaag
181 ctctgcatc tagatggagt gaagcctcta attttgagag attgtagtgt agctggatgg
241 ctctcgga acccaatgtg tgacgaatc atcaatgtgc cggaaatggtc ttacatagtg
301 gagaaggcca atccagtcaa tgacctctgt taccagggg atttcaatga ctatgaagaa
361 ttgaaacacc tattgagcag aataaaccat tttgagaaaa ttcagatcat ccccaaaagt
421 ttttggtcca gtcatgaagc ctcataggg gtgagctcag catgtccata ccagggaaag
481 tcctcctttt tcagaaatgt ggtatggctt atcaaaaaga acagtacata cccaacaata
541 aagaggagct acaataatac caaccaagaa gatcttttgg tactgtgggg gattcaccat
601 cctaatgatg cggcagagca gacaaagctc tatcaaaacc caaccaceta tatttccggt
661 gggacatcaa cactaaacca gagattggta ccaagaatag ctactagatc caaagtaaac
721 gggcaaagtg gaaggatgga gttctctctgg acaattttaa aaccgaatga tgcaatcaac
781 ttcgagagta atggaaattt cattgctcca gaatatgcat acaaaattgt caagaagggg
841 gactcaacaa ttatgaaaag tgaattgcaa tatggtaact gcaacaccaa gtgtcaaaact
901 ccaatggggg cgataaactc tagtatgcca ttcacaata tacacctct caccatggg
961 gaatgcccc aatatgtgaa atcaaacaga ttagtccttg cgactgggct cagaaatagc
1021 cctcaagag agaaaagaag aaaaaagaga ggattatttg gagctatagc aggttttata
1081 gagggaggat ggcagggaat ggtagatggt tggtaggggt accaccatag caatgaacag
1141 gggagtgggt acgctgcaga caaagaatcc actcaaaagg caatagatgg agtcaccaat
1201 aaggtcaact cgatcattga caaaatgaac actcagtttg aggccgttgg aagggaattt
1261 aacaacttag aaaggagaat agagaattta aacaagaaga tggaaagcgg gttcctagat
1321 gtctggactt ataatgctga acttctgggt ctcatggaaa atgagagaac tctagacttt
1381 catgactcaa atgtcaagaa cttttacgac aaggctcgac tacagcttag ggataatgca
1441 aaggagctgg gtaacggttg tttcgagttc tatcataaat gtgataatga atgtatggaa
1501 agcgtaaaga acggaacgta tgactaccog cagtattcag aagaagcaag actaaaaaga
1561 gaggaaataa gtggagtaaa attggaatca ataggaattt accaaatact gtcaatttat
1621 tctacagtgg cgagttcctt agcactggca atcatggtag ctggtctatc ctatggatg
1681 tgctccaatg ggtcgttaca atgcagaatt tgcatttaa tttgtgagtt cagattgtag
1741 tt

//

LOCUS FJ265569 1730 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus (A/chicken/Nakornsawan/NIAH6-3-0009/2005 (H5N1))
 segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265569
 VERSION FJ265569.1 GI:209164551
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus (A/chicken/Nakornsawan/NIAH6-3-0009/2005 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus (A/chicken/Nakornsawan/NIAH6-3-0009/2005 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1730)
 AUTHORS Sanguansermsri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermsri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1730)
 AUTHORS Sanguansermsri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermsri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1730
 /organism="Influenza A virus
 (A/chicken/Nakornsawan/NIAH6-3-0009/2005 (H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/chicken/Nakornsawan/NIAH6-3-0009/2005"
 /serotype="H5N1"
 /host="chicken"
 /db_xref="taxon:439953"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2005"
 gene 1..1707
 /gene="HA"
 CDS 1..1707
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41126.1"
 /db_xref="GI:209164552"

/translation="MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGDGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPI
 NDLCPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTMLYQNPTTYISIGT
 STLNQRLLVPRIATRISKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
 DSTIMKSELEYGNCNTKCTPMGAINSSMPFHNHPLTIGCEPKYVKSRLVLTGLR
 NSPQREKRRKRGLEFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID
 GVTNKVNSIIDKMNTOFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELMVLNEN

ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY

SEEARKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNGLQCRI

CI"

ORIGIN

1 atggagaaaa tagtgcttct ttttgaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc
 61 attggttacc atgcaaaaa ctgacagag caggttgaca caataatgga aaaaaacggt
 121 actgttacac atgccaaga cactctggaa aagacacaca acggaagct ctgcatcta
 181 gatggagtga agcctctaatt tttgagagat tgtagtgtag ctggatggct cctcggaaac
 241 ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggctctt acatagtggga gaagccaat
 301 ccaatcaatg acctctgcta cccaggagat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta
 361 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaggttc ttggtccagt
 421 catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatata agggaaagtc ctcttttttc
 481 agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac
 541 aataatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttccatcc taatgatggc
 601 gcagagcaga caatgctcta tcaaaacca accacctata ttccattgg gacatcaaca
 661 ctaaaccaga gattgttacc aagaatagct actagatcca aagtaaagg gcaaagtggg
 721 aggatggagt tcttctggaç aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat
 781 ggaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt
 841 atgaaaagtg aattggaata tgtaactgc aacaccaagt gtcaaaactcc aatggggggc
 901 ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa
 961 tatgtgaaat caaacagatt agtcttggc actggactca gaaatagccc tcaagagag
 1021 aaaagaagaa aaaagagagg attatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg
 1081 cagggaatgg tagatgggtt gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac
 1141 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg
 1201 atcattgaca aatgaacac tcagtttgag gcagttggaa gggaaatttaa caacttagaa
 1261 aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat
 1321 aatgctgaac ttatggttct catggaaaat gagagaacte tagactttca tgactcaaat
 1381 gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt
 1441 aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaac
 1501 ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaaagaga ggaataagt
 1561 ggagtaaaat tggaaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg
 1621 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatggg
 1681 tcgttacaat gcagaatttg catttaaat tgtgagttca gattgtagtt

