

รายงานการวิจัยเรื่อง

การสร้าง Full-length cDNA Clone ของเชื้อไวรัสเด็งกีและการวิเคราะห์ผลของ
การกลายพันธุ์ ณ Structural Protein Cleavage Sites ต่อความสามารถในการเพิ่มจำนวน
ของเชื้อ

เสนอขอ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

โดย

นพ. นพพร อภิธิสมบัติ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตุลาคม 2541

สารบัญ

บทนำ	1
วิธีการทดลอง	3
1. การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสแดงกีโมเซลล์มู C636	3
2. การเตรียม Genomic RNA ของเชื้อไวรัสแดงกี	4
3. ปฏิบัติ Reverse Transcription และ Long Polymerase Chain Reaction	4
4. การสร้าง 5' Half-genome และ 3' Half-genome	5
5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 5' Half-genome และ 3' Half-genome	8
6. การทดสอบความคงตัวของ Full-length cDNA Clone ในแบคทีเรีย	11
7. ปฏิบัติ In vitro Transcription	11
8. การนำ In vitro Transcription Product เข้าสู่เซลล์โดย Transfection	13
9. การสร้าง PrM-M Cleavage Site Mutant โดย Site Directed Mutagenesis	13
ผลการทดลอง	16
1. การสร้าง Full-length cDNA Clone ของเชื้อไวรัสแดงกีสายพันธุ์ 16681	18
2. ความคงตัวของ Full-length cDNA Clone ในแบคทีเรีย	19
3. การสังเคราะห์ RNA โดยวิธี In vitro Transcription	20
4. การทดสอบ Infectivity ของ In vitro Transcript โดยวิธี Transfection	25
5. การสร้าง PrM-M Cleavage Site Mutant โดย Site Directed Mutagenesis	28
บทวิจารณ์	28
Output	32
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	34

บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออกและโรคอื่นที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกียังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและประเทศอื่นๆในเขตร้อน เนื่องจากขณะนี้เรายังไม่มียารักษาโรคและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ การศึกษาวิจัยเพื่อหาความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อ, การก่อโรค และการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคจึงยังคงต้องกระทำไปอย่างต่อเนื่อง ในระยะ 8 ปีที่ผ่านมา การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อไวรัสเด็งกีได้ก้าวหน้าไปมาก เพราะได้มีการพัฒนา full-length cDNA clone ที่สามารถใช้เป็นแม่แบบของการสร้าง infectious RNA transcript ขึ้นในหลอดทดลอง เพื่อนำเข้าสู่เซลล์และเป็นจุดเริ่มต้นการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเด็งกีในเซลล์ แต่ full-length cDNA clone เท่าที่มีผู้รายงานไว้ยังคงมีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น การใช้ low copy number plasmid vector และการเพิ่มจำนวนใน host cell ที่หาได้ยาก เพื่อช่วยลดข้อจำกัดเหล่านี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ 16681 ใน high copy number plasmid, pBluescript II KS, จนได้ full-length cDNA clone ที่มีความคงตัวสูงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในเซลล์แบคทีเรียที่หาได้ง่าย 2 ชนิด สามารถใช้ full-length cDNA clone ที่สร้างขึ้นเป็นแม่แบบของการสร้าง RNA transcript ที่เริ่มต้นการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในเซลล์ BHK-21 ได้ภายในเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากนำ RNA transcript เข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถนำ full-length cDNA sequence ถ่ายทอดให้แก่ high copy number plasmid, pGem 3Z, และสามารถสร้าง full-length cDNA clone ที่มีการกลายพันธุ์ที่ prM-M cleavage site ได้โดยไม่ยากนัก การสร้าง full-length cDNA clone ใน pBluescript II KS มีข้อดีหลายประการ เช่น การที่ pBluescript II KS ขาด restriction enzyme recognition site สำหรับหลายๆเอนไซม์ที่ตัดในสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสเด็งกีช่วยให้การ clone และการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมมีความคล่องตัวสูงขึ้น นอกจากนั้น การที่มี T7 and T3 RNA polymerase promoters จะช่วยให้สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ promoter ที่ใช้เดิมเข้ากับปลาย 5' ของสารพันธุกรรมได้ด้วย

ABSTRACT

Dengue hemorrhagic fever and other related diseases caused by dengue virus infection remain a major health problem in Thailand and many countries in the tropical region. The lack of specific anti-viral treatment and effective vaccine necessitate continuing research into viral replication strategy and mechanism, pathogenesis and vaccine development. These researches have been greatly augmented by the availability of full-length cDNA clones which can be used as template for generating in vitro infectious RNA transcripts capable of initiating viral replication cycle in susceptible host cells. Although several full-length cDNA clones were described since 1991, they suffered from the need to be propagated in low copy number plasmid vectors and, in some cases, specific *E. coli* strains. To facilitate the manipulation of dengue viral genome, we herein described a strategy for the construction of a full-length cDNA clone for a dengue type 2 strain 16681 in a high copy number plasmid, pBluescript II KS. Following the transformation into two commercially available *E. coli* strains, the full-length clone can be stably propagated at room temperature. Capped in vitro transcripts derived from the clone by using SP6 RNA polymerase were infectious upon transfection into BHK-21 cells as evidenced by positive staining for viral antigen by a 4-step peroxidase-anti-peroxidase method only 48 hours after transfection, and also by propagating viruses in mosquito cells. The full-length cDNA sequence was successfully transferred to another high copy number plasmid, pGem 3Z. In addition, several in vitro-generated mutant subclones bearing mutations at the preM-M cleavage sites were successfully introduced into the full-length clone through the rapid cloning strategy. Cloning of the full-length cDNA clone in this high copy number plasmid offers several advantages, such as the lack of several enzyme recognition sites in the vector sequence which allows greater flexibility during the cloning and modification steps. The presence of T7 and T3 RNA polymerase promoters in the vector also allows the comparison of promoter strength.

บทนำ

ในระยะ 8 ปีที่ผ่านมา การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อไวรัสเด็งกีได้ก้าวหน้าไปมาก เนื่องจากได้มีการพัฒนา full-length cDNA clone ที่สามารถใช้เป็นแม่แบบของการสร้าง infectious RNA transcript ขึ้นในหลอดทดลอง เพื่อนำเข้าสู่เซลล์และเป็นจุดเริ่มต้นการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเด็งกีในเซลล์ (ตารางที่ 1) เมื่อมี full-length cDNA clone แล้ว สามารถใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมต่างๆเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส เพื่อศึกษากลไกของการเปลี่ยนแปลงตามที่ได้กำหนดต่อลักษณะทางโครงสร้างและการทำงานขององค์ประกอบต่างๆของเชื้อไวรัส ซึ่งจะช่วยให้ได้ทราบถึงกลไกพื้นฐานของกระบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อในเซลล์ ตลอดจนปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสกับเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว

ในการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกีและเชื้อไวรัสอื่นในกลุ่ม positive-strand RNA virus โดยทั่วไปจะทำการสร้าง complementary DNA (cDNA) ของสารพันธุกรรม RNA แล้วเพิ่มจำนวนโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และนำเอา cDNA นี้ไปเชื่อมต่อกับ plasmid cloning vector เพื่อเพิ่มจำนวนใน E. coli อีกต่อหนึ่ง (Boyer และ Haenni, 1994) ในระหว่างการเพิ่มจำนวนมักจะออกแบบ primer ด้านปลาย 5' ของสารพันธุกรรมให้มีลำดับเบสต้นๆที่สามารถทำหน้าที่เป็น transcriptional promoter สำหรับเอนไซม์ RNA polymerase ที่มีต้นตอมาจาก E. coli phage T3, T7 หรือ SP6 ทั้งนี้เพื่อให้สามารถใช้ full-length cDNA clone เป็นแม่แบบของการสร้าง infectious RNA transcript ขึ้นในหลอดทดลองได้โดยมีประสิทธิภาพสูง ก่อนที่จะนำ RNA transcript ที่ได้เข้าสู่เซลล์ต่อไป

ในการนำ full-length cDNA clone ไปใช้ประโยชน์ทางการศึกษาวิจัย full-length cDNA clone ที่ถูกสร้างขึ้นจะต้องเชื้อต่อการเตรียมและการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในรูปแบบที่ต้องการ เช่น มีความคงตัวสูงและสามารถเพิ่มจำนวนได้มากในเซลล์ E. coli, มีลำดับเบสที่ปลาย 3', ปลาย 5' และลำดับเบสภายในที่ช่วยให้ RNA transcript มีความสามารถเป็นจุดเริ่มต้น viral replication ได้ดี (Boyer และ Haenni, 1994) ตลอดจนสามารถถูกคัดลอกได้อย่างคล่องตัว

ตารางที่ 1. Full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกีที่มีผู้รายงานไว้แล้วจนถึงปี ค.ศ. 1998

Serotype (Strain)	Vector	Promoter	Host (Strain)	Reference
4 (814669)	pBR 322	SP6	E. coli (BD1528)	Lai et al., 1991
2 (NGC)	?	T7	E. coli	Kapoor et al., 1995
2 (16681)	pBR 322	T7	E. coli (XL1-Blue, TB-1)	Kinney et al., 1997
2 (NGC)	YAC/pRML1 B	SP6	Yeast (S. cerevisiae YPH857Y) E. coli (STBL-2)	Polo et al., 1997
2 (NGC)	Low copy number plasmid	T7	E. coli	Gualano et al., 1998
2 (16681)	pBluescript II KS	SP6	E. coli (STBL-2, DH5αF')	This report

ในปัจจุบันนี้ full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกีที่หาที่มีผู้รายงานไว้ ยังคงมีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น การใช้ low copy number plasmid vector ทำให้ปริมาณของพลาสมิดในเซลล์ E. coli น้อยและ clone ที่ได้นั้นค่อนข้างเหมาะสำหรับการคัดต่อชิ้นส่วน DNA อย่างคล่องตัว ในบางรายงาน full-length cDNA clone ที่เชื่อมต่อกันได้ในตอนแรกจะคงตัวในเซลล์ยีสต์เท่านั้นและมีปริมาณพลาสมิดน้อยมาก จำเป็นต้องนำมาถ่ายทอดให้แก่ E. coli อีกทอดหนึ่ง (Polo et al., 1997) ในขณะที่ full-length cDNA clone จากบางแหล่งจำเป็นต้องใช้ E. coli ที่หาได้ยาก (Lai et al., 1991) ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการนำเทคนิคการสร้าง cDNA clone ไปใช้ในแหล่งอื่น

เพื่อช่วยลดข้อจำกัดเหล่านี้ ผู้วิจัยจึงพยายามหาวิธีสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ 16681 ใน high copy number plasmid ชนิด pBluescript II KS (Stratagene) จนได้ full-length cDNA clone ที่มีความคงตัวสูงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในเซลล์แบคทีเรียที่หาได้ง่าย 2 ชนิด และสามารถนำ full-length cDNA clone ที่สร้างขึ้นเป็นแม่แบบของการสร้าง RNA transcript ที่เริ่มต้นการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในเซลล์ BHK-21 ได้ภายในเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากนำ RNA transcript เข้าสู่เซลล์ ในระหว่างการดำเนินงานวิจัยนี้ ได้พบอุปสรรคด้านเทคนิคในการวิจัยหลายประการ ซึ่งจะได้บรรยายไว้ในหัวข้อวิธีการทดลอง, ผลการทดลองและบทวิจารณ์เป็นลำดับไป

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเด็งกีในเซลล์ยุง C6/36

เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเด็งกี ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 ในเซลล์ยุง C6/36 ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (ด้วยความอนุเคราะห์ของ คุณหญิงแพทย์หญิง อนันต์ นิกาสักกะณี, University of the Ryukyus ประเทศญี่ปุ่น (ด้วยความอนุเคราะห์ของ Professor Toshihiko Fukunaga), และหน่วยอนุชีววิทยาการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล (ด้วยความอนุเคราะห์ของอาจารย์ นายแพทย์ปรีดา มาลาสิทธิ์)

ทำการเลี้ยงเซลล์ยุง C6/36 ใน culture flask T25 (Costar) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ใน refrigerated incubator (Formal) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด คือ MEM ที่เสริมด้วย 10% fetal bovine serum (GIBCO-BRL หรือ NUNC), 1X non-essential amino acids (NUNC), 1X penicillin, streptomycin, glutamine mixture (GIBCO-BRL) สำหรับเซลล์ยุง C6/36 ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารและ University of the Ryukyus หรือ L15 medium ที่เสริมด้วย 10% fetal bovine serum (GIBCO-BRL) และ 10% tryptose phosphate broth สำหรับเซลล์ยุง C6/36 ที่ได้จากหน่วยอนุชีววิทยาการแพทย์ แบ่งเซลล์เมื่อเซลล์เจริญจนแน่นพอสมควรโดยการถูเบาด้วยปิเปต หรือถูด้วย cell scraper (Costar) แล้วแบ่งเซลล์ในอัตรา 1 : 5 ถึง 1 : 20 ลงสู่ flask ใหม่พร้อมด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ 5 มล. และปิดฝาให้แน่น

เมื่อเซลล์ยุงเจริญเต็มจำนวนจนครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 80 % - 100 % ของพื้นผิวภายใน flask ถือว่าเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อไวรัสเด็งกี ถูบน้ำยาเลี้ยงเซลล์ออกจนเหลือประมาณ 0.5 มล. เติมน้ำ virus suspension ประมาณ 0.25 - 0.5 มล. นำไปผสมด้วย flip-flop shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 1 - 2% fetal bovine serum เพิ่มจนครบ 3 - 5 มล. นำไปเลี้ยงต่อใน refrigerated incubator เมื่อเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เป็นผลจากการติดเชื้อ (cytopathic effect เช่น การกลมโตขึ้นของเซลล์, การหลอมรวมตัวของเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกัน) ถูเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์โดยพยายามปรับ pH ของน้ำยาเลี้ยงเซลล์ให้ค่อนข้างเป็นกรด นำไปเลี้ยงต่อใน refrigerated incubator จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เป็นผลจากการติดเชื้ออย่างมากมายภายใน 3 - 5 วันจึงทำการเก็บเชื้อไวรัส โดยนำ culture supernatant ไปปั่นให้เซลล์ตกแล้วกรองด้วย syringe filter ขนาดรู 0.2 ไมครอน เติมน้ำ fetal bovine serum จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20 - 50 % จึงแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -60 - -80 องศาเซลเซียส เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกีในเซลล์ยุงไม่ทำให้เซลล์ตายโดยเร็ว แต่กลับช่วยให้เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนไปได้อีกช่วงเวลาหนึ่ง ดังนั้น จึงสามารถเก็บเชื้อไวรัสจากเซลล์ยุงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เป็นผลจากการติดเชื้อระดับ 80 - 100 % ต่อเนื่องกันไปได้ถึง 3 - 5 วัน โดยเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ลงใหม่และเก็บเชื้อไวรัสทุก 1 - 2 วันจนกระทั่งเซลล์ส่วนใหญ่หลุดลอกออกจากพื้นผิว

การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ที่เป็นผลจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกีจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่น้ำยาเลี้ยงเซลล์มี pH ค่อนข้างเป็นกรด และเมื่อทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่เมื่อเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เกิดขึ้นใน cell monolayer ในสภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ระดับของเชื้อไวรัสเด็งกีใน culture supernatant จะสูงมาก ซึ่งจะช่วยให้การเตรียม genomic RNA สะดวกขึ้นด้วย

2. การเตรียม Genomic RNA ของเชื้อไวรัสแดงกี

การเตรียม genomic RNA ของเชื้อไวรัสแดงกีแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การปั่นตกตะกอน และการสกัด genomic RNA แล้วทำให้บริสุทธิ์

ในขั้นตอนแรก เชื้อไวรัสใน culture supernatant จะถูกปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (ultracentrifuge, Kontron) จนตกตะกอน โดยนำ virus suspension ที่เก็บแช่แข็งออกมาละลายอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อละลายเกือบหมด นำไปบรรจุในหลอด polyallomer ขนาด 14 มล. แล้วปั่นด้วยหัวปั่นชนิด swingout rotor ที่ความเร็ว 40,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 - 6 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เชื้อไวรัสแดงกีจะตกตะกอนพร้อมกับองค์ประกอบที่หลุดออกจากเซลล์และ aggregate ของ serum protein เห็นเป็นแผ่นบางๆ ที่ก้นหลอด เทส่วนของเหลวที่ไม่ตกตะกอนทิ้งไปจนหมดและนำตะกอนในหลอดไปทำการสกัด genomic RNA ต่อไป ในกรณีที่ต้องการตกตะกอนเชื้อไวรัสแดงกีจำนวนมาก สามารถเติม virus suspension แล้วปั่นซ้ำลงบนตะกอนเดิมได้อีก

การสกัด genomic RNA และทำให้บริสุทธิ์ ใช้ RNeasy kit (QIAGEN) โดยละลายตะกอนด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์หรือ DEPC-treated water เสียก่อน หรือเติม lysis solution (RLT) 0.3 มล. (ที่เติม 2-mercaptoethanol แล้ว) ผสมให้เข้ากันโดยการดูดเป่าด้วยปิเปต 1 มล. หลายๆ ครั้งจนตะกอนละลายหมด อนุภาคเชื้อไวรัสแดงกีจะสลายตัวปล่อย genomic RNA ออกมาในสารละลาย จากนั้นเติม 96% ethanol 0.25 มล. ผสมให้เข้ากันโดยการดูดเป่าเบาๆ แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยบรรจุลงใน RNeasy spin column ปั่น 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อไว้ genomic RNA เกาะอยู่กับ spin column เติม washing solution (RPE) 0.5 มล. เพื่อปั่นล้างจำนวน 2 ครั้ง ในขั้นตอนสุดท้าย ทำการปลดปล่อย genomic RNA ออกจาก spin column โดยเติม DEPC-treated water 0.030 มล. แล้วนำไปปั่นอีกครั้งหนึ่ง เก็บ genomic RNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -80 - -80 องศาเซลเซียส

การสกัด genomic RNA จากตะกอนเชื้อไวรัสแดงกีทำได้โดยวิธี guanidinium isothiocyanate-phenol-chloroform extraction แล้วตกตะกอน genomic RNA ด้วยอัลกอฮอล์ จากนั้นละลาย genomic RNA ด้วย DEPC-treated water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สำหรับไวรัสในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ 80 มล. (ความเข้มข้นของอนุภาคไวรัส ประมาณ 1×10^8 อนุภาค/มล.) จะได้ genomic RNA ที่มีคุณภาพดีเท่า ๆ กัน เพียงแต่ใช้เวลาการเตรียมนานขึ้น

3. ปฏิกริยา Reverse Transcription และ Long Polymerase Chain Reaction

เนื่องจาก genomic RNA ที่บริสุทธิ์มีปริมาณไม่มากพอที่จะวัดด้วย UV-VIS spectrophotometer จึงจำเป็นต้องใช้หลอดหาปริมาณที่ถูกต้องเพียงพอต่อการเป็นแม่แบบของปฏิกริยา reverse transcription และ long PCR โดยไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งปฏิกริยาทั้งสอง เช่นใช้ genomic RNA ปริมาณ 5-10 ไมโครลิตร จากไวรัสประมาณ $20-40 \times 10^8$ อนุภาค ต่อหนึ่งปฏิกริยา เอนไซม์ที่ใช้ได้ผลมาโดยตลอด คือ RNaseH⁻ reverse transcriptase (Superscript II, GIBCO-BRL) โดยอาจทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส, 50 องศาเซลเซียสหรือแม้แต่ 56 องศาเซลเซียส ตามแต่คุณลักษณะของ primer รายละเอียดของปฏิกริยา reverse transcription และ long PCR แสดงไว้ในภาคผนวก

เมื่อทำปฏิกิริยา reverse transcription จนครบ 1 ชั่วโมงแล้วจำเป็นต้องย่อยสลาย genomic RNA แม่แบบด้วยเอนไซม์ RNAseH อีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงกำจัดเอนไซม์ด้วย phenol-chloroform extraction และตกตะกอน cDNA ด้วยอีทิลกอฮอล์ จากนั้นละลาย cDNA ด้วย DEPC-treated water ในปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร/RNA แม่แบบปริมาณ 5-10 ไมโครลิตร และเก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิอย่างน้อย -60 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลผลิต cDNA ที่ได้มาแยกด้วย agarose gel electrophoresis จะเห็นเป็น smear pattern ซึ่งบ่งชี้ว่าประกอบด้วยโมเลกุลขนาดยาวแตกต่างกันไป การวัดปริมาณ cDNA เพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจเลือกปริมาณ cDNA ที่ได้นี้สำหรับใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR จึงไม่เหมาะสมเท่าที่ควรของ ยี่ห้อ ปริมาณ cDNA ในปฏิกิริยา PCR โดยตรง โดยที่การทำ titration จะเป็นการตรวจสอบทั้งปริมาณและคุณภาพไปในตัว

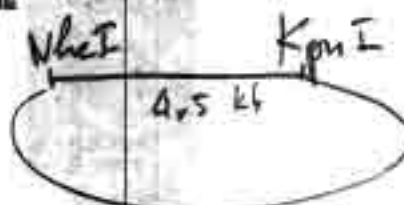
ในการทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction ได้เลือกใช้เอนไซม์ elongase (GIBCO-BRL) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยา long PCR จาก DNA แม่แบบทั่วไปได้ค่อนข้างดี แต่เมื่อนำเอนไซม์ elongase นี้มาใช้เพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อไวรัสแดงก็ภายหลังจากขั้นตอน reverse transcription และ RNAse digestion แล้ว ได้พบว่า ปฏิกิริยา long PCR โดยเอนไซม์ elongase จะถูกหักห้ามหากใช้ cDNA ปริมาณสูงเกินไป ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องทำการ titrate หาปริมาณ cDNA ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา long PCR ภายหลังจากการเตรียม cDNA แต่ละครั้ง

การหักห้ามปฏิกิริยา long PCR ด้วย cDNA ปริมาณสูงนี้เป็นผลให้ reproducibility ของการทำปฏิกิริยา PCR ค่ำสาเหตุและ mechanism ของการหักห้ามยังไม่ทราบชัดเจน แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า การหักห้ามเกิดขึ้นเฉพาะกับปฏิกิริยา long PCR โดยไม่กระทบ short PCR (เช่น การเกิด primer dimer artifact) ปัญหาอีกประการหนึ่งของการใช้เอนไซม์ elongase ที่พบได้บ่อยครั้ง คือ การเกิด non-specific PCR product ได้มาก เมื่อเทียบกับเอนไซม์ Taq DNA polymerase โดยใช้ primer คู่เดียวกัน

ได้สรุป PCR primer ที่สามารถใช้ทำการเพิ่มปริมาณส่วนย่อยต่างๆ ของเชื้อไวรัสแดงที่สายพันธุ์ 16881 ไว้ในตารางที่ 2

4. การสร้าง 5' half-genome และ 3' half-genome

4.1 การสร้าง 5' half-genome



การสร้าง 5' half-genome ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่เบสที่ 1 - 4497 ของสารพันธุกรรม เริ่มต้นจากการคัด long PCR product ที่ครอบคลุมตั้งแต่เบสที่ 1 ถึงเบสที่ 5000 ด้วยเอนไซม์ Nhe I (ตัดที่ปลาย 5' ของ forward primer DV2-S1-SP6) และ Kpn I (ตัดที่ตำแหน่ง 4497 ของ cDNA เพียงครั้งเดียว) จากนั้นนำ PCR fragment ขนาด 4.5 กิโลเบสเข้าเชื่อมต่อกับ pBluescript II KS (Stratagene) ที่ตัดด้วย Xba I และ Kpn I ใน multiple cloning site นำ ligation product เข้าสู่เซลล์ E. coli สายพันธุ์ DH5α F ด้วยวิธี transformation แล้วคัดเลือก transformant ที่การเชื่อมต่ของ cDNA เข้ากับ plasmid vector จำนวน 21 โคโลนี ให้ชื่อเรียกว่า pBK (S1SP6 - 5000) (รูปที่ 1) ตารางที่ 1, ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2. PCR products ที่มี cDNA จากส่วนย่อยต่างๆ ของเชื้อไวรัสเอดส์สายพันธุ์ 16881 (ความยาวของ genome ทั้งหมด 10,723 เบส)

Designation	5'end	3'end	Primer
1.S1-1204	(NheI)SP6-#1	#1204	forward: 5' <u>CTCCTAGC</u> ATTTAGGTGACACTATAGAGTTGT TAGTCTACGTGGACCG (DV2-S1-SP6) backward: 5' GGAGTGTTCAGACGAA
2.S1-1976	(NheI)SP6-#1	#1976	forward: 5' AGAGTTGTAGTCTACGTGGACCGCTCGCTAGC ATTAGGTGACACTAT backward: 5' TGTAAATCAGGCGACCTAAGA
3.134-2504	#134	#2504	forward: 5' TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG backward: 5' GGGGATTCTGGTTGGAACCTATATTGTTCTGTCC
4.134-5000	#134	#4997	forward: 5' TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG backward: 5' CCACTCCTTGTAACAACACCATTACC
5.S1-5000	(NheI)SP6-#1	#4997	forward: 5' <u>CTCCTAGC</u> ATTTAGGTGACACTATAGAGTTGT TAGTCTACGTGGACCG (DV2-S1-SP6) backward: 5' CCACTCCTTGTAACAACACCATTACC
6.4200-8000	#4166 (XbaI)	#7977	forward: 5' <u>CTCTCTAGAG</u> GGATGGTGAGCATTTTAGCCAGTTC backward: 5' CGGGATGAAGAAACGTCACCTCCACTTTGAAGAC
7.7400-10723	#7377 (XbaI)	#10723 (XbaI- KpnI)	forward: 5' GGGTCTAGAAGGACTACATGGGCTCTGTGTGAG backward: 5' <u>CTCGGTACCTCTAGA</u> ACCTGTTGATTCAACAGC ACCATTCCATTTCTGGCGTTC (DV2-R10723-XbaI-KpnI)

Underlined: restriction enzyme recognition site.

cDNA clone ที่ไม่มี 5' half-genome sequence ซึ่งเริ่มต้นที่ SP6 RNA polymerase promoter, cap site, เบสที่ 1 - 4497 โดยเชื่อมต่อกับ Xba I site (โดยที่ Nhe I end จะเชื่อมต่อกับ Xba I end แต่ภายหลังการเชื่อมต่อแล้ว จะไม่ถูกตัดด้วยทั้ง Xba I และ Nhe I) และ Kpn I site ของ plasmid vector

4.2 การสร้าง 3' half-genome



การสร้าง 3' half-genome ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่เบสที่ 4200 - ปลาย 3' (เบสที่ 10723) ของสารพันธุกรรม แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน โดยเริ่มต้นจากการนำ long PCR product ที่ครอบคลุมตั้งแต่เบสที่ 4166 ถึงเบสที่ 8000 มาตัด protruding base ที่ปลาย 3' ด้วยเอนไซม์ Pfu DNA polymerase ให้เกิดเป็น blunt end แล้วตัดปลาย 5' ด้วย Xba I (ถูกเติมเข้าที่ปลาย 5' ของ forward primer DV2-S4200-Xba II) จากนั้นนำ PCR fragment ขนาด 3.7 กิโลเบสที่ได้เข้าเชื่อมต่อกับ pBluescript II KS ที่ตัดด้วย Xba I และ EcoR V ใน multiple cloning site นำ ligation product เข้าสู่เซลล์ E. coli สายพันธุ์ DH5α F ด้วยวิธี transformation แล้วคัดเลือก transformant ที่การเชื่อมต่อของ cDNA เข้ากับ plasmid vector จำนวน 11 โคลนี ให้ชื่อเรียกว่า pBK (4200 - 8000) (รูปที่ 1) (รายการที่ 2, ตารางที่ 3)

ในขั้นตอนที่สอง ทำการตัด long PCR product ที่ครอบคลุมตั้งแต่เบสที่ 7400 ถึงเบสที่ 10723 ด้วยเอนไซม์ Nhe I (ตัดที่ตำแหน่ง 7737 ของ cDNA เพียงครั้งเดียว ทำให้เกิด blunt end) และ Kpn I (ถูกเติมเข้าที่ปลาย 3' ของ backward primer

DV2-R107230-Xba I-Kpn I) จากนั้นนำ PCR fragment ขนาด 2.9 กิโลเบสเข้าเชื่อมต่อกับ pBluescript II KS ที่ตัดด้วย EcoR V และ Kpn I ใน multiple cloning site นำ ligation product เข้าสู่เซลล์ E. coli สายพันธุ์ DH5α F⁻ ด้วยวิธี transformation แล้วคัดเลือก transformant ที่พบการเชื่อมของ cDNA เข้ากับ plasmid vector จำนวน 22 โคลนี ให้อธิบายเรียกว่า pBK (7737-10723) (รูปที่ 1) (รายการที่ 3, ตารางที่ 3)

ในขั้นตอนสุดท้าย ทำการดีมินิพรีพ DNA จาก pBK (4200 - 8000) ทั้ง 11 โคลนี ด้วย Sac II (ใน multiple cloning site ของ plasmid vector outside of Xba I site) และ Stu I (ตัดที่ตำแหน่ง 7874 ของ cDNA เพียงครั้งเดียวและทำให้เกิด blunt end) และนำ DNA fragment ขนาด 3.6 กิโลเบส ซึ่งปราศจาก vector sequence เข้าเชื่อมต่อกับ pBK (7737-10723) ทั้ง 22 โคลนี ที่ถูกตัดด้วย Sac II และ Stu I เช่นเดียวกัน การคัดเลือก DH5α F⁻ และ STBL-2 (GIBCO-RBL) transformant ที่เกิดการเชื่อมของ cDNA sequence ตั้งแต่เบสที่ 4200 - 7874 จาก pBK (4200 - 8000) เข้ากับ pBK (7737-10723) ที่ถูกกำจัด sequence ตั้งแต่เบสที่ 7737 - 7874 ออกไป จะทำให้ได้ 3' half genome ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่เบสที่ 4200 - 10723 อยู่ภายใน Sac II - Kpn I site ของ pBluescript II KS คัดเลือก transformant ที่พบมีการเชื่อมของ cDNA ดังกล่าวเป็นจำนวน 20 โคลนี ให้อธิบายเรียกว่า pBK (4200 - 10723) (รูปที่ 1) (รายการที่ 4, ตารางที่ 3)

cDNA clone ที่ได้จากขั้นตอนที่สามมี 3' half-genome sequence ซึ่งเริ่มตั้งแต่เบสที่ 4168 - 10723 โดยปลาย 5' เชื่อมต่อกับ Xba I site ของ plasmid vector และปลาย 3' มี Xba I site และ Kpn I site (ถูกเติมเข้าที่ปลาย 3' ของ backward primer DV2-R10723-Xba I-Kpn I) ซึ่งเชื่อมต่อกับ Kpn I site ของ plasmid vector