//

LOCUS FJ265570 1758 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus (A/duck/Uthaithani/NIAH6-3-0008/2005 (H5N1))
 segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265570
 VERSION FJ265570.1 GI:209164553
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus (A/duck/Uthaithani/NIAH6-3-0008/2005 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus (A/duck/Uthaithani/NIAH6-3-0008/2005 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1758)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1758)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1758
 /organism="Influenza A virus
 (A/duck/Uthaithani/NIAH6-3-0008/2005 (H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/duck/Uthaithani/NIAH6-3-0008/2005"
 /serotype="H5N1"
 /host="duck"
 /db_xref="taxon:439963"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2005"
 gene 13..1719
 /gene="HA"
 CDS 13..1719
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41127.1"
 /db_xref="GI:209164554"
 /translation="MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPV
 NDLCPGDFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSHEASLGVSSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTYISVGT
 STLNQRVLPRIATRISKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
 DSTIMKSELEYGNCNTKQCQTPMGAINSSMPFHNHPLTIGCEPKYVKS NRLVLATGLR
 NSPQRERRRRKRLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID
 GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWWTYNAELLVLMEN

ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNARELGNCGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY

SEEARKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNSGSLQCRI

CI"

ORIGIN

1 caatctgtca aaatggagaa aatagtgctt ctttttgc aa tagtcagtct tgttaaaagt
61 gatcagatct gcattgggta ccatgcaaac aactcgacag agcaggttga cacaataatg
121 gaaaagaacg ttactgttac acatgccc aa gacatactgg aaaagacaca caacgggaag
181 ctctgcgata tagatggagt gaagcctcta attttgagag attgtagtgt agctggatgg
241 ctctcggaa acccaatgtg tgacgaatc atcaatgtgc cggaaatggtc ttacatagtg
301 gagaaggcca atccagtcaa tgacctctgt taccagggg atttcaatga ctatgaagaa
361 ttgaaacacc tattgagcag aataaacatc tttgagaaaa ttcagatcat ccccaaaagt
421 tcttgggtcc gtcatgaagc ctcataggg gtgagctcag catgtccata ccagggaaag
481 tcctcctttt tcagaaatgt ggtatggctt atcaaaaaga acagtacata cccaacaata
541 aagaggagct acaataatac caaccaagaa gatcttttgg tactgtgggg gattcaccat
601 cctaataatg cggcagagca gacaaagctc tatcaaaacc caaccaccta tatttccggt
661 gggacatcaa cactaaatca gagattggta ccaagaatag ctactagatc caaagtaaac
721 gggcaaagtg gaaggatgga gttcttctgg acaattttaa aaccgaatga tgcaatcaac
781 ttcgagagta atggaaatct cattgtctca gaatatgcat acaaaattgt caagaaaggg
841 gactcaacaa ttatgaaaag tgaattggaa tatggtaact gcaacaccaa gtgtcaaac
901 ccaatggggg cgataaacct tagtatgcca ttccacaata tacatcctct caccatggg
961 gaatgcccc aatatgtgaa atcaaacaga ttagtctctg cgactgggct cagaaatagc
1021 cctcaaagag agagaagaag aaaaagaga ggattatttg gagctatagc aggttttata
1081 gaggagggat ggcagggaat gtagatggtt tggtaggggt accaccatag caatgagcag
1141 gggagtgggt acgctgcaga caaagaatcc actcaaaagg caatagatgg agtcaccaat
1201 aaggtcaact cgatcattga caaatgaac actcagtttg aggccgttg aagggaaattt
1261 aacaacttag aaaggagaat agagaattta aacaagaaga tggagagcgg gttcctagat
1321 gtctggactt ataatgctga acttctggtt ctcattggaa atgagagaac tctagacttt
1381 catgactcaa atgtcaagaa cctttacgac aagggtccgac tacagcttag ggataatgca
1441 aaggagctgg gtaacggttg tttcgagttc tatcataaat gtgataatga atgtatggaa
1501 agtgaagaa acggaacgta tgactaccgg cagtattcag aagaagcaag actaaaaaga
1561 gaagaaataa gtggagtaaa attggaatca ataggaattt accaaatact gtcaatttat
1621 tctacagtgg cgagttcctc agcactggca atcatggtag ctggtctatc cttatggatg
1681 tgctccaatg ggtcgttaca atgcagaatt tgcattttaa tttgtgagtt cagattgtag
1741 ttaaaaacac ccttggtt

//

LOCUS FJ265571 1755 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Phitsanulok/NIAH6-3-0012/2005 (H5N1)) segment 4
 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265571
 VERSION FJ265571.1 GI:209164555
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Phitsanulok/NIAH6-3-0012/2005 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Phitsanulok/NIAH6-3-0012/2005 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1755)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1755)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1755
 /organism="Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Phitsanulok/NIAH6-3-
 0012/2005 (H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/chicken/Thailand/Phitsanulok/NIAH6-3-
 0012/2005"
 /serotype="H5N1"
 /host="chicken"
 /db_xref="taxon:564192"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2005"
 gene 26..1732
 /gene="HA"
 CDS 26..1732
 -/gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41128.1"
 /db_xref="GI:209164556"
 /translation="MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCEFINVPEWSYIVEKANPV
 NDLCPGDFNDYEELKHLRSRINHFEKIQIIPKSSWSSESASLGVSSACPYQKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTYISVGT
 STLNQRLVPRIATRSKVNQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
 DSTIMKSELEYGNCNTKQCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNNKLVLATGLR

NSPQRERRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIID

GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN

ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY

SEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNNGSLQCRI

CI"

ORIGIN

1 aagccggggg gttcaatctg tcaaatgga gaaaatagtg cttctttttg caatagtcag
 61 tcttgttaaa agtgatcaga ttgcatggg ttaccatgca aacaactcga cagagcaggt
 121 tgacacaata atggaaaaga acgttactgt tacacatgcc caagacatac tggaaaagac
 181 acacaacggg aagctctgcg atctagatgg agtgaagcct ctaattttga gagattgtag
 241 tgtagctgga tggctoctcg gaaaccaat gtgtgacgaa ttcatcaatg tgcggaatg
 301 gtcttacata gtggagaagg ccaatccagt caatgacctc tgttaccag gggatttcaa
 361 tgactatgaa gaattgaaac acctattgag cagaataaac cattttgaga aaattcagat
 421 catcccaaaa agttcttggg ccagtcatga agcctcatta ggggtgagct cagcatgtcc
 481 ataccaggga aagtccctct ttttcagaaa tgtggatgg cttatcaaaa agaacagtac
 541 ataccaaca ataaagagga gctacaataa taccaacca gaagatcttt tggactgtg
 601 ggggattcac catcctaag atgoggcaga gcagacaaag ctctatcaaa acccaaccac
 661 ctatatttcc gttgggacat caacactaaa tcagagattg gtaccaagaa tagctactag
 721 atccaaagta aacgggcaaa gtggaaggat ggagttcttc tggacaattt taaaaccgaa
 781 tgatgcaatc aacttcgaga gtaatggaaa tttcattgct ccagaatacg catacaaaat
 841 tgtcaagaaa ggggactcaa caattatgaa aagtgaattg gaatatggta actgcaacac
 901 caagtgtcaa actccaatgg gggcgataaa ctctagtagg ccattccaca atatacacc
 961 tctcaccatc ggggaatgcc ccaaatatgt gaaatcaaac aaattagtcc ttgagactgg
 1021 gctcagaaat agcctcaaa gagagagaag aagaaaaaag agaggattat ttggagctat
 1081 agcagggttt atagaggag gatggcagg aatggtagat ggttggtag ggtaccacca
 1141 tagcaatgag caggggagtg ggtacgctgc agacaaggaa tccactcaaa aggcaataga
 1201 tggagtcacc aataaggtca actcgatcat tgacaaaatg aacaccaggt ttgaggcctg
 1261 tgggaaggaa ttaacaact tagaaaggag aatagagaat taaacaaga agatggaaga
 1321 cgggttcccta gatgtctgga cttataatgc tgaacttctg gttctcatgg aaaatgagag
 1381 aactctagac tttcatgact caaatgtcaa gaacctttac gacaaggctc gactacagct
 1441 tagggataat gcaaaggagc tgggtaacgg ttgtttcgag ttctatcata aatgtgataa
 1501 tgaatgtatg gaaagtgtaa gaaacggaac gtatgactac ccgcagtatt cagaagaagc
 1561 aagactaaaa agagaagaaa taagtggagt aaaattggaa tcaataggaa tttaccaaat
 1621 actgtcaatt tattctacag tggcgagttc cctagcactg gcaatcatgg tagctggctt
 1681 atccttatgg atgtgetcca atgggtcgtt acaatgcaga atttgcattt aaatttgtga
 1741 gttcagattg tagtt

//

LOCUS FJ265572 1748 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus (A/chicken/Uthaithani/NIAH6-3-0007/2005(H5N1))
 segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265572
 VERSION FJ265572.1 GI:209164557
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus (A/chicken/Uthaithani/NIAH6-3-0007/2005(H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus (A/chicken/Uthaithani/NIAH6-3-0007/2005(H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1748)
 AUTHORS Sanguansermsri,P., Kanthiyawong,S., Chamnanpood,C.,
 Chamnanpood,P.
 and Sanguansermsri,D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1748)
 AUTHORS Sanguansermsri,P., Kanthiyawong,S., Chamnanpood,C.,
 Chamnanpood,P.
 and Sanguansermsri,D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1748
 /organism="Influenza A virus
 (A/chicken/Uthaithani/NIAH6-3-0007/2005(H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/chicken/Uthaithani/NIAH6-3-0007/2005"
 /serotype="H5N1"
 /host="chicken"
 /db_xref="taxon:470546"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2005"
 gene 19..1725
 /gene="HA"
 CDS 19..1725
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41129.1"
 /db_xref="GI:209164558"

 /translation="MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDDLGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPV
 NDLCPYGFDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSHEASLGVSSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGT
 STLNQLVPRIATR SKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
 DSTIMKSELEYGNCNTKQCOTPMGAINSSMPFHNHPLTIGECPKYVKSRLVLTGLR
 NSPQRERRRRKRGFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQKAID
 GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN

ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPOY

SEEARKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNNGSLQCRI

CI"