นอกจากการสร้าง 5' half-genome และ 3' half-genome แล้ว ยังได้นำ PCR product ขนาดต่างๆเข้าเชื่อมต่อกับ plasmid vector pBluescript II KS โดยตัด PCR product และ plasmid vector ด้วย restriction enzyme ที่เหมาะสม ดังแสดงไว้ในรายการที่ 5 - 8 ของตารางที่ 3

5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 5' half-genome และ 3' half-genome

ใช้วิธี Sanger dideoxy chain termination ในรูปแบบ cycle sequencing โดยเลือกใช้ทั้ง dye terminator kit หรือ dye primer kit (Applied Biosystem) ตามแต่ตำแหน่งที่ต้องการวิเคราะห์ ให้นำ miniprep plasmid DNA ทั้งในรูปแบบ supercoiled หรือ linearized form ปริมาณ 200 - 400 pg ต่อหนึ่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยา cycle sequencing ในเครื่อง Thermocycler (Perkin Elmer) จากนั้นนำ sequencing product ไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystem)

ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product จะทำให้ PCR product บริสุทธิ์เสียก่อน โดยนำไปแยกจาก PCR primer และ non-specific product ด้วย agarose gel electrophoresis เมื่อตัด PCR product ที่ต้องการออกจาก agarose แล้ว จึงสกัด PCR product ออกโดยใช้ Gel extraction kit (QIAGEN) และนำไปวัดปริมาณก่อนนำไปทำปฏิกิริยาต่อไป ในกรณีที่ miniprep plasmid DNA มีโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนมาก ก็จะตัดด้วย restriction enzyme แล้วทำให้บริสุทธิ์โดย agarose gel electrophoresis และ gel extraction เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 3. รายการ plasmid subclone ที่มี cDNA จากส่วนย่อยต่างๆของสารพันธุกรรมเชื้อ 16681

Designation	5' end	3' end	Vector/hoat	Content
1. S1-5000 (5' half-genome)	(NheI)Sp6- # 1	# 4497 (KpnI)	pBK (XbaI-KpnI), DH5αF ⁺	Sp6 promoter, 5' non-coding region, translation start site, C → 25% of NS3 coding region
2. 4200-8000	(XbaI) # 4166	# 8000	pBK (XbaI- EcoRV), DH5αF ⁺	3' 75% of NS2b, NS3, NS4a, NS4b, 5' region of NS5
3. 7737-10723	(NruI)# 7737	# 10723 (XbaI- KpnI)	pBK (EcoRV, KpnI) DH5αF ⁺	3' 85% of NS5 → 3' end
4. 4200-10723 (3' half-genome)	(SacII) in pBK from # [2]	# 10723 (XbaI- KpnI)	pBK (SacII,KpnI) from # [3], DH5αF ⁺ STBL-2	3' 75% of NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5, 3' end
5. S1-402(NheI)	Sp6- # 1	# 402 (PstI)	pBK (XbaI-PstI), DH5αF ⁺	Sp6 promoter, 5' non-coding region, translation start site, 85% of C coding region
6. S1-1204	(NheI)Sp6- # 1	# 1204 (7)	pBK (XbaI-PstI), DH5αF ⁺	[1] + preM and M coding regions, 30% of E coding region
7. S1-1547	(NheI)Sp6- # 1	# 1547 (HindIII)	pBK (XbaI- HindIII), DH5αF ⁺	[2] + 40% of E coding region
8. 134-2504	# 134	# 2504	pBK (EcoRV+dT), Sure	5' region of C, preM and M, all E, 5' region of NS1
9. 1-10723 (full-length)	(NheI)Sp6- # 1	# 10723 (XbaI- KpnI)	DH5αF ⁺ , STBL-2	Full sequence plus truncated SP6 promoter at 5' end
10. 1-10723 (full-length)	(NheI)Sp6- # 1	# 10723 (XbaI- KpnI)	STBL-2	Full sequence plus SP6 promoter at 5' end
11. 1-10723 (full-length)	(SacI)T7- # 1	# 10723 (XbaI- KpnI)	DH5αF ⁺ , STBL-2	Full sequence plus truncated T7 promoter at 5' end
12. S1-1547 ΔPstI 402	(NheI)Sp6- # 1	# 1547/4497 (HindIII/KpnI)	pBK (NheI/XbaI, KpnI),DH5αF ⁺	Contains C-PrM, PrM-M, M-E cleavage sites, deletion of Pst I at 402

ได้แสดงลำดับเบสและความครอบคลุมของ sequencing primer ที่มีความจำเพาะเพียงพอและสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ผลไว้ในตารางที่ 4 สำหรับ sequencing primer ที่ใช้ไม่ได้ผล มักจะมีลำดับเบสที่ซ้ำๆกันในสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสนี้ เช่น ลำดับ GGTGTGG เป็นต้น

เนื่องจาก 5' half-genome และ 3' half-genome ที่ได้มีจำนวนมาก ในขั้นแรกจึงได้ทำการวิเคราะห์แต่ละ clone ด้วย restriction enzyme digestion เพื่อกำจัด clone ที่มีความผิดปกติทิ้งไปเสียก่อน สำหรับกลุ่ม 5' half-genome ได้เตรียม midiprep plasmid DNA จำนวน 6 clone และอีกหนึ่ง pool ที่ประกอบด้วย 15 clone เมื่อวิเคราะห์ individual clone ด้วย Nco I (ตัด 5 ครั้ง) และ Pst I+EcoRI (ตัด 5 ครั้ง) พบว่า 5' half-genome จำนวน 2 clone มี EcoRI site ที่มากกว่า clone อื่นหนึ่งตำแหน่ง จากนั้นได้เตรียม midiprep DNA สำหรับ 3' half-genome จำนวน 7 cloneและหนึ่ง pool ที่ประกอบด้วย

ตารางที่ 4. ตำแหน่งและลำดับเบสของ sequencing primer

Designation	Sequence coverage	Sequence
R199	1 ← 190	GGAGATCTGGTCTCTGTCCTGGAGCATTCCAAG
D2J134	176 → 620	TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG
S350	392 → 870	GGAAAGAGATTGGAAGGATGC
S838	891 → 1180	GGGTACCATAATGGCAGCAATCCTGG
C1204	711 ← 1131	GGAGTGTTCAGACGAA
C1518	1021 ← 1501	CATCTGCAGCAACACCATCTC
C1763	1321 ← 1731	GAGATGTCTGTGAAGAGTAAGT
C1976	1550 ← 1921	TGTAATCAGGCGACCTAAGA
S1699	1751 → 2040	TCTCAAGAAGGGGCCATGCA
C2260	1712 ← 2237	AAAGGCAGCTCCATAGATTGC
C2496	2015 ← 2466	GGGCTGCAGTTGTTCTGTCCATGTGTGC
C2832	2300 ← 2790	GCCATCAATGAGAAAGTCTGG
S2709	2761 → 3181	GACAGGAGACATCAAAGGAATC
S3096	3144 → 3550	GCCAAAATCACACCCCTC
S3388	3436 → 3910	TACAGAGGTGAGGATGGGTG
S3820	3863 → 4365	ACCATACCAGAGACCATTCTTG
R4200Xba	4241 ← 4497	CTCTCTAGAGGATGGTGAGCATTTAGCCAGTTC
R5000	4489 ← 4962	CCACTCCTTGTAACAACACCATTACC
S4927	4951 → 5550	TTTTCTCCTGGAACGTCAG
S5404	5431 → 6050	TCACAGACCCAGCAAGTATAG
S5844	5881 → 6480	AACAGATGGTGAAGAGCGGGTG
S6412	6437 → 6900	AATCACAGAAATGGGTAGGC
R7137	6841 ← 7101	AAGAGCTGCTGTGAGAGTTATG
R7380	6781 ← 7341	CACACAGAGCCCATGTAGTC
S7400Xba	7405 → 8017	GGGTCTAGAAGGACTACATGGGCTCTGTGTGAG
R8000	7401 ← 7930	CGGGATGAAGAAAACGTCAACTCCACTTTGAAGAC
S7801	7816 → 8400	TCACAOCAGAAGGGAAAGTAG
R8580	7921 ← 8561	CATTGCCATCTGTGTACC
S8440Xba	8465 → 9066	GGTCTAGATCATGGCACTATGACCAAGACCACC
R9328	8761 ← 9300	TGATGTCCATTACTGTGCC
S9178	9203 → 9720	ATGTATGCCGATGACACCGCAG
S9433	9461 → 10080	GGAAGCCCAACTAATCAGAC
S9920	9945 → 10460	CTATTGCTCGGCAGTACC
S10428	10451 → 10723	AAACTATGCAGCCTGTAGCTC

ด้วย 9 clone การวิเคราะห์ 3' half-genome จำนวน 7 clone ด้วย EcoRI (ตัด 4 ครั้ง) และ NcoI (ตัด 5 ครั้ง) พบว่ามี 3' half-genome จำนวน 4 clone ที่มี EcoRI site ที่มากขึ้นกว่า clone อื่น จึงเหลือ 5' half-genome จำนวน 4 clone และ 3' half-genome เพียง 3 clone ที่เหมาะสมที่จะนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส

6. การทดสอบความคงตัวของ Full-length cDNA Clone ในแบคทีเรีย

ทำการทดสอบความคงตัวของ full-length cDNA clone ในแบคทีเรียทั้งสายพันธุ์ DH5 α F' และ STBL-2 โดยนำ transformant อย่างละ 2 โคโลนีมา streak บน LB plate ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 25 ไมโครกรัม/มล. วางไว้ในอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) จนได้โคโลนีขนาดพอสมควร จึงนำไปเก็บที่ตู้เย็นเป็นเวลาตั้งแต่ 5 วัน - 2 สัปดาห์ แล้วเลือกโคโลนีขนาดเหมาะสมจำนวน 20 โคโลนีมาเลี้ยงใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน 25 ไมโครกรัม/มล. ในปริมาตร 2 มล. โดยทำการเขย่า 220 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 - 3 วันจนกระทั่งเห็นขุ่นพอสมควร จึงนำแบคทีเรียไปเตรียม miniprep plasmid DNA และวิเคราะห์ขนาดของ plasmid DNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ Xba I และ Hind III โคโลนีที่พบ Xba I - Hind III fragment ขนาด 7.5, 4.3 และ 1.7 กิโลเบส นับเป็นโคโลนีที่ยังคงมี full-length cDNA insert อยู่ภายในเซลล์

เพื่อให้ได้ความมั่นใจว่า full-length cDNA clone มีความคงตัวในแบคทีเรียสูงจริง โดยเฉพาะเมื่อได้เลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องกันไป จึงได้ทำการทดสอบความคงตัวเป็นจำนวน 3 - 4 รอบ โดยใช้แบคทีเรียจาก transformation plate ที่พบมี full-length cDNA insert อย่างละ 2 หลอดมา streak LB plate สำหรับนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นและทำการทดสอบในรอบที่สอง จากนั้นก็ใช้แบคทีเรียจากรอบที่สองใช้ในรอบที่สามเป็นลำดับไป

7. ปฏิกริยา In vitro Transcription

ทำปฏิกริยา in vitro transcription เพื่อสร้าง RNA transcript สำหรับนำไปสร้างอนุภาคไวรัสในเซลล์ โดยใช้พลาสมิดที่ถูกตัดที่ปลาย 3' ของสารพันธุกรรมให้เป็นรูปแบบ linearized molecule เพื่อไม่ให้ RNA transcript ที่ได้มีเบสเกินกว่าที่ปรากฏอยู่ในสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสและเป็นการป้องกันการสร้าง concatameric RNA ด้วย และเลือกใช้เอนไซม์ที่ให้ผลเป็น blunt end หรือ 5' protruding end

นำ full-length cDNA clone มาตัดที่ปลาย 3' ของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยเอนไซม์ Xba I โดยที่ได้ออกแบบ backward primer สำหรับการเพิ่มปริมาณด้าน 3' ของสารพันธุกรรม (DV2-R10723-Xba I-Kpn II) ให้มี Xba I site อยู่ต่อเนื่องกับปลาย 3' ของสารพันธุกรรมพอดี ในกรณีนี้ full-length cDNA clone มี full SP6 promoter หรือ truncated SP6 promoter ที่ปลาย 5' ของโมเลกุล เมื่อตัดพลาสมิดด้วย Xba I แล้วสามารถนำไปทำปฏิกริยา in vitro transcription ได้เลย แต่ในกรณีที่ full-length cDNA clone มีการเติม T7 promoter ที่ปลาย 5' โมเลกุล จะทำให้มี T7 promoter จำนวนสองชุดซ้อนกันอยู่ในทิศทางเดียวกัน จึงจำเป็นต้องตัดแยก T7 promoter ทั้งสองด้วยเอนไซม์ EcoICR I (ตัดที่ Sac I site ใน multiple cloning site ของ pBluescript II KS ระหว่าง T7 promoter ทั้งสอง แต่ก่อให้เกิด blunt end) อีกชุดหนึ่ง แล้วจึงแยก DNA fragment ที่มีสารพันธุกรรมของเชื้อไปทำใหับริสุทธิ์และนำไปทำปฏิกริยา in vitro transcription ต่อไป

เนื่องจาก linearized full-length cDNA clone มักจะมี RNase ปนเปื้อนอยู่ จึงได้พยายามกำจัด RNase ก่อนโดยย่อย ด้วย 100 ไมโครกรัม/ml proteinase K ในสภาวะที่มี 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM CaCl_2 , 0.5% SDS เป็นเวลา 30 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น กำจัด proteinase K โดย phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction และตกตะกอน DNA ด้วย อัลกอฮอล์ แล้วนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer

ใช้ linearized full-length cDNA clone ปริมาณ 0.5 - 1 ไมโครกรัมในหนึ่งปฏิกิริยา ในกรณีที่จะสร้าง RNA จาก SP6 promoter (pBK S1SP6-10723 หรือ pBK S1SP6-2-10723) ได้ทดลองใช้ SP6 RNA polymerase จาก GIBCO-BRL หรือ Promega หรือใช้ mixture ของ SP6 RNA polymerase และ pyrophosphatase (Ribomax kit, Promega) ได้ผลไม่แตกต่างกัน สภาวะที่ใช้ ได้ผลค่อนข้างดี คือ 80 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 32 mM MgCl_2 , 2 mM spermidine, 40 mM Dithiothreitol, 5mM each dNTP, และ 20-40 หน่วย SP6 RNA polymerase (หรือ 2 ไมโครลิตร SP6 RNA polymerase และ pyrophosphatase mixture) ใน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ในกรณีที่จะสร้าง RNA จาก T7 promoter (pBK S1T7-10723) ได้ทดลองใช้ T7 RNA polymerase จาก Promega หรือ ใช้ mixture ของ T7 RNA polymerase และ pyrophosphatase (Ribomax kit, Promega) ได้ผลไม่แตกต่างกัน สภาวะที่ใช้ได้ผลดี คือ 80 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 24 mM MgCl_2 , 2 mM spermidine, 40 mM Dithiothreitol, 7.5mM each dNTP, และ 20 หน่วย T7 RNA polymerase (หรือ 2 ไมโครลิตร T7 RNA polymerase และ pyrophosphatase mixture) ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ในกรณีที่จะสร้าง RNA ให้มี $m^7\text{G}$ cap ที่ปลาย 5' จำเป็นต้องเติม $m^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{G}$ cap structure analog (New England Biolab) สำหรับ T7 RNA polymerase reaction (pBK S1T7-10723) โดยที่ได้ออกแบบให้มีการเริ่มสร้าง RNA ที่เบส G แทน ของสารพันธุกรรม ส่วนการใช้ SP6 RNA polymerase (pBK S1SP6-10723 หรือ pBK S1SP6-2-10723) เติม $m^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{A}$ cap analog (New England Biolab) โดยปรับลดความเข้มข้นของ GTP (หรือ ATP ตามลำดับ) ลงให้เป็น 1/2 - 1/4 ของ cap analog และให้ความเข้มข้นรวมของ cap analog และ GTP (หรือ ATP) เป็น 7.5mM (หรือ 5mM) ตามเดิม

วิเคราะห์ขนาดของ in vitro transcript ที่ได้ โดยนำ 2 - 4 ไมโครลิตรผสมกับ 4 - 8 ไมโครลิตร RNA sample loading buffer (Sigma) นำไปแช่ที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำแช่น้ำแข็งและทำการแยกขนาดโดย agarose gel electrophoresis โดยเติม 37% Formaldehyde ใน 0.7% agarose gel และ MOPS-EDTA-sodium acetate running buffer (Sigma) ในอัตราส่วน 10 มล/500 มล ของ running buffer หลังจากการแยกแล้ว ย้อมด้วย ethidium bromide (10 มก/มล) 5 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำ 3 - 4 ชั่วโมง Size marker ที่ใช้ในขณะเริ่มแรกมีความยาวสูงสุดเพียง 6.5 กิโลเบสซึ่งสั้นกว่า genome-length transcript มาก ในระยะต่อมาได้ใช้ in vitro transcript จากการสร้าง RNA transcript จาก full-length cDNA template ที่มี SP6 promoter ที่ปลาย 5' ของสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสด้วย T7 RNA polymerase ซึ่งจะได้ RNA ที่ยาวกว่า genome-length transcript จาก SP6 promoter ถึง 60 เบส

8. การนำ In vitro Transcription Product เข้าสู่เซลล์โดย Transfection

ได้ทดลองเปรียบเทียบการนำ genomic RNA ของเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ 16681 เข้าสู่เซลล์ BHK-21 โดยวิธี DEAE-dextran-mediated transfection และ lipofectin-mediated transfection พบว่า การใช้ lipofectin (GIBCO-BRL) ได้ผลดี, มี reproducibility สูงและสะดวกกว่าจึงได้เลือกใช้ lipofectin ในการศึกษาต่อไป

นำเซลล์ BHK $3 - 5 \times 10^5$ เซลล์เพาะเลี้ยงใน 6-well cell culture plate (Costar) หรือ 35 x 10 มม cell culture dish (Nunc) ด้วย MEM medium (GIBCO-BRL) ที่เสริมด้วย 10 % fetal bovine serum (GIBCO-BRL), 1x penicillin-streptomycin-glutamine (GIBCO-BRL), 10 mM HEPES (pH 7.55), 0.15% sodium bicarbonate ใน 5% CO₂ incubator จนเจริญเกือบเต็มพื้นผิว ล้างเซลล์ด้วย 2 มล MEM 2 ครั้งเพื่อไม่ให้มี serum protein หลงเหลืออยู่ จากนั้นเตรียม lipofectin-RNA mixture โดยเติม lipofectin 5 ไมโครลิตรลงใน MEM 1 มล (ไม่มี serum) ผสมให้เข้ากันแล้วเติม genomic RNA หรือ in vitro transcript และผสมให้เข้ากัน นำ mixture ของ MEM-lipofectin-RNA เติมนลงในเซลล์ BHK และนำไป incubate ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้าง MEM-lipofectin-RNA mixture ออกจากหมด และเติม MEM medium ที่เสริมด้วย 2 % fetal bovine serum, 1x penicillin-streptomycin-glutamine (GIBCO-BRL), 10 mM HEPES (pH 7.55), 0.15% sodium bicarbonate ลงไปแทนที่ นำไป incubate ใน CO₂ incubator ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในกรณีที่ต้องการวัดขนาดของ infected focus ให้ MEM medium ที่เสริมด้วย 2 % fetal bovine serum และ 1% gum tragacanth (Sigma) เติมนลงไปแทน Gum tragacanth ทำให้ mediumหนืดกว่าปกติ ส่งผลให้ไม่มีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสอย่างกว้างขวาง จึงเกิดเฉพาะกลุ่มของเซลล์ที่ติดเชือรอบๆเซลล์ที่ติดเชื้อ (หรือได้รับ genomic RNA) ในครั้งแรกเท่านั้น

เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจหาการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกีในเซลล์ BHK โดย fix เซลล์ด้วย 3.7% formaldehyde ใน phosphate buffered saline (PBS) เป็นเวลา 10 นาที, 0.1 % Triton-X ใน PBS เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วย PBS จนครบห้าครั้ง จากนั้นย้อม dengue antigen ในเซลล์โดยวิธี peroxidase-antiperoxidase (Okuno et al., 1977) ด้วยการใช้ monoclonal antibody 4G2 (anti-flavivirus E protein), rabbit anti-mouse Ig (Dakopatt), sheep anti-rabbit Ig (Cappel) และ rabbit peroxidase-antiperoxidase complex (Cappel) ตามลำดับ เติม H₂O₂ และ diaminobenzidine mixture ตรวจดู infected cell (หรือ infected focus) ด้วยกล้องจุลทรรศน์

9. การสร้าง PrM-M Cleavage Site Mutant โดย Site Directed Mutagenesis

ทำการกลายพันธุ์ของ structural protein cleavage site ที่บริเวณ prM-M protein cleavage site ตามขั้นตอนต่อไปนี้

9.1. สร้าง plasmid subclone ของ 5' half-genome โดยได้นำ 5' half-genome clone ที่ 18 ตัดด้วย Hind III (ตัดที่ตำแหน่ง 1547, 3235) และ Kpn I (ตัดที่ตำแหน่ง 4497), ย่อย overhang ด้วย mung bean nuclease และเชื่อมต่อปลายทั้งสองเข้าด้วยกันแบบ blunt-end ligation ทำให้ plasmid subclone ที่ได้ครอบคลุมตั้งแต่เบสที่ 1 ถึง 1547 และภายในลำดับเหล่านี้มีตำแหน่งที่ Pst I ตัดได้ 3 ตำแหน่ง คือ 212, 402 และ 1535 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ Pst I ตัดได้ทั้งหมดภายในสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 16681 (รายการที่ 7, ตารางที่ 3)

9.2 ทำการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่ Pst I 402 โดยการสังเคราะห์ oligonucleotide สองเส้นที่ overlap ที่ตำแหน่งที่ Pst I 402 แต่เปลี่ยนลำดับเบสไป 1 ตำแหน่ง โดยไม่เปลี่ยนกรดอะมิโน แต่กลับทำให้เอนไซม์ Nae I ตัดได้ จากนั้นทำ site directed mutagenesis โดยทำ PCR ด้วย Pfu DNA polymerase จำนวน 30 รอบ, ดัดพลาสมิคเดิมด้วย Dpn I แล้วนำ PCR product ซึ่งจะไม่ถูกตัดด้วย Dpn I เข้าสู่เซลล์โดย transformation ตามปกติ เมื่อตรวจหา clone ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงด้วยการตัดด้วย Nae I และวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า plasmid subclone # 30.1 เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่ง 402 Pst I → Nae I ตามต้องการ (รายการที่ 12, ตารางที่ 3) การตัด subclone # 30.1 ด้วย Pst I จะทำให้ได้ Pst I fragment ขนาด 1.3 กิโลเบส ซึ่งจะมีบริเวณที่กำหนด structural protein cleavage site ทั้งหมด คือ C-prM site, prM-M site และ M-E site

9.3 ทำการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบริเวณที่กำหนด prM-M cleavage site ใน subclone # 30.1 โดยได้เปลี่ยนกรดอะมิโน 7 ตำแหน่งหน้าคือ cleavage site และ 1 ตำแหน่งหลังคือ cleavage site ให้เป็น glycine ด้วยวิธี site directed mutagenesis เช่นเดียวกับการเปลี่ยน Pst I site ที่ตำแหน่ง 402 ได้แสดงลำดับเบสของ oligonucleotide primer และวิธี screen หา mutation ไว้ในตารางที่ 5 ที่ช่วยให้สามารถฉีกรหัส mutant ตามที่ต้องการแล้วทั้ง 8 ตำแหน่ง

9.4 นำ Pst I fragment ขนาด 1.3 กิโลเบส (ครอบคลุมตำแหน่งเบส 212-1535) จาก subclone 30.1 ต่างๆ ที่ได้เปลี่ยนแปลงลำดับเบสตามต้องการสอดใส่เข้าไปใน 5' half-genome โดยตัด 5' half-genome ด้วย Pst I และกำจัดกลุ่ม phosphate ที่ปลายด้วย alkaline phosphatase เสียก่อน จากนั้นตรวจสอบ orientation ของ Pst I fragment ขนาด 1.3 กิโลเบส ใน 5' half-genome โดยการตัดด้วย Sph I (ตัดที่ตำแหน่ง 1384) และ Sac I (ตัดที่ multiple cloning site ที่ปลาย 5' ของ genome) เมื่อได้ clone ที่มี orientation ที่ถูกต้องก็นำไปเชื่อมต่อเข้ากับ 3' half-genome เช่นเดียวกับการสร้าง full-length clone อื่นๆ

ตารางที่ 5. รายการ plasmid subclone และ full-length cDNA clone ที่ใช้ในการหาพื้นที่ส่วนที่กำหนด PAM cleavage site ตรงที่ 18881

amino acid position	196					201				205				209
wild type aa sequence	T	M	G	E	H	R	R	E	K	R	S	V	A	L
wild type nt sequence	ACC	ATG	GGA	GAA	CAT	AGA	AGA	GAA	AAA	AGA	TCA	GTG	GCA	CTC
cleavage position	-10					-5				-1	+1			+4

Designation	Primer pair		Screening/selection
1. 199 E→G	3' CTGGCACATGGTGGTACCCCTCCGGTATC 5'	5' GGGAGGCCATAGAGAGAAAAAGATC 3'	HaeIII digestion of purified PstI fragment
2. 200 H→G	3' GCACATGGTGGTACCCCTCTCCGGCTTCT 5'	5' GAGAGGCCGGAAGAGAAAAAGATCAGTG 3'	HaeIII digestion of purified PstI fragment, oligonucleotide hybridization
3. 201 R→G	3' CATGGTGGTACCCCTCTGTGACTTCT 5'	5' AACATGGAGAGAAAAAGATCAGTG 3'	Sequence analysis
4. 202 R→G	3' ACATGGTGGTACCCCTCTGTGGCGCTCTTT 5'	5' AACACCGCGGGAAGAGAAAAAGATCAGTGGCA 3'	SacII digestion
5. 203 E→G	3' GTACCCCTCTGTATCTTCTCCCTTCTC 5'	5' AAGAGGGAGAGATCAGTGGCACTCGTTCC 3'	Sequence analysis
6. 204 K→G	3' ACCCTCTGTATCTTCTCTCCGGCTA 3'	5' GAGAGGCCGATCAGTGGCACTCGTTCCA 3'	HaeIII digestion
7. 205 R→G	3' CTCCTGTATCTTCTCTTTCTAGGCACC 3'	5' AAAAGGATCCGTGGCACTCGTTCCACATG 3'	BamHI digestion
8. 206 S→G	3' TTGTATCTTCTCTTTTCTCTCACC 5'	5' AAAGAGGAGTGGCACTCGTTCCACATG 3'	Sequence analysis

ผลการทดลอง

1. การสร้าง Full-length cDNA Clone ของเชื้อไวรัสแดงกีสายพันธุ์ 16681

ได้ใช้วิธี reverse transcription สร้าง cDNA ขนาดยาวซึ่งครอบคลุมตลอดโมเลกุลสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสแดงกี สายพันธุ์ 16681 เพื่อทดลองนำไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี long PCR แล้วนำเข้าสู่เชื่อมต่อกับ high copy number plasmid vector ชนิด pBluescript II KS ให้เกิดเป็น full-length cDNA clone ในคราวเดียว แต่ได้พบว่า oligonucleotide primer ที่ออกแบบให้จับที่ปลาย 3' ของสารพันธุกรรมสามารถเข้าจับบริเวณภายในสารพันธุกรรมได้ด้วย ทำให้ cDNA ที่ได้ไม่สามารถเป็นแม่แบบของการทำ PCR สำหรับสารพันธุกรรมทั้งโมเลกุลในขั้นตอนเดียวได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องแบ่งการเพิ่มปริมาณและการสร้าง cDNA clone ออกเป็น 3 ช่วงด้วยกัน คือ ช่วงเบสที่ 1 - 4497 (5' half-genome), ช่วงเบสที่ 4186 - 8000 และช่วงเบสที่ 7377 - 10723 (ปลาย 3') เมื่อนำสารพันธุกรรมในช่วงที่ 2 และ 3 มารวมเข้าด้วยกันให้เป็น 3' half-genome แล้ว จึงสามารถนำ 3' half-genome เข้าเชื่อมต่อเข้ากับ 5' half-genome ให้ได้ full-length cDNA clone ในขั้นตอนสุดท้าย (รูปที่ 1)

เนื่องจากขั้นตอน reverse transcription, long PCR และ cloning in E. coli ล้วนแล้วแต่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพิ่มเติมได้ทั้งสิ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์ลำดับเบสใน 5' half-genome และ 3' half-genome เสียก่อน โดยทำการวิเคราะห์ชนิดละ 2 clone ไปพร้อมกัน (5' half-genome pBK S1SP6-5000 clone ที่ 14 และ 18 และ 3' half-genome pBK 4200-10723 clone ที่ 38 และ 65) แล้วเปรียบเทียบลำดับเบสที่หาได้กับลำดับเบสของสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 16681 (Blok et al., 1992) และ full-length cDNA clone ของสายพันธุ์ 16681 ที่กลุ่ม CDC (Kinney et al., 1997) รายงานไว้แล้ว ในกรณี ที่พบความแตกต่างจาก reported sequence โดยเฉพาะลำดับเบสที่รายงานจากกลุ่ม CDC หรือมีความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างสอง clone และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ก็ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของ pooled PCR product เปรียบเทียบไปด้วยเพื่อให้มั่นใจว่าความแตกต่างที่ตรวจพบใน 5' half-genome หรือ 3' half-genome นั้นๆ พบอยู่ใน PCR product ซึ่งจะเป็นการบ่งชี้อีกต่อหนึ่งว่า ความแตกต่างนั้นปรากฏอยู่ตั้งแต่แรกในสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 16681 ที่นำมาศึกษา