ORIGIN

1 ggggggtcat ctgtcaaaat ggagaaaata gtgcttcttt ttgcaatagt cagtcttggt
61 aaaagtgatc agatttgcat tggttaccat gcaaacaact cgacagagca ggttgacaca
121 ataatggaaa agaacgttac tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa gacacacaac
181 gggaagctct gcgatctgga tggagtgaag cctctaactc tgagagattg tagtgtagct
241 ggatggctcc tcggaaaacc aatgtgtgac gaattcatca atgtgcogga atggctctac
301 atagtggaga aggccaatcc agtcaatgac ctctgttacc caggggattt caatgactat
361 gaagaattga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca gatcatcccc
421 aaaagttctt ggtccagtca tgaagcctca ttaggggtga gctcagcatg tccataccag
481 ggaaagtctc cctttttcag aaatgtggta tggcttatca aaaagaacag tacatacoca
541 acaataaaga ggagctacaa taataccaac caagaagatc ttttggtagt gtgggggatt
601 caccatccta atgatcggc agagcagaca aagctctatc aaaaccaac cacctatatt
661 tccgttgga catcaacact aaaccagaga ttggtacca gaatagctac tagatccaaa
721 gtaaacggc aaagtgaag gatggagttc ttctggaca ttttaaaacc gaatgatgca
781 atcaacttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcataca aattgtcaag
841 aaaggggact caacaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa caccaagtgt
901 caaactcaa tggggcgat aaactctagt atgccattcc acaatataca cctctcacc
961 atcggggaat gcccaaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcgac tgggctcaga
1021 aatagccctc aaagagagag aagaagaaaa aagagaggat tatttggagc tatagcaggt
1081 tttatagagg gaggatggca ggaatggta gatggttggt atgggtacca ccatagcaat
1141 gagcagggga gtgggtacgc tgcagacaaa gaatccactc aaaaggcaat agatggagtc
1201 accaataagg tcaactcgat cattgacaaa atgaacactc agtttgaggc cgttggaagg
1261 gaatttaaca acttagaaaag gagaatagag aatttaaca agaagatgga agacgggttc
1321 ctagatgtct ggacttataa tgctgaactt ctggttctca tggaaaatga gagaactcta
1381 gactttcatg actcaaatgt caagaacctt tacgacaagg tccgactaca gcttagggat
1441 aatgcaaagg agctgggtaa cgtttgtttc gagttctatc ataatgtga taatgaatgt
1501 atggaaagtg taagaaacgg aacgtatgac taccgcgagt attcagaaga agcaagacta
1561 aaaagagagg aaataagtgg agtaaaattg gaatcaatag gaatttacca aatagtgtca
1621 atttattcta cagtggcgag ttccctagca ctggcaatca tggtagctgg tctatcetta
1681 tggatgtgct ccaatgggtc gttacaatgc agaatttgca tttaaatttg tgagttcaga
1741 ttgtagtt

//



LOCUS FJ265573 1730 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0006/2005 (H5N1))
 segment
 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265573
 VERSION FJ265573.1 GI:209164559
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0006/2005 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0006/2005 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1730)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1730)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1730
 /organism="Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-
 0006/2005 (H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-
 0006/2005"
 /serotype="H5N1"
 /host="chicken"
 /db_xref="taxon:564187"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2005"
 gene 5..1711
 /gene="HA"
 CDS 5..1711
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41130.1"
 /db_xref="GI:209164560"
 /translation="MEKIVLLFAIVSLVKSQVICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKANPV
 NDLCPGDFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSSEASLGVSSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDATEQTKLYQNPTYISVGT
 STLNQRLLPRIATRSKVNQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG

DSTIMKSELEYGNCNTKQCPTPMGAINSSMPFHNHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLR

NSPQRERRRKRGLFGLAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQKAID

GVTNKVNSIINKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELVLMEN

ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNCCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY

SEEARLKREETSIGVKLESTGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCFNGLQCRI

CI"

ORIGIN

1 caaaatggag aaaatagtgc ttctttttgc aatagtcagt cttgttaaaa gtgttcagat
61 ttgcattggg taccatgcaa acaactcgac agagcaggtt gacacaataa tggaaaagaa
121 cgttactggt acacatgccc aagacatact agaaaagaca cacaacggga agctctgcga
181 tetagatgga gtaaagcctc taattttgag agattgtagt gtagctggat ggctcctcgg
241 aaacccaatg tgtgacgaat tcatcaatgt gccggaatgg tcttacatag tggagaaggc
301 caatccagtc aatgacctct gttaccagg ggatttcaat gactatgaag aattgaaaca
361 cctattgagc agaataaacc attttgagaa aattcagatc atccccaaaa gttcttggtc
421 cagtcatgaa gcctcattag gggtgagctc agcatgtcca taccagggaa agtcctcctt
481 tttcagaaat gtggtagtgc ttatcaaaaa gaacagtaca taccacaaca taaagaggag
541 ctacaataat accaaccaag aagatctttt ggtactatgg gggattcacc atcctaatga
601 tgcgacagag cagacaaagc tctatcaaaa cccaaccacc tatatttccg ttgggacatc
661 aacactaaac cagagattga taccaagaat agctactaga tccaaagtaa acgggcaaag
721 tggaggatg gagttcttct ggacaatttt aaaaccgaat gatgcaatca acttcgagag
781 taatggaaat ttcattgctc cagaatatgc atacaaaatt gtcaagaaag gggactcaac
841 aattatgaaa agtgaattgg aatatggtaa ctgcaacacc aagtgtcaaa ctccaatggg
901 ggcgataaac tctagtatgc cattccacaa tatacacctc ctcaccatcg gggaatgcc
961 caaatatgtg aatcaaaaca gattagtctt tgcgactggg ctcaaaaata gccctcaaag
1021 agagagaaga cgaaaaaaga gaggattatt tggagctata gcaggtttta tagaggagg
1081 atggcaggga atggtagatg gttggtatgg gtaccaccat agcaatgagc aggggagtg
1141 gtacgctgca gacaaagaat ccaactcaaaa ggcaatagat ggagtcacca ataaggtaa
1201 ctcgataatt aacaaaatga acaactcagtt tgaggccgtt ggaagggaaat ttaacaactt
1261 agaaaggaga atagagaatt taacaagaa gatggaagac gggttcctag atgtctggac
1321 ttataatgct gaacttctgg ttctcatgga aaatgagaga actctagact ttcatgactc
1381 aaatgtcaag aacctttacg acaaggtccg actacagctt agggataatg caaaggagct
1441 gggtaatggt tgtttcgagt tctatcataa atgtgataat gaatgtatgg aaagtgtaag
1501 aaacggaacg tatgactacc cgcagtatc agaagaagca agactaaaaa gagaggaaat
1561 aagtggagta aaattggaat caacaggaaat ttaccaataa ctgtcaattt attctacagt
1621 ggcgagttcc ctagcactgg caatcatggt agctggtcta tccttatgga tgtgcttcaa
1681 tgggtcgta caatgcagaa tttgcattta aatttgtgag ttcagattgt