ผลการวิเคราะห์แสดงว่า ลำดับเบสส่วนใหญ่ของ 5' half-genome clone ที่ 14 และ 18 ตั้งแต่เบสที่ 23 - 4497 (เบสที่ 1-22 มาจาก forward PCR primer) และ 3' half-genome clone ที่ 38 และ 65 ตั้งแต่เบสที่ 4497- 10680 (เบสที่ 10681-10723 มาจาก backward PCR primer) มีความคล้ายคลึงกันมากและคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ full-length cDNA clone ของสายพันธุ์ 16681 ที่กลุ่ม CDC ได้รายงานไว้มากกว่าลำดับเบสของเชื้อไวรัสจากกลุ่มของ Blok และคณะ (ลำดับเบสของสายพันธุ์ 16681 ที่รายงานโดยสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันถึง 85 ตำแหน่ง) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการนำเชื้อไวรัสไปเพาะเลี้ยงในสภาวะและจำนวนครั้งที่ไม่เท่าเทียมกัน ตลอดจนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่ไม่ตรงกัน Blok และคณะ วิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยตรง ในขณะที่ Kinney และคณะวิเคราะห์ cDNA clone) ในระหว่าง 5' half-genome clone ที่ 18 และ 14 ด้วยกัน clone ที่ 18 แตกต่างจาก CDC sequence น้อยกว่า clone ที่ 14 ในทำนองเดียวกัน 3' half-genome clone ที่ 38 ใกล้เคียงกับ CDC sequence มากกว่า clone 65 จึงได้เลือกใช้ clone ที่ 18 และ 38 ในการศึกษาต่อไป

ความแตกต่างของลำดับเบสระหว่าง 5' half-genome clone ที่ 18 กับลำดับเบสของ full-length cDNA clone ของสายพันธุ์ 16681 ที่กลุ่ม CDC รายงาน ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6 พบว่า 5' half-genome clone ที่ 18 แตกต่างจาก CDC

ความแตกต่างที่ทำให้เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน คือตำแหน่ง A2943 → C พบใน clone ที่สอง (#14) และใน pooled PCR product ด้วย ในขณะที่ความแตกต่าง G4340 → A พบเฉพาะใน clone ที่ 18 ซึ่งบ่งชี้ว่า ความแตกต่าง G4340 → A ใน clone ที่ 18 น่าจะเกิดขึ้นในระหว่าง cloning process แต่ความแตกต่างที่ตำแหน่ง A2943 → C และ C4308 → T น่าจะเป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 16681 ที่นำมาจาก AFRIMS เพื่อเพาะเลี้ยงที่เชียงใหม่

เนื่องจากความแตกต่างที่ตำแหน่ง G4340 → A จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนใน Ser 1415 → Asn ของโปรตีน NS2B จึงได้ทำการแก้ไข โดยตัด 5' half-genome clone ที่ 14 ด้วย EcoR V (ที่ตำแหน่งเบสที่ 4331) และ Kpn I (ที่ตำแหน่งเบสที่ 4497) และนำ EcoRV-KpnI fragment ขนาด 166 เบสจาก clone ที่ 14 เข้าเชื่อมต่อกับ 5' half-genome clone ที่ 18 ที่ได้ตัดด้วย EcoRV และ Kpn I และกำจัด EcoRV-KpnI fragment ขนาด 166 เบส ที่มีอยู่เดิมออกไปแล้ว จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 5' half-genome clone ใหม่ที่ได้ (#59) พบว่าตำแหน่งที่ 4340 ปรากฏเป็นเบส G ตามที่ต้องการ

ความแตกต่างของลำดับเบสระหว่าง 3' half-genome clone ที่ 38 กับลำดับเบสของ full-length cDNA clone ของสายพันธุ์ 16681 จากกลุ่ม CDC ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 เช่นเดียวกัน พบว่า 3' half-genome clone ที่ 38 แตกต่างจาก CDC sequence เพียง 5 ตำแหน่ง คือ A4530 → G (ns3 gene), G8155 → A (ns5 gene), C8571 → T (ns5 gene), A10331 → G (3' non-translated region, ntr) และ A10561 → C (3' ntr) โดยที่ความแตกต่างที่ตำแหน่งที่เปลี่ยนกรดอะมิโน G8155 → A และที่พบใน 3' ntr A10331 → G พบใน clone ที่สอง (# 65) และใน pooled PCR product ด้วย ในขณะที่ความแตกต่าง A10561 → C พบเฉพาะใน clone ที่ 38 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 3' ntr ใน 3' half-genome clone ขึ้นๆเพิ่มเติม พบว่า 3' half-genome clone ที่ 65 และ clone อื่นๆ ที่เหลือตลอดจน pooled PCR product แตกต่างจาก clone ที่ 38 ที่ 2 ตำแหน่ง โดยสามารถแบ่งเป็น 2 รูปแบบ คือ

รูปแบบที่ 1. พบใน clone ที่ 38 และ 82

ตำแหน่ง	CDC	AFRIMS-CMU
10403	T	T
10561	A	C

รูปแบบที่ 2. พบใน clone ที่ 65, 20, 74, pooled 3' half-genome และ pooled PCR product

ตำแหน่ง	CDC	AFRIMS-CMU
10403	T	A
10561	A	A

ตารางที่ 6. ความแตกต่างของลำดับเบสระหว่าง cDNA clone ต่างๆ ของเชื้อสายพันธุ์ 16681

Position	CDC	AFRIMS-CMU	Note
<u>5' Half-genome clone # 18*</u>			
2943	A	C	NS1, Lys 949 → Asn, (present in 2 clones and pooled PCR product)
4308	C	T	NS2B, Val 1404, unchanged, (present in 2 clones)
4340	G	A	NS2B, Ser 1415 → Asn, (present in only 1 clone), corrected in #59
<u>3' Half-genome clone # 38</u>			
4530	A	G	NS3, Val 1478, unchanged, (in 2 clones)
8155	G	A	NS5, Ala 2687 → Thr, (in 2 clones and pooled PCR product)
8571	C	T	NS5, Val 2825, unchanged, (in 2 clones)
10331	A	G	3' ntr, (in 6/6 clones and PCR product)
10561	A	C	3' ntr, (in 2/6 clones, but not in PCR product), corrected in #38.2/65

*. ในระยะต่อมา ได้พบความแตกต่าง G498→A (PrM, Gly 134, unchanged) ใน subclone จำนวนมากที่มีต้นตอมาจาก #18

เพื่อให้ได้ 3' half-genome ที่คล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสที่มีอยู่ให้มากที่สุด จึงได้ทำการแก้ไขส่วน 3' ntr ของ 3' half-genome clone ที่ 38 ให้เป็นรูปแบบที่ 2 โดยได้ตัด 3' half-genome clone ที่ 65 ด้วย Hpa I (ที่ตำแหน่งเบสที่ 10127) และ Xba I (ตัดที่ Xba I site ใน backward primer 10723XX) และนำ 0.6 kb HpaI-XbaI fragment จาก clone ที่ 65 เข้าเชื่อมต่อกับ 5' half-genome clone ที่ 38 ที่ได้กำจัด XbaI site ที่มีอยู่ใน forward primer S4200XbaI ออกไปและตามด้วยการตัดด้วย HpaI และ XbaI แล้วกำจัด HpaI-XbaI fragment ที่มีอยู่เดิมออกไปแล้ว การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 5' half-genome clone ใหม่ที่ได้ #38.1 พบว่า ตำแหน่งที่ 10561 ปรากฏเป็นเบส A ตามต้องการ

เมื่อได้แก้ไข 5' half-genome และ 3' half-genome ให้มีลำดับเบสที่คาดว่าจะตรงกับเชื้อไวรัส สายพันธุ์ 16681 ที่ใช้มากที่สุดแล้ว ก็ได้สร้าง full-length cDNA clone โดยเชื่อมต่อกับ 5' half-genome และ 3' half-genome ที่ได้แก้ไขเบสที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง cloning เท่าที่เหมาะสมแล้ว โดยในครั้งแรกได้เชื่อมต่อกับ 5' half-genome clone ที่ 59 เข้ากับ 3' half-genome clone ที่ 38 ซึ่งมีความแตกต่างของลำดับเบสที่ 3' ntr รูปแบบที่ 1 ในช่วงเวลาต่อมาได้เชื่อมต่อกับ 5' half-genome clone เข้ากับ 3' half-genome clone ที่ 38.2/65 ซึ่งมีความแตกต่างของลำดับเบสที่ 3' ntr รูปแบบที่ 2) อีก 2 ครั้ง

การเชื่อมต่อ 5' half-genome และ 3' half-genome ทำโดยตัด 3' half-genome clone ที่ 38 (หรือ 38.2/65) ด้วย Kpn I แล้วนำ Kpn I fragment ขนาด 6.2 กิโลเบส ซึ่งครอบคลุมเบสที่ 4497 - ปลาย 3' มาเชื่อมต่อเข้ากับ 5' half-genome clone ที่ 59 ที่ได้ตัดด้วย Kpn I ที่ตำแหน่ง 4497 และย่อยด้วย alkaline phosphatase เพื่อลดโอกาสการเกิด self-ligation เรียบร้อยแล้ว จากนั้นทำ transformation เข้าสู่เซลล์ E. coli จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ DH5αF และ STBL-2 โดยแช่เซลล์ E. coli ภายหลังจากขั้นตอน heat shock ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที หลังจาก spread เซลล์ลงบน LB plate ซึ่งมีแอมพิซิลลิน 25 ไมโครกรัม/มิลลิ นำ plate วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาดังกล่าว 2 - 3 วัน ปรากฏโคโลนีที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลลินตั้งแต่ใหญ่จนถึงเล็กและเล็กมากเป็นจำนวนมาก

เพื่อทดสอบว่าโคโลนีชนิดใดที่มี full-length cDNA clone อยู่ จึงได้นำโคโลนีขนาดใหญ่และเล็กเล็กมากไปเลี้ยงต่อใน LB broth ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 วันแล้วเตรียม miniprep plasmid DNA และวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดใน transformant โดยการตัดด้วย Xba I (ตัดที่ Xba I site ที่ backward primer หลังต่อตำแหน่ง 10723 ใน 3' half-genome) และ Hind III (ตัดที่ตำแหน่ง 1547 และ 3235 ในส่วน 5' half-genome) และวัดขนาดของ DNA fragment พบว่า เฉพาะโคโลนีขนาดเล็กเท่านั้นที่จะมีการเชื่อมต่อของ 3'-half genome เข้ากับ 5'-half genome ให้เป็น full-length cDNA clone (ตารางที่ 7) โดยโคโลนีเล็กส่วนใหญ่มีเพียงหนึ่ง 3'-half genome insert และจำนวนน้อยที่มีสอง insert ส่วนโคโลนีขนาดใหญ่ ไม่พบ 3'-half genome insert หรือไม่พบมีพลาสมิด

การวิเคราะห์ orientation ของ 3' half-genome ใน full-length cDNA clone ในเซลล์ STBL-2 และ DH5αF พบว่า โคโลนีขนาดเล็กของสายพันธุ์ STBL-2 ประมาณครึ่งหนึ่ง มี 3' half-genome ใน orientation ที่ถูกต้อง (โดยพบ Xba I-Hind III fragment ขนาด 7.5, 4.3 และ 1.7 กิโลเบส) ในขณะที่ โคโลนี DH5αF ขนาดเล็กจำนวนน้อยมากที่จะมี 3' half-genome ใน orientation ที่ไม่เหมาะสม (พบ Xba I-Hind III fragment ขนาด 10.5, 1.7 และ 1.3 กิโลเบส)

การที่ full-length cDNA clone ซึ่งสร้างขึ้นโดยใช้ pBluescript II KS เป็น cloning vector มีความคงตัวสูงในสายพันธุ์ STBL-2 และ DH5αF อาจเป็นความจำเพาะของพลาสมิดและเซลล์ชนิดนี้ (เพื่อทดสอบว่า full-length clone ใน cloning vector อื่นจะสามารถคงตัวอยู่ได้เช่นเดียวกัน จึงได้ตัด full-length insert ออกจาก pBluescript II KS ด้วย Sac I (ตัดใน multiple cloning site ของ pBluescript II KS ด้านปลาย 5' ของ dengue genome) และ Xba I (ตัดที่ Xba I site ที่ backward primer หลังต่อตำแหน่ง 10723 ในปลาย 3' ของ genome) แล้วนำเข้าเชื่อมต่อกับ pGem 3Z ที่ตัดด้วยเอนไซม์คู่เดียวกันและนำเข้าสู่เซลล์ STBL-2 ผลการวิเคราะห์โคโลนีที่ได้ภายหลัง transformation แสดงว่า โคโลนีขนาดเล็กส่วนใหญ่มี full-length cDNA ทั้งสิ้น ในขณะที่ โคโลนีขนาดใหญ่จะไม่พบมีพลาสมิดขนาดยาวเต็มที่เลย (การทดลองที่ 4, ตารางที่ 7) ดังนั้น full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ 16681 จึงมีความคงตัวทั้งใน vector ชนิด pBluescript II KS และ pGem3Z ซึ่งเป็น high copy number plasmid ทั้งคู่

2. ความคงตัวของ full-length cDNA clone ในแบคทีเรีย

ได้ศึกษาความคงตัวของ full-length cDNA clone ที่เลี้ยงต่อเนื่องกันไปจำนวน 3 - 4 รอบ พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่มี full-length cDNA clone ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 25 ไมโครกรัม/มิลลิ และแช่หลอดทดลองแบคทีเรียบรรจุที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส full-length cDNA clone มีความคงตัวสูงในสายพันธุ์ STBL-2 มากกว่า DH5αF (ตารางที่ 7) โดยที่สัดส่วนของโคโลนีที่มี full-length clone ในสายพันธุ์ STBL-2 สูงถึง 100 % หรือเกือบ 100 % ตลอดช่วงเวลาการศึกษา ใน

ขณะที่ ค่ายัดส่วนโคโลนีที่มี full-length clone ในสายพันธุ์ DH5 α F' ลดลงในช่วงหลังๆของการศึกษา และที่มีค่าต่ำมากในรอบที่ 4 ของการทดสอบครั้งที่สาม

เป็นที่น่าสังเกตว่า แบคทีเรียในหลอดทดลองที่ตรวจไม่พบ full-length cDNA clone มีการเจริญเพิ่มจำนวนใน broth culture ที่อุณหภูมิห้องไม่แตกต่างจากในหลอดที่ตรวจพบได้อย่างชัดเจน และเมื่อตรวจไม่พบ full-length cDNA clone ในแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ในสภาวะที่เลือกใช้นี้ ก็ไม่ได้พบพลาสมิดที่มีขนาดเล็กลง ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการขาดหายของส่วนย่อยของสารพันธุกรรมเชื้อไวรัส (deletion) ในระหว่างการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย คาดว่า การตรวจไม่พบ full-length cDNA clone น่าจะเป็นผลมาจาก overgrowth ของ antibiotic resistant bacterial mutant ที่เกิดขึ้นเองในระดับต่างๆในธรรมชาติ โดยเป็น mutant ที่สามารถต่อต้านยาแอมพิซิลลินได้โดยไม่ต้องอาศัย antibiotic resistance gene ในพลาสมิด นอกจากนี้ ยังอาจเป็นไปได้ว่า มี overgrowth ของ antibiotic resistant mutant ที่เกิดขึ้นจากการสอตแทรกของ full-length cDNA clone ทั้งหมดหรือเฉพาะบางส่วนเข้าสู่โครโมโซมของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อสามารถต่อต้านยาแอมพิซิลลินโดยการแสดงออกของ antibiotic resistance gene ในโครโมโซมและไม่มีพลาสมิดหลงเหลืออยู่ในเซลล์โคลน

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ที่อุณหภูมิห้อง ได้พบว่าสายพันธุ์ STBL-2 เจริญเพิ่มจำนวนได้ไวกว่าสายพันธุ์ DH5 α F' ที่อุณหภูมิห้อง โดยเห็น bacterial pellet ขณะทำ miniplasmid preparation ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่เป็นที่น่าแปลกใจว่า ปริมาณพลาสมิดที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์กลับไม่มีความแตกต่างกันมากเท่ากับขนาดของ bacterial pellet

ได้สรุปวิธีการโดยย่อ, วัสดุที่ใช้และปัจจัยต่างๆที่ช่วยให้สามารถสร้าง full-length cDNA clone ของสายพันธุ์ 16881 ใน pBluescript II KS ไว้ในตารางที่ 8

3. การสังเคราะห์ RNA โดยวิธี in vitro transcription

ได้ใช้ full-length cDNA pBK S1SP6-10723 เป็นแม่แบบของการสร้าง RNA ในหลอดทดลอง โดยที่ได้ใส่ลำดับเบสที่น่าจะทำหน้าที่เป็น transcriptional promoter ของ SP6 RNA polymerase ได้ไว้ใน forward primer ของการสร้าง 5' half-genome แล้ว โดยที่ลำดับเบสนี้จะแตกต่างจาก consensus SP6 promoter ที่ปลาย 3' เป็นจำนวนสามเบส (ตารางที่ 9) บริเวณปลาย 5' ของ full-length clone pBK S1SP6-10723 จึงมีลำดับเบส ดังนี้

```
5' GCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGCATTAGGTGA
   BssMI      T7 promoter (+1→)      SacI      SacII      XbaI/NheI  SP6 pro-
                                     CACTATAGAGTTGTTAGT 3'
                                     moter +1→
```

ดังนั้น การสร้าง RNA ในหลอดทดลองเมื่อใช้ pBK S1SP6-10723 เป็นแม่แบบจึงสามารถเริ่มต้นจากทั้งบริเวณ T7 promoter ซึ่งปรากฏมีอยู่แล้วใน pBluescript II KS และบริเวณ SP6 promoter ซึ่งได้สังเคราะห์ไว้ใน forward primer การสร้าง RNA เริ่มต้นจากบริเวณ T7 promoter จะได้ RNA ที่ยาวมากขึ้นกว่าที่ควรจะเป็นถึง 60 เบส แต่เนื่องจากในส่วนที่เกิน

ตารางที่ 7. ความคงตัวของ full-length dengue cDNA clone ภายหลัง transformation และ propagation

1. ภายหลัง transformation

Characteristics	Proportion of cells with full-length cDNA insert (proportion with correct orientation)			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp.3	Exp. 4
Vector	pBluescript II KS	pBluescript II KS	pBluescript II KS	pGem 3Z
Host	STBL-2	STBL-2	DH5αF'	STBL-2
Large colonies	0/16	0/40	0/9	0/20
Small colonies	27/28 (12/27)	38/45 (13/30)	12/13 (11/13)	20/20 (na)
na, not applicable				

2. ระหว่าง propagation

Round	Cell	Proportion of cells with full-length cDNA insert		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
1	STBL-2	18/18	19/20	9/10
	DH5αF'	17/17	nd	9/9
2	STBL-2	19/19	22/24	20/20
	DH5αF'	11/18	nd	14/20
3	STBL-2	19/20	16/16	20/20
	DH5αF'	10/13	nd	5/16
4	STBL-2	20/20	nd	20/20
	DH5αF'	11/18	nd	0/20

Exp. 1, Truncated SP6 promoter; Exp. 2, Full SP6 promoter; Exp.3, Truncated T7 promoter (double T7 promoter in the plasmid)

มานี้ ไม่มี initiation codon AUG อยู่เลย จึงทำให้ RNA อาจจะสามารถกำหนดการสร้าง polypeptide ของเชื้อได้ โดยเริ่มต้น translation ที่ authentic initiation codon AUG ที่ปรากฏมีอยู่ภายใน genome ได้ นอกจากนี้ การสร้าง RNA จากบริเวณ T7promoter ยังสามารถใช้เป็น positive control ของ in vitro transcription reaction และช่วยในการตรวจสอบคุณภาพของ DNA template (เช่น การมี/ไม่มี RNase contamination)

ตารางที่ 8. Technical factors contributing to the cloning DV2 genome in high-copy number plasmid.

1. Dengue viral RNA preparation

- high titered virus from mosquito cells
- concentration by ultracentrifugation
- further concentration through RNA prep kit (QIAGEN)

2. Reverse Transcription

- RNaseH⁻ RT (SuperScript II, GIBCO-BRL)
- 50-56°C incubation
- testing of cDNA length by PCR

3. PCR

- RNaseH digestion of RT product
- DNA polymerase combination (Elongase, GIBCO-BRL)
- primer design and selection
- titration of cDNA for optimal amount
- complete resuspension of cDNA

4. Cloning of subgenomic fragments

- pBluescript II KS (Stratagene), a high copy number plasmid
- E. coli strains (DH5αF' and STBL-2, GIBCO-BRL)
- long incubation at room temperature
- low level ampicillin selection (25 ug/mL)
- rapid and inexpensive screening

5. Sequence verification

- automated DNA sequence analysis (ABI Prism 310)
- Big dye terminator kit

6. Successive ligation

- good primer design and practical ligation strategy
 - E. coli strains (DH5αF' and STBL-2, GIBCO-BRL)
 - long incubation at room temperature and low level ampicillin selection (25 ug/mL)
-

เมื่อนำ full-length cDNA clone pBK S1SP6-10723 มาตัดที่ปลาย 3' ของสารพันธุกรรมด้วย Xba I แล้วนำไปเป็นแม่แบบโดยใช้ T7 RNA polymerase พบว่า สามารถสร้าง RNA transcript ขนาดยาวได้เป็นอย่างดี (lane ที่ 6, รูปที่ 2 A) แต่เมื่อใช้เอนไซม์ SP6 RNA polymerase กลับไม่พบ RNA transcript ขนาดยาวใกล้เคียงกันเลย เมื่อลองปรับเปลี่ยนสภาวะของ in vitro transcription พบว่าในบางสภาวะ SP6 RNA polymerase สามารถสร้าง RNA transcript ได้ขนาดยาวที่สุดแค่ประมาณ 6 กิโลเบสเท่านั้นโดยร่วมกับการเกิด smear/tail (lane ที่ 1-5, รูปที่ 2 A) คาดว่าสาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจมาจาก 1. ลำดับเบสของ SP6 promoter ที่สังเคราะห์ขึ้นใน forward primer ไม่ตรงกับ authentic SP6 promoter โดยตลอด เนื่องจากจำเป็นต้อง

เปลี่ยนเบสที่ตำแหน่งที่ +3, +4 และ +5 ของ SP6 promoter ให้ตรงกับลำดับเบสของเชื้อ (ตารางที่ 9) แม้ว่าจะมีผู้รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง +3, +4, +5 จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ SP6 RNA polymerase ไม่มากเท่าที่ตำแหน่ง +1 และ +2 (Kang and Wu, 1987) แต่การเปลี่ยนแปลงอย่างที่ได้ทำใน forward primer นี้ อาจทำให้ binding efficiency หรือ initiation efficiency ลดลงเป็นอย่างมากก็ได้. 2. ลำดับเบสของเชื้อไวรัสแดงทำให้เกิด premature termination ที่จำเพาะกับ SP6 RNA polymerase, หรือ 3. ทั้งข้อ 1 และ 2 ร่วมกัน

เพื่อแก้ปัญหาซึ่งอาจเกิดขึ้นจากสาเหตุข้อที่หนึ่ง จึงได้ทดลองเปลี่ยนแปลง promoter ดังนี้: 1. เปลี่ยนลำดับเบสของ SP6 promoter ที่ปลาย 5' ของสารพันธุกรรมให้ใกล้เคียง authentic SP6 promoter มากขึ้นโดยได้สร้าง 5' half-genome ขึ้นใหม่ และใช้ forward primer เป็น DV2-S1SP6-2 (ตารางที่ 9) และ 2. เปลี่ยนไปใช้ T7 promoter แทน โดยสร้าง 5' half-genome ขึ้นใหม่ให้มี truncated T7 promoter (เปลี่ยนแปลงสามเบสที่ตำแหน่ง +2, +3, +4) แทนที่ SP6 promoter จากนั้นนำ 5' half-genome ใหม่ทั้งสองเชื่อมต่อกับ 3' half-genome clone ที่ 38.2/65 ที่ได้แก้ไขส่วน 3' nt ให้เป็นรูปแบบที่ 2 แล้ว จนได้ full-length cDNA clone pBK S1SP6-2-10723 และ pBK S1T7-10723 (รายการที่ 10-11, ตารางที่ 3)

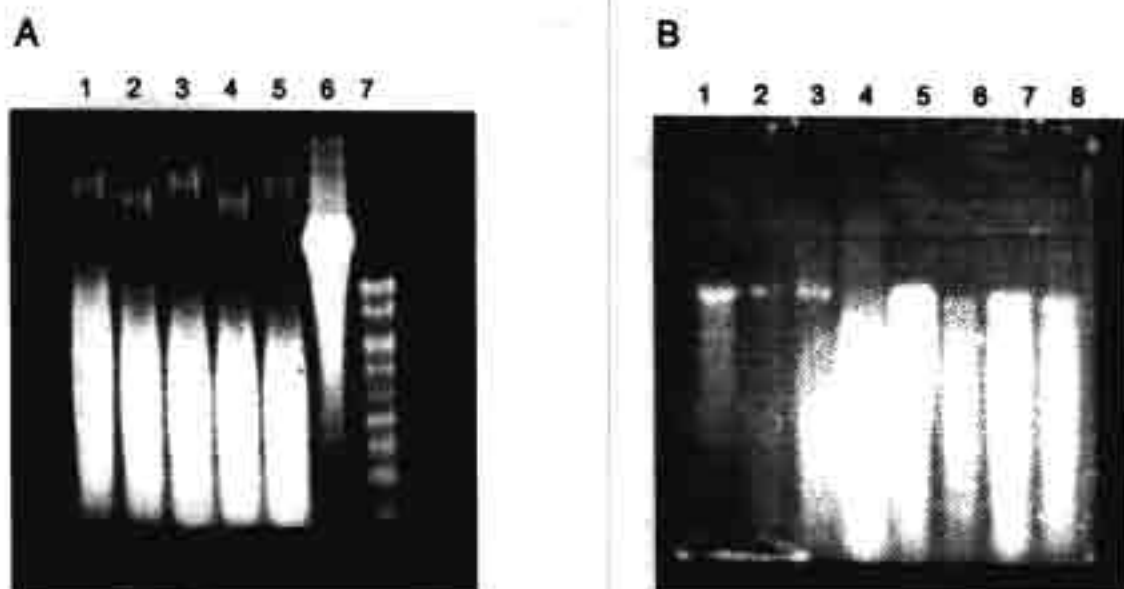
เมื่อนำ pBK S1SP6-2-10723 คัดด้วย Xba I และนำ linearized plasmid เป็นแม่แบบของ in vitro transcription พบว่าการสร้าง transcript ด้วย T7 RNA polymerase ได้ผลดีเช่นเดียวกับเมื่อใช้ pBK S1SP6-10723 แต่เมื่อใช้ SP6 RNA polymerase กลับยังคงไม่ได้ genome length ขนาดเท่ากับ transcript จาก T7 RNA polymerase reaction

การสร้าง RNA transcript จาก pBK S1T7-10723 จำเป็นต้องตัดพลาสมิดเพิ่มเติมด้วย EcoRI เพื่อแยก T7 promoter ที่มีอยู่สองลำดับที่ปลาย 5' ของสารพันธุกรรม แล้วนำ DNA fragment ที่มีเฉพาะสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไปทำให้บริสุทธิ์แล้วจึงนำไปเป็นแม่แบบใน in vitro transcription reaction ด้วย T7 RNA polymerase ผลการศึกษาพบว่า สามารถสร้าง genome-length RNA ได้ แต่การใช้ full-length cDNA clone นี้มีข้อด้อย คือ ผลผลิต RNA ที่ได้มีปริมาณที่ต่ำ และการเตรียม DNA template ยุ่งยากและสิ้นเปลืองมากกว่าเมื่อใช้ pBK S1SP6-10723 มาก จึงไม่ค่อยเหมาะสมสำหรับใช้ในการสร้างและศึกษา mutant ในระยะต่อไป

ต่อมาได้พบโดยไม่ได้คาดหมายว่า การที่ไม่สามารถตรวจพบ genome-length RNA transcript จากปฏิกิริยา SP6 RNA polymerase โดยใช้ pBK S1SP6-10723 เป็นแม่แบบ น่าจะเป็นผลมาจาก artifact ของการแยก RNA ด้วย formaldehyde-agarose gel electrophoresis โดยที่เมื่อนำ RNA transcript จากปฏิกิริยา SP6 RNA polymerase ไปทำให้บริสุทธิ์เสียก่อน แล้วจึงนำไปแยกขนาดด้วย formaldehyde-agarose gel electrophoresis จะพบว่ามี genome-length transcript อย่างชัดเจน(แต่ยังมี tail อยู่) (lane ที่ 5 - 8, รูปที่ 2 B) สาเหตุของ artifact นี้คาดว่าเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาด้วย SP6 RNA polymerase จะใช้ $MgCl_2$ สูงกว่า T7 RNA polymerase ถึง 8 mM ทำให้เมื่อนำ RNA transcript ไป heat ที่ 65 องศาเซลเซียสก่อนการแยกใน formaldehyde-agarose gel การเกิด denaturation ของ RNA transcript จากปฏิกิริยา SP6 RNA polymerase คงจะเกิดขึ้นไม่เต็มที่ transcript ขนาดเท่ากันที่อยู่ในปฏิกิริยา T7 RNA polymerase ซึ่งมี $MgCl_2$ น้อยกว่า ส่งผลให้มองเห็นว่า genome-length RNA transcript จากปฏิกิริยา SP6 RNA polymerase มีขนาดสั้นกว่าที่มาจากปฏิกิริยา T7 RNA polymerase ทั้งๆที่อยู่ใน formaldehyde-agarose gel แม่แบบเดียวกัน