//

LOCUS FJ265574 1744 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0008/2005 (H5N1))
 segment
 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265574
 VERSION FJ265574.1 GI:209164561
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0008/2005 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0008/2005 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1744)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1744)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1744
 /organism="Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-
 0008/2005 (H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-
 0008/2005"
 /serotype="H5N1"
 /host="chicken"
 /db_xref="taxon:564188"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2005"
 gene 15..1721
 /gene="HA"
 CDS 15..1721
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41131.1"
 /db_xref="GI:209164562"
 /translation="MEKIVLPFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGDKVPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPV
 NDLCPYGFDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGT
 STLNQRLVPRIATRISKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG

DSTIMKSELEYGNCNTRKQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVLATGLR
 NSPQRERRRKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID
 GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN
 ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
 SEEARLKREEISGVKLESTGIYOILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNSNGSLQCRI

CI"

ORIGIN

1 gtcaatctgt caaaatggag aaaatagtg ctccttttgc aatagtcagt cttgttaaaa
 61 gtgatcagat ttgcattggt taccatgcaa acaactcgac agagcagggt gacacaataa
 121 tggaaaagaa cgttactggt acacatgccc aagacatact ggaaaagaca cacacgggga
 181 agctctgcca tctagatgga gtgaagcctc taattttgag agattgtagt gtagctggat
 241 ggctctcgg aaaccaatg tgtgacgaat tcattaatgt gccggaatgg tcttacatag
 301 tggagaaggc caatccagtc aatgacctct gttaccagg ggatttcaat gactatgaag
 361 aattgaaaca cctattgagc agaataaacc attttgagaa aattcagatc atccccaaaa
 421 gttcttggtc cagtcatgaa gcctcattag gggtagagctc agcatgtcca taccagggaa
 481 agtcctcctt tttcagaaat gtggtatggc ttatcaaaaa gaacagtaca taccacaaca
 541 taaagaggag ctacaataat accaaccaag aagatctttt ggtactgtgg gggattcacc
 601 atcctaataa tgcggcagag cagacaaagc tctatcaaaa cccaaccacc tatatttccg
 661 ttgggacatc aacaactaac cagagattgg taccagaagt agctactaga tccaaagtaa
 721 acgggcaaaag tgaagggatg gatttcttct ggacaatttt aaaccgaat gatgcaatca
 781 acttcgagag taatggaaat ttcattgctc cagaatatgc atacaaaatt gtcaagaaag
 841 gggactcaac aattatgaaa agtgaattgg aatatggtaa ctgcaacacc aagtgtcaaa
 901 ctccaatggg ggcgataaac tctagtatgc cattccaca tataccacct ctcaccatcg
 961 gggaaatgcc caaatatgtg aaatcaaaaca gattagtcc tgcgactggg ctcagaaata
 1021 gccctcaaag agagagaaga agaaaaaaga gaggattatt tggagctata gcaggtttta
 1081 tagagggagg atggcagggg atggtagatg gttggtagtg gtaccaccat agcaatgagc
 1141 aggggagtggt gtacgctgca gacaaagaat ccaactcaaaa ggcaatagat ggagtcacca
 1201 ataagggtcaa ctcgataaatt gacaaaatga acaactcagtt tgaggccggt ggaagggat
 1261 ttaacaactt agaaaggaga atagagaatt taaacaagaa gatggaagac gggttcctag
 1321 atgtctggac ttataatgct gaacttctgg ttctcatgga aatgagaga actctagact
 1381 ttcattgactc aaatgtcaag aacctttacg acaaggctcg actacagctt agggataatg
 1441 caaaggagct gggtaacggg tgtttcgagt tctatcataa atgtgataat gaatgtatgg
 1501 aaagtgtgag aaacggaacg tatgactacc cgcagtattc agaagaagca agactaaaaa
 1561 gagaggaaat aagtggagta aaattggaat caacaggaat ttaccaataa ctgtcaattt
 1621 attctacagt ggcgagttcc cttagcactgg caatcatggt agctgggtcta tccttatgga
 1681 tgtgctccaa tgggtcgtta caatgcagaa tttgcattta aatttgtgag ttcagattgt
 1741 agtt

//

LOCUS FJ265575
 1744 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0009/2005 (H5N1)) segment
 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265575
 VERSION FJ265575.1 GI:209164563
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0009/2005 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0009/2005 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1744)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1744)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1744
 /organism="Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-
 0009/2005 (H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-
 0009/2005"
 /serotype="H5N1"
 /host="chicken"
 /db_xref="taxon:564189"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2005"
 gene 15..1721
 /gene="HA"
 CDS 15..1721
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41132.1"
 /db_xref="GI:209164564"

 /translation="MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKANPV
 NDLCPGDFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSSEASLGVSACPYQGKSSFF
 RNVVWLKKNSTYPTIKRSYNNFNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTYISVGT
 STLNQLRVPRIATRSKVNQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG

DSTIMKSELEYGNCNTKQCOTPMGAINSSMPFHNIPPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLR
 NSPQRERRRRKRLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAID
 GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVIMEN
 ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPOY
 SEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNNGSLQCRI

CI"

ORIGIN

1 ttcaatctgt caaatggag aaaatagtgc ttctttttgc aatagtcagt cttgttaaaa
 61 gtgatcagat ttgcattggt taccatgcaa acaactcgac agagcagggt gacacaataa
 121 tggaaaagaa cgttactggt acacatgccc aagacatact ggaaaagaca cacaacggga
 181 agctctgcca tctagatgga gtgaagcctc taattttgag agattgtagt gtagctggat
 241 ggctcctcgg aaacccaatg tgtgacgaat tcattaatgt gccggaatgg tcttacatag
 301 tggagaaggc caatccagtc aatgacctct gttaccagg ggatttcaat gactatgaag
 361 aattgaaaca cctattgagc agaataaacc attttgagaa aattcagatc atccccaaaa
 421 gttcttggtc cagtcatgaa gcctcattag gggtagctc agcatgtcca taccagggaa
 481 agtctctcct tttcagaaat gtggtatggc ttatcaaaaa gaacagtaca taccacaaca
 541 taaagaggag ctacaataat accaaccaag aagatctttt ggtactgtgg gggattcacc
 601 atcctaataa tgcggcagag cagacaaagc tctatcaaaa cccaaccacc tatatttctg
 661 ttgggacatc aacactaaac cagagattgg taccaagaat agctactaga tccaaagtaa
 721 acgggcaaag tgaagggatg gagttcttct ggacaatttt aaaaccgaat gatgcaatca
 781 acttcgagag taatggaaat ttcattgctc cagaatatgc atacaaaatt gtcaagaaag
 841 gggactcaac aattatgaaa agtgaattgg aatatggtaa ctgcaacacc aagtgtcaaa
 901 ctccaatggg ggcgataaac tctagtagtc cattccacaa tataccccct ctcaccatcg
 961 gggaatgccc caaatatgtg aaatcaaaaca gattagtccct tgcgactggg ctcagaaata
 1021 gccctcaaag agagagaaga agaaaaaaga gaggattatt tggagctata gcaggtttta
 1081 tagagggagg atggcaggga atggtagatg gttggtagtg gtaccaccat agcaatgagc
 1141 aggggagtggt gtacgctgca gacaaagaat ccaactcaaaa ggcaatagat ggagtcacca
 1201 ataagggtcaa ctcgataaatt gacaaaatga acaactcagtt tgaggccggt ggaagggaaat
 1261 ttaacaactt agaaaggaga atagagaatt taacaagaa gatggaagac gggttcctag
 1321 atgtctggac ttataatgct gaacttctgg ttctcatgga aatgagaga actctagact
 1381 ttcattgactc aaatgtcaag aacctttacg acaagggtccg actacagctt agggataatg
 1441 caaaggagct gggtaacggt tgtttcgagt tctatcataa atgtgataat gaatgtatgg
 1501 aaaggttgag aaacggaacg tatgactacc cgcagtatc agaagaagca agactaaaaa
 1561 gagaggaaat aagtggagta aaattggaat caataggaat ttacaaata ctgtcaattt
 1621 attctacagt ggcgagttcc cttagcactgg caatcatggt agctgggtcta tcttatgga
 1681 tgtgctccaa tgggtcgtaa caatgcagaa tttgcattta aatttgtgag ttcagattgt
 1741 agtt

//

LOCUS FJ265576 1740 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0010/2005 (H5N1)) segment
 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265576
 VERSION FJ265576.1 GI:209164565
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0010/2005 (H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-0010/2005 (H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1740)
 AUTHORS Sanguansermsri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermsri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1740)
 AUTHORS Sanguansermsri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermsri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1740
 /organism="Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-
 0010/2005 (H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/chicken/Thailand/Kamphaengphet/NIAH6-3-
 0010/2005"
 /serotype="H5N1"
 /host="chicken"
 /db_xref="taxon:564190"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2005"
 gene 11..1717
 /gene="HA"
 CDS 11..1717
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41133.1"
 /db_xref="GI:209164566"

 /translation="MEKIVLLFAIVSLVKSQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGDKVPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPV
 NDLCPGDFNDYEELKHLISRINHFEDIQIIPKSSWSSEASLGVSSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGT
 STLNQRLVPRIATRISKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
 DSTIMKSELEYGNCNTKQOTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVLAATGLR

NSPQRERRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAID
 GVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWWTYNAELLVLMEN
 ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELNGCFFEYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY
 SEEARLKREEISGVKLESTGIYOILSIYSTVASSIALAIMVAGLSLWMCNGLQCRI

CI"