เมื่อทราบเช่นนี้จึงได้นำ RNA transcript จากปฏิกิริยา SP6 RNA polymerase ทั้งรูปแบบที่ได้เติม 5' cap และไม่ได้เติม cap ไปทดสอบ infectivity โดย transfect เข้าสู่เซลล์ BHK เทียบกับ RNA transcript จากปฏิกิริยา T7 RNA polymerase รูปแบบที่ได้เติม 5' cap ต่อไป

รูปที่ 2. In vitro transcript จาก linearized pBK S1SP6-10723 หรือ pBK S1T7-10723 template ใช้ 0.5 - 1 ug linearized plasmid ทำปฏิกิริยากับ SP6 RNA polymerase หรือ T7 RNA polymerase ในสภาวะต่างๆ แล้วแยกตามขนาดใน 0.7% formaldehyde agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide ใน gel A, band ที่วิ่งช้าที่สุด คือ DNA template และขนาดของ RNA markers คือ 6583, 4981, 3638, 2604, 1908, 1383, 955, 623, 281 เบส



A. Unpurified RNA transcript

- lane 1 pBK S1SP6-10723 template, 32 mM $MgCl_2$, 37°C, SP6 Ribomax mix, 2 ul, 4 hr
- lane 2 pBK S1SP6-10723 template, 32 mM $MgCl_2$, 40°C, SP6 Ribomax mix, 2 ul, 4 hr
- lane 3 pBK S1SP6-10723 template, 32 mM $MgCl_2$, 40°C, SP6 Ribomax mix, 4 ul, 4 hr
- lane 4 pBK S1SP6-10723 template, 32 mM $MgCl_2$, 42°C, SP6 Ribomax mix, 2 ul, 4 hr
- lane 5 pBK S1SP6-10723 template, 32 mM $MgCl_2$, 42°C, SP6 Ribomax mix, 4 ul, 4 hr
- lane 6 pBK S1SP6-10723 template, 24 mM $MgCl_2$, 37°C, T7 RNA polymerase, 30 units, 4 hr
- lane 7 RNA markers

B. Purified RNA transcript

- lane 1 pBK S1SP6-10723 template, 24 mM $MgCl_2$, 37°C, T7 RNA polymerase, 30 units, 4 hr (unpurified and load about 1/4 of lane 6 in gel A as genome-length RNA marker)
- lanes 2-4 Irrelevant
- lane 5 pBK S1T7-10723 template, 24 mM $MgCl_2$, 37°C, T7 RNA polymerase, 30 units, 4 hr (purified with QIAGEN RNeasy minispin column)
- lanes 6-8 pBK S1SP6-10723 template, 32 mM $MgCl_2$, 40°C, SP6 Ribomax mix, 2 ul, 4 hr (same RNA as lanes 1 and 3 of gel A., but purified with QIAGEN RNeasy minispin column; lane 6, first elution; lane 7, second elution; lane 8, third elution)

ตารางที่ ๑. เปรียบเทียบ SP6 promoter ที่มีอยู่ใน vector ต่างๆ

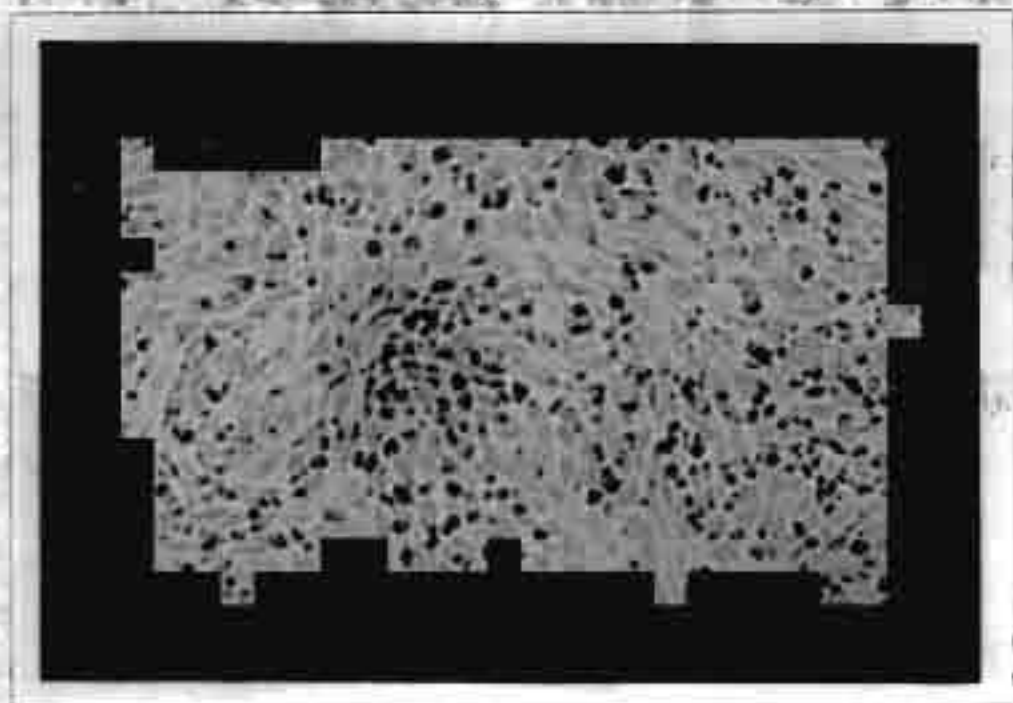
Consensus SP6 promoter :	5'ATTTAGGT/GGACACTATAGAAGG/AG
SP6 promoter in pSP64, 65:	5'ATTTAGGTGACACTATAGAATAC
SP6 promoter in pGem9Zf:	5'ATTTAGGTGACACTATAGAATAT
SP6 promoter in pSP70, 72:	5'ATTTAGGTGACACTATAGAAGCTC
SP6 promoter in pSP71, 73:	5'ATTTAGGTGACACTATAGAAGCCA
SP6 promoter ใน forward primer DV2-S1SP6:	5'ATTTAGGTGACACTATAGAGTTG
SP6 promoter ใน forward primer DV2-S1SP6-2:	5'ATTTAGGTGACACTATAGAGGAGT

4. การทดสอบ infectivity ของ in vitro transcript โดยวิธี transfection

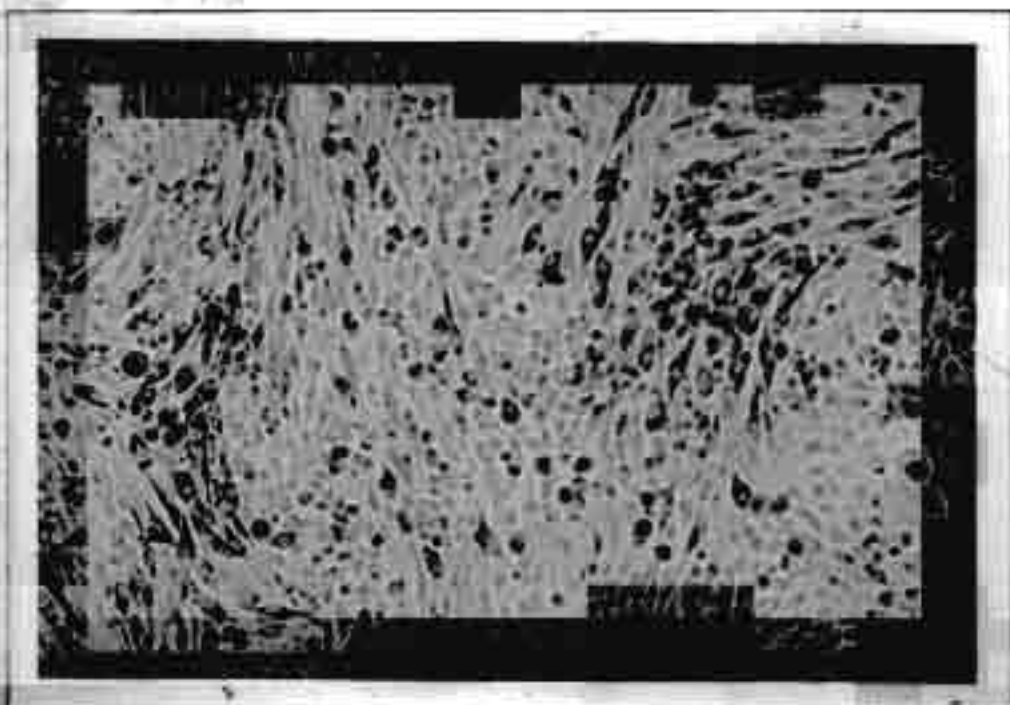
ได้ทดสอบ infectivity ของ RNA transcript จากปฏิกิริยา SP6 RNA polymerase ทั้งรูปแบบที่ได้เติม 5' cap และไม่ได้เติม cap ไปทดสอบ infectivity เทียบกับ RNA transcript จากปฏิกิริยา T7 RNA polymerase รูปแบบที่ได้เติม 5' cap โดยนำ RNA transcript ปริมาณที่เห็นได้ชัดจาก formaldehyde-agarose gel (ไม่ได้วัดปริมาณ เนื่องจากแต่ละตัวอย่างมี tail ที่มีความเข้มแตกต่างกัน) ไป transfect เข้าสู่เซลล์ BHK ด้วย lipofectin เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อนำเซลล์ไป incubate ต่ออีก 48 ชั่วโมงแล้ว fix ด้วย formaldehyde และ triton-X, ย้อมตรวจหาเซลล์ที่มี dengue envelope protein ด้วย monoclonal antibody clone 4G2 ในวิธี 4-step peroxidase-anti-peroxidase ในการทดสอบนี้จะใช้เซลล์ที่เติม lipofectin อย่างเดียวเป็น negative control และใช้เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแดงก็ลายพันธุ์ 16681 และเซลล์ที่เติม lipofectin ร่วมกับ genomic RNA ของสายพันธุ์ 16681 เป็น positive control

ผลการทดสอบแสดงว่า หลังจาก transfection เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ในหลุมที่เติมด้วย lipofectin ร่วมกับ capped RNA transcript จาก SP6 RNA polymerase reaction (pBK S1SP6-10723 template) มีการติดสีน้ำตาลเฉพาะในซี่งโดยประมาณจำนวนมาก (รูปที่ 3) โดยมีความเข้มประมาณครึ่งหนึ่งของเซลล์ในหลุมที่ติดเชื้อไวรัสแดงก็ลายพันธุ์ 16681 (รูปที่ 4) แต่ประมาณพอกับในเซลล์ที่เติม lipofectin ร่วมกับ genomic RNA จากเชื้อไวรัสลายพันธุ์เดียวกัน (รูปที่ 5) ส่วนเซลล์ในหลุมที่เติมด้วย lipofectin เพียงอย่างเดียวและ lipofectin ร่วมกับ uncapped RNA transcript จาก SP6 RNA polymerase reaction (pBK S1SP6-10723) หรือ capped RNA transcript จาก T7 RNA polymerase reaction (pBK S1T7-10723) ไม่ติดสี (รูปที่ 6) การทดสอบนี้แสดงว่า capped RNA transcript ที่สร้างขึ้นจาก pBK S1SP6-10723 template สามารถเข้าสู่เซลล์และเป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณไวรัสแดงก็ได้ ถึงแม้ว่าอาจจะไม่มีประสิทธิภาพสูงเท่ากับเชื้อไวรัสโดยตรง แต่ก็ใกล้เคียงกับ genomic RNA ที่สกัดจากอนุภาคไวรัส ได้ทำการทดสอบสองครั้งได้ผลเช่นเดียวกัน

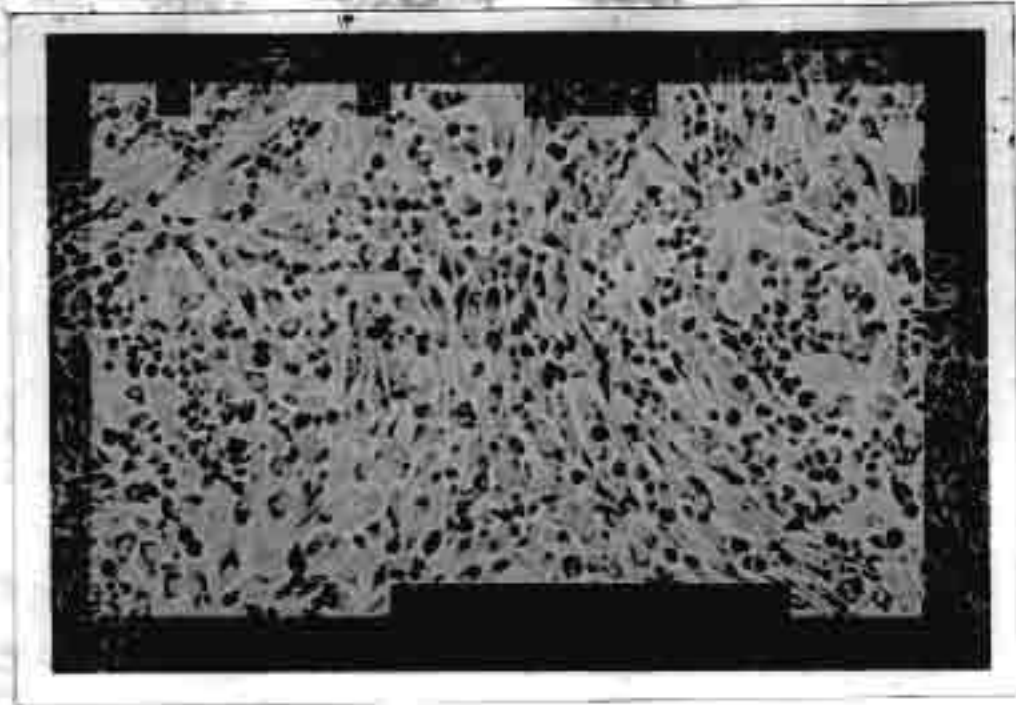
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสที่ปล่อยออกมาจากเซลล์หลังจาก transfection 48 ชั่วโมงในเซลล์อื่นๆ (ยังไม่แล้วเสร็จสมบูรณ์) บ่งชี้ว่า เชื้อไวรัสที่เป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของ capped in vitro transcript สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์อื่นๆและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect) รูปแบบเซลล์กลมโตขึ้นและมีการหลอมรวมตัวกันได้ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของ genomic RNA