ORIGIN

1 atctgtcaaa atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga
 61 tcagatttgc attggttacc atgcaaacia ctcgacagag caggttgaca caataatgga
 121 aaagaacggt actggttacac atgcccaga catactggaa aagacacaca acgggaagct
 181 ctgcatctca gatggagtga agcctctaata tttgagagat tgtagtgtag ctggatggct
 241 cctcggaaac ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccc gaatggctctt acatagtgga
 301 gaaggccaat ccagtcaatg acctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt
 361 gaaacaccta ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc
 421 ttggtccagt catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc
 481 ctcctttttc agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa
 541 gaggagctac aataatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttcaccatcc
 601 taatgatgag gcagagcaga caaagctcta tcaaaacca accacctata tttccgttgg
 661 gacatcaaca ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaagg
 721 gcaaagtgga aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt
 781 cgagagtaat ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga
 841 ctcaacaatt atgaaaagtg aattggaata tggtactgc aacaccaagt gtcaactcc
 901 aatgggggag ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga
 961 atgccccaaa tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc
 1021 tcaaagagag agaagaagaa aaaagagagg attatttgga gctatagcag gttttataga
 1081 gggaggatgg cagggaatgg tagatgggtg gtatgggtac caccatagca atgagcagg
 1141 gagtgggtac gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa
 1201 ggtcaactcg ataattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaaattta
 1261 caacttagaa aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacgggt tcttagatgt
 1321 ctggacttat aatgctgaac ttctgggtct catggaaaat gagagaactc tagactttca
 1381 tgactcaaat gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa
 1441 ggagctgggt aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag
 1501 tgtgagaaac ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaaagaga
 1561 ggaaataagt ggagtaaaat tggaatcaac aggaatttac caaatactgt caatttattc
 1621 tacagtggcg agttccctag cactggcaat catggtaget ggtctatcct tatggatgtg
 1681 ctccaatggg tcgttacaat gcagaatttg catttaaat tgtgagttca gattgtagtt

//

LOCUS FJ265577 1750 bp cRNA linear VRL 13-OCT-2008
 DEFINITION Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Sukhothai/NIAH6-3-0013/2005(H5N1)) segment 4
 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.
 ACCESSION FJ265577
 VERSION FJ265577.1 GI:209164567
 KEYWORDS .
 SOURCE Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Sukhothai/NIAH6-3-0013/2005(H5N1))
 ORGANISM Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Sukhothai/NIAH6-3-0013/2005(H5N1))
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae;
 Influenzavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1750)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE The studies of genotypic pattern of avian influenza viruses
 (H5N1)
 isolated from 2003-2004 outbreak in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1750)
 AUTHORS Sanguansermisri, P., Kanthiyawong, S., Chamnanpood, C.,
 Chamnanpood, P.
 and Sanguansermisri, D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-SEP-2008) Biochemistry, Naresuan University,
 Faculty
 of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000,
 Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1750
 /organism="Influenza A virus
 (A/chicken/Thailand/Sukhothai/NIAH6-3-0013/2005(H5N1))"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/chicken/Thailand/Sukhothai/NIAH6-3-0013/2005"
 /serotype="H5N1"
 /host="chicken"
 /db_xref="taxon:564193"
 /segment="4"
 /lab_host="embryonic chicken egg"
 /country="Thailand"
 /collection_date="2005"
 gene 13..1719
 /gene="HA"
 CDS 13..1719
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="ACI41134.1"
 /db_xref="GI:209164568"

 /translation="MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTH
 AQDILEKTHNGKLCDLGDKVPLILRDCSVAGWLLGNPMCEDEFINPEWSYIVEKANPI
 NDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSEASLGVSSACPYQGKSSFF
 RNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGT
 STLNQRLLVPRIATRSKVNQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
 DSTIMKSELEYGNCNTKCQTMPGAINSSMPFRNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLR
 NSPQRERRRKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESSQKAID

GVTNKNVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWWTYNAELLVLMEN

ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQY

SEEARKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNSNGSLQCRI

CI"

ORIGIN

1 caatctgtca aaatggagaa aatagtgctt ctttttgcaa tagtcagtct tgttaaaagt
 61 gatcagattt gcattggta ccatgcaaac aactcgacag agcaggttga cacaataatg
 121 gaaaaaaaaac ttactgttac acatgcccaa gacatactgg aaaagacaca caacgggaag
 181 ctctgcgatc tagatggagt gaagcctcta attttgagag attgtagtgt agctggatgg
 241 ctctcteggaa acccaatgtg tgacgaattc atcaatgtgc cggaatggtc ttacatagtg
 301 gagaaggcca atccaatcaa tgacctctgt taccagggg atttcaatga ctatgaagaa
 361 ttgaaacacc tattgagcag aataaacat tttgagaaa ttcagatcat ccccaaaagt
 421 tcttgggtcca gtcatgaagc ctctattagg gtgagctcag catgtccata ccagggaaag
 481 tctctctttt tcagaaatgt ggtatggctt atcaaaaaga acagtacata cccaacaata
 541 aagaggagct acaataatac caaccaagaa gatcttttgg tactgtgggg gattcaccat
 601 cctaattgatg cggcagagca gacaaaagc tatcaaaacc caaccaccta tatttccggt
 661 gggacatcaa cactaaacca gagattggta ccaagaatag ctactagatc caaagtaaac
 721 gggcaaagtg gaaggatgga gttctctctg acaattttaa aaccgaatga tgcaatcaac
 781 ttcgagagta atggaattt cattgtccca gaatatgcat acaaaattgt caagaaaggg
 841 gactcaacaa ttatgaaaag tgaattggaa tatggtaact gcaacaccaa gtgtcaact
 901 ccaatggggg cgataaactc tagtatgcca ttccacaata tacacctct caccatcggg
 961 gaatgcccca aatattgtgaa atcaaacaga ttagtccttg cgactgggct cagaaatagc
 1021 cctcaagag agagaagaag aaaaaagaga ggattatttg gagctatagc aggttttata
 1081 gagggaggat ggcagggaaat ggtataggtt tggtatgggt accaccatag caatgagcag
 1141 gggagtgggt acgctgcaga caaagaatcc tctcaaaagg caatagatgg agtcaccaat
 1201 aaggtcaact cgatcattga caaaatgaac acccagttg aggcggttg aaggaaattt
 1261 aacaacttag aaaggagaat agagaattta aacaagaaga tggagacgg gttcctagat
 1321 gtctggactt ataatgctga acttctggtt ctcatggaaa atgagagaac tctagacttt
 1381 catgactcaa atgtcaagaa cctttacgac aaggtccgac tacagcttag ggataatgca
 1441 aaggagctgg gtaacggtt tttcgagttc tatcataaat gtgataatga atgtatggaa
 1501 agtgaagaa acggaacgta tgactaccog cagtattcag aagaagcaag actaaaaaga
 1561 gaggaataa gtggagtaa attggaatca ataggaattt accaaatact gtcaatttat
 1621 tctacagtgg cgagttcct agcactggca atcatggtag ctggtctatc cttatggatg
 1681 tgctccaatg ggtcgttaca atgcagaatt tgcatttaaa tttgtgagtt cagattaaaa
 1741 acaccttggt

//

OUTPUT ที่ได้จากโครงการ

1. ได้นำเสนอในการประชุมระดับชาติ 1 เรื่อง คือ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1
ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2547-2548

พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี, สมลักษณ์ กันธิยะวงศ์, จันทรเพ็ญ ชำนาญพุด, พรชัย ชำนาญพุด,
ดลฤดี สงวนเสริมศรี

ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 8 “วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาชุมชน สังคมมีความสุข” วันที่ 19 มีนาคม 2553 ณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

2. ได้ผลิตนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา 1 คน คือ น.ส. สมลักษณ์ กันธิยะวงศ์ ได้สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาโท วท.บ. (ชีวเคมี) จากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2552



ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1
ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2547-2548

Genetic Diversity of Hemagglutinin Gene of Avian Influenza Viruses H5N1

isolated from Lower Northern Thailand during 2004-2005 Outbreak

พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี¹ สมลักษณ์ กันธิยะวงศ์¹ จันทน์เพ็ญ ชำนาญพุด^{1,2} พรชัย ชำนาญพุด² ดลฤดี สงวนเสริมศรี³

Phanchana Sanguansermisri¹ Somluck Kanthiyawong¹ Chanpen Chamnanpood^{1,2}

Pornchai Chamnanpood² Donruedee Sanguansermisri³

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อวิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินิน (HA) ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่แยกได้จากการระบาดในปี พ.ศ. 2547- 2548 ในเขตภาคเหนือตอนล่างของ ประเทศไทย ผลจากจำนวน 50 ตัวอย่าง พบการ เรียงตัวของชนิดกรดอะมิโนที่ HA cleavage site เป็นแบบ Polybasic ในสองรูปแบบ คือ PQRERRRKKR (86%) และ PQREKRRKKR (14%) นอกจากนี้ยังพบตำแหน่ง glycosylation ในบริเวณที่ 154 ถึง 156 เป็น N-S-T และพบตำแหน่ง receptor binding ในบริเวณที่ 222 และ 224 เป็น Q และ G ซึ่งเป็นรูปแบบที่ พบในกลุ่มของไวรัสไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานในประเทศไทยจากฐานข้อมูล GenBank พบว่าร้อยละของความเหมือนกันของลำดับ นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน อยู่ในช่วง 98.3 ถึง 99.4 และ 97.8 ถึง 99.4 ตามลำดับ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่ายีน HA จากตัวอย่างที่ศึกษาอยู่ใน clade เดียวกัน และยังมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน HA ของไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในซ้ วงเดียวกันของการระบาดในประเทศไทย

คำสำคัญ : ฮีแมกกลูตินิน ไวรัสไข้หวัดนก ประเทศไทย

Abstract

The purpose of this study was to characterize the hemagglutinin (HA) genes of avian influenza viruses (H5N1) isolated from 2004 to 2005 in Lower Northern Thailand. The results of 50 viral isolated showed that all of their HA cleavage sites contained polybasic amino acid PQRERRRKKR (86%) or PQREKRRKKR (14%). All had the glycosylation site N-S-T at the amino acid position 154-156. The receptor binding site at 222 and 224 were glutamine and glycine, respectively, found specific to avian hosts. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the samples and the other data of Thailand from the GenBank database showed percent similarity varied from 98.3 to 99.4 and 97.8 to 99.4, respectively. Phylogenetic analysis illustrated that the HA genes in this study were in the same clade. In addition, they were also closely related to the HA gene of the influenza viruses isolated from both avian and mammals from the same time of the outbreak in Thailand.

Keyword : hemagglutinin, avian influenza, Thailand

E-mail : donruedee_sanguansermisri@hotmail.com

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง อําเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก 65130

Veterinary Research and Development Center Northern Lower Region, Wangthong, Phitsanulok 65130

³ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000