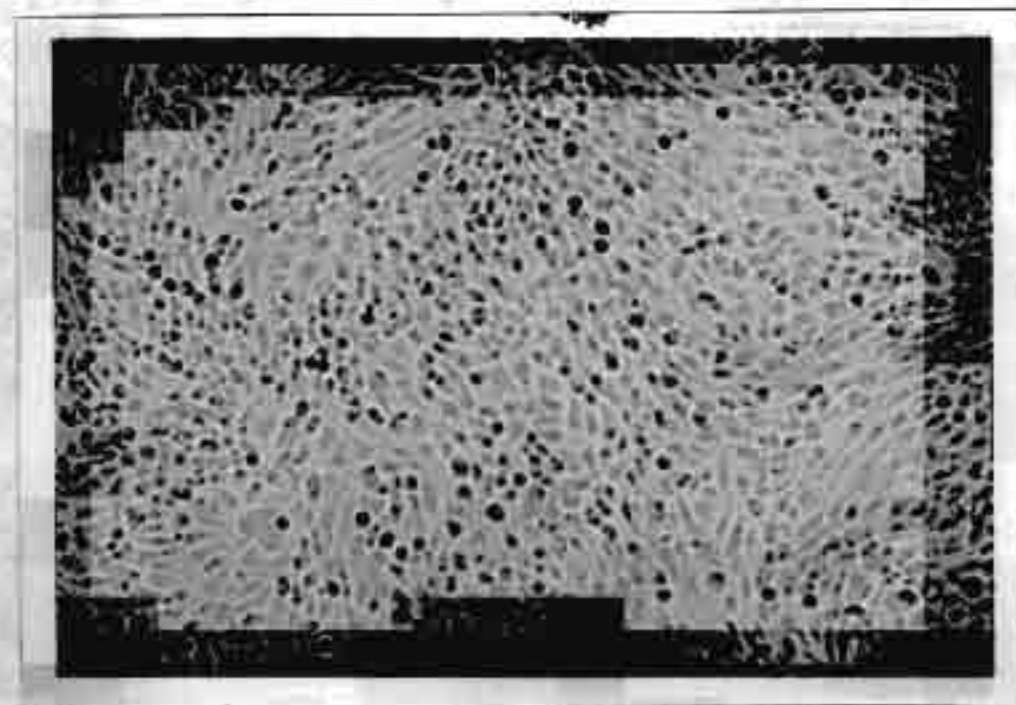
รูปที่ 3. การตรวจหา dengue envelope protein ในเซลล์ BHK ที่เติมด้วย lipofectin ร่วมกับ capped RNA transcript จาก pBK S1SP6-10723 template ด้วย monoclonal antibody 4G2



รูปที่ 4. การตรวจหา dengue envelope protein ในเซลล์ BHK ที่ติดเชื้อคิงส์สลายพันธุ์ 16681 ด้วย monoclonal antibody 4G2



รูปที่ 5. การตรวจหา dengue envelope protein ในเซลล์ BHK ที่เติมด้วย lipofectin ร่วมกับ genomic RNA จากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ 16881 ด้วย monoclonal antibody 4G2



รูปที่ 6. การตรวจหา dengue envelope protein ในเซลล์ BHK ที่เติมด้วย lipofectin ร่วมกับ uncapped RNA transcript จาก pBK S1SP6-10723 template ด้วย monoclonal antibody 4G2

5. การสร้าง PrM-M Cleavage Site Mutant โดย Site Directed Mutagenesis

ได้สร้าง prM-M cleavage site mutant โดย site directed mutagenesis ใน plasmid subclone pBK S1-1547 ΔPrM 402 โดยเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน 7 ตำแหน่งหน้าต่อจุดตัดและ 1 ตำแหน่งหลังจุดตัดให้เป็นกรดอะมิโน glycine จนครบแปดตำแหน่ง (ตารางที่ 5) จากนั้นได้ตัดด้วย Pst I และนำชิ้นส่วน 1.3 กิโลเบสซึ่งครอบคลุมตำแหน่งเบสตั้งแต่ 212 - 1535 เข้าเชื่อมต่อใน 5' half genome ที่มี T7 RNA polymerase promoter แล้วนำ 3' half-genome เข้าเชื่อมต่อกันได้ full-length cDNA clone ที่มีการเปลี่ยนแปลงที่ prM-M cleavage site ตามต้องการทั้ง 8 รูปแบบ ขณะนี้ ยังไม่ได้ใช้ mutant clone เหล่านี้สร้าง in vitro transcript และทำ transfection

นอกจากการทำ site directed mutagenesis ที่ prM-M cleavage site แล้ว ยังได้ทำ deletional mutation เพิ่มเติม จนได้ deletion mutant ทั้งสิ้นจำนวน 3 clone ดังแสดงไว้ในตารางที่ 10.

ตารางที่ 10. รายการ plasmid subclone ที่ได้ทำการกำจัดส่วนย่อยต่างๆของสารพันธุกรรมเชื้อ 16681

Designation	Vector/host	Intended mutation
1. Δ394-407 (115 bp)	pBK (134-2504), DH5αF'	Deletion of the Bgl II (394)-Bcl I (407) fragment (double digestion and ligation of compatible ends)
2. Δ1356-1384 (27 bp)	pBK (134-2504), DH5αF'	Deletion of the EcoN1(1367)-Sph I (1384) fragment (double digestion, Mung bean nuclease digestion and ligation of blunt ends)
3. Δ4208-4333 (124 bp)	pBK (S1SP6-4497), DH5αF'	Deletion of the Eag I (4274)-EcoR V (4331) fragment (double digestion, Mung bean nuclease digestion and ligation of blunt ends)

บทวิจารณ์

ได้สร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ 16681 ใน high copy number plasmid ซึ่งมีความคงตัวสูงในเชื้อแบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ STBL-2 และ DH5 α F' และสามารถใช้เป็นแม่แบบของการสร้าง genome-length RNA ที่เริ่มต้นการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์โฮสต์ ประกอบและคุณสมบัติที่สำคัญของ full-length cDNA clone pBK S1SP6-10723 มีดังนี้

1. Plasmid vector ชนิด pBluescript II KS (Stratagene) ซึ่งมีความยาวประมาณ 2.9 กิโลเบส มี origin of replication ใน E. coli ชนิด ColE1 ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้ถึง 300 - 500 copy/เซลล์ โดยสารพันธุกรรมของเชื้อเด็งกีถูกสอดแทรกเข้าที่ multiple cloning site ระหว่าง Xba I site (ตำแหน่งที่ 677 ของ plasmid sequence) และ Kpn I site (ตำแหน่งที่ 759 ของ plasmid sequence) ทั้งนี้ ตำแหน่ง Xba I site ที่ 677 จะถูกทำลายภายหลังจากการตัดต่อ

ด้านนอกต่อ Xba I site และ Kpn I site มี T7 RNA polymerase promoter และ T3 RNA polymerase promoter ตามลำดับ โดยเป็น promoter ที่มีอยู่แต่เดิมในพลาสมิดชนิดนี้ Promoter ทั้งสองนี้จะมีประโยชน์อย่างมากต่อการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสร้าง in vitro transcript ในหลอดทดลองจากแม่แบบ DNA เดียวกัน

2. สารพันธุกรรมทั้ง 10723 เบสของเชื้อเด็งกีไวรัส serotype 2 สายพันธุ์ 16681 ถูกสอดแทรกอยู่ระหว่าง Xba I site (ตำแหน่งที่ 677 ของ plasmid sequence) และ Kpn I site (ตำแหน่งที่ 759 ของ plasmid sequence) ในทิศทาง 5' $\rightarrow$ 3' ตามลำดับ

3. ปลาย 5' ของสารพันธุกรรม มี SP6 RNA polymerase promoter ที่สั้นกว่าปกติสามเบสที่ด้าน 3' promoter นี้ช่วยให้มีการสร้าง genome-length RNA transcript ในหลอดทดลองโดยมีเบส G (และ m⁷G cap) เพิ่มเข้ากับปลาย 5' ของ RNA อีกหนึ่งเบสเมื่อเปรียบเทียบกับ genomic RNA ของเชื้อไวรัส

4. ปลาย 3' ของสารพันธุกรรมมี Xba I site และ Kpn I site อยู่ถัดจากเบสสุดท้ายของสารพันธุกรรม โดยที่การตัด full-length cDNA clone ด้วย Xba I ก่อนการสร้าง RNA ในหลอดทดลอง จะช่วยให้ปลาย 3' ของ RNA ใกล้เคียงกับปลาย 3' ของ genomic RNA มาก โดยที่จะมีเบสเกินมาเพียงสองเบสเท่านั้น ส่วน Kpn I site ช่วยในการเชื่อมต่อของ 3' half-genome เข้ากับ 5' half-genome

5. ส่วน 3' ntr ของสารพันธุกรรมมีความแตกต่างของลำดับเบสเป็นรูปแบบ 10403 T, 10561 C

6. มีเอนไซม์ที่ตัดภายในสารพันธุกรรมได้ 1 - 3 ตำแหน่งอยู่ถึง 21 ชนิดที่จะไม่ตัด pBluescript II KS sequence ซึ่งจะช่วยให้การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน DNA ภายในสารพันธุกรรมมีความคล่องตัวสูงมาก

7. สามารถตัดสารพันธุกรรมทั้ง 10723 เบส และ RNA polymerase promoter ออกจากพลาสมิดและแลกเปลี่ยน โดยใช้ Sac I และ Xba I และสามารถตัดสารพันธุกรรมช่วง 4497 - 10723 เบส ออกและแลกเปลี่ยนโดยใช้ Kpn I

ในระหว่างการพัฒนาวิธีสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสแดงกีสายพันธุ์ 16681 ใน high copy number plasmid ชนิด pBluescript II KS (Stratagene) เพื่อให้ได้ full-length cDNA clone ที่มีความคงตัวสูงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในเซลล์แบคทีเรียที่หาได้ง่าย และเพื่อให้สามารถใช้ full-length cDNA clone ที่สร้างขึ้นเป็นแม่แบบของการสร้าง RNA transcript ที่เริ่มต้นการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในเซลล์ BHK-21 ครั้งนี้ได้พบอุปสรรคทางเทคนิคที่สำคัญหลายประการ (ตารางที่ 11) ในหลายๆ ครั้ง ได้พบวิธีการแก้ไขปัญหาลักษณะนี้โดยความบังเอิญ

อุปสรรคประการแรกเป็นการยับยั้งปฏิกิริยา long PCR โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา reverse transcription ปัญหานี้พบได้บ่อยและมีผู้กล่าวถึงมานานแล้ว สาเหตุที่ยังพบในการศึกษาครั้งนี้เป็นเพราะ ได้พยายามทำ cDNA ขนาดยาวโดยใช้ primer ที่จับกับปลาย 3' ของสารพันธุกรรมในปฏิกิริยา reverse transcription แต่ cDNA product ที่ได้มีขนาดความยาวแตกต่างกันมาก ทำให้ยากต่อการประมาณปริมาณของ genome-length cDNA ที่มีอยู่ เมื่อทดสอบนำ cDNA product นี้ไปทำปฏิกิริยา long PCR แล้วไม่สามารถตรวจพบ PCR product ก็ทำให้เชื่อไปว่าปริมาณ genome-length cDNA มีอยู่ไม่พอเพียงและนำ cDNA product ปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ ในการทำ long PCR ต่อมาเมื่อถูกใจว่าอาจเกิดปัญหาการยับยั้งมากกว่าการที่มี cDNA product ไม่เพียงพอและได้ลดปริมาณลง จึงได้ long PCR product ตามความมุ่งหมาย ในระยะหลัง ได้ titrate ปริมาณ cDNA หลังจากการทำปฏิกิริยา reverse transcription ทุกครั้งและได้ผลในการป้องกันปัญหาการยับยั้งเป็นอย่างดี

อุปสรรคประการที่สองเป็นความล้มเหลวของการทำ reverse transcription และ long PCR ของบริเวณปลาย 3' ของสารพันธุกรรม คาดว่าเกิดจาก 2 สาเหตุ คือ 1. primer ที่ออกแบบให้จับกับปลาย 3' ของสารพันธุกรรม สามารถเข้าจับกับ

ตารางที่ 11. อุปสรรคทางเทคนิคที่สำคัญในการสร้าง full-length cDNA clone ของสายพันธุ์ 16681

อุปสรรค	สาเหตุและการแก้ไข
1. ไม่ได้ product จากปฏิกิริยา long PCR	1. RT product ยับยั้ง long PCR; แก้ไขโดยทำการ titrate หาปริมาณ RT product ที่มากพอสำหรับการทำ long PCR โดยไม่ยับยั้งปฏิกิริยา long PCR
2. ไม่ได้ product ขนาดยาวจากปฏิกิริยา long PCR ที่ปลาย 3' ของสารพันธุกรรม	2. ไม่ทราบสาเหตุ; แก้ไขโดยทำปฏิกิริยา RT และ long PCR ด้วย primer ที่จับกับปลาย 3' ของ genomic RNA จำนวน 2 ชนิดที่มีลำดับเบสต่างกันเล็กน้อย
3. transformant โคโลนีขนาดใหญ่ไม่มี full-length cDNA	3. เกิดการสูญเสียของ cDNA ในโคโลนีขนาดใหญ่; แก้ไขโดยเลือก pick เฉพาะโคโลนีขนาดเล็ก
4. ไม่ได้ genome-length transcript จากปฏิกิริยา in vitro transcription โดยใช้ SP6 RNA polymerase	4. เป็น artifact ที่เนื่องมาจาก incomplete denaturation ของ in vitro transcript ในสารละลายที่มี $MgCl_2$ ในระดับสูง; แก้ไขโดยเพิ่มสัดส่วนของ RNA sample buffer, เติมน formaldehyde ลงใน gel running buffer หรือทำ in vitro transcript ให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปแยกโดย formaldehyde-agarose gel electrophoresis

บริเวณภายในสารพันธุกรรมได้ด้วย ความไม่จำเพาะของ primer เช่นนี้เป็นสาเหตุให้ไม่สามารถทำ long PCR เพื่อให้ได้ genome-length PCR product จึงจำเป็นต้องแบ่งการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมเชื้อสายพันธุ์ 16681 นี้ออกเป็นสามช่วงใหญ่, 2 มี secondary structure ที่ปลาย 3' ของสารพันธุกรรม (Chambers et al., 1990) ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อปฏิกิริยา reverse transcription และ/หรือ PCR การแก้ไขปัญหานั้นได้พบโดยบังเอิญ โดยที่พบว่าการเพิ่มจำนวนบริเวณปลาย 3' ของสารพันธุกรรมให้ได้ผลจะต้องใช้ primer สองเส้นที่มีลำดับเบสต่างกันเล็กน้อยสำหรับขั้นตอน reverse transcription และ long PCR หากใช้ primer เส้นใดเส้นหนึ่งในทั้งสองปฏิกิริยาจะไม่ได้ผล โดย primer สำหรับ reverse transcription คือ

5' GGTCTAGAACCTGTTGATTCAACAGCACCATTCCATTTTC 3'

ในขณะที่ primer ที่ใช้ได้ผลสำหรับ long PCR คือ

5' CTCGGTACCTCTAGAACCTGTTGATTCAACAGCACCATTCCATTTTCTGCGGTTTC 3'

โดยที่ primer ทั้งสองมีลำดับเบสที่ต่างกันทั้งปลาย 3' และปลาย 5'

การสูญหายของ cDNA ในโคโลนีขนาดใหญ่เป็นอุปสรรคประการที่สาม ซึ่งได้เคยมีผู้รายงานไว้ก่อนแล้ว (Polo et al., 1997) โดยที่พบเช่นเดียวกันว่า เฉพาะโคโลนีขนาดเล็กเท่านั้นที่จะมี full-length cDNA อยู่ แต่โคโลนีขนาดใหญ่จะมีแค่บางส่วน ของสารพันธุกรรมเชื้อไวรัส ในขณะที่การศึกษานี้ได้พบว่า โคโลนีขนาดใหญ่จะไม่พบมีพลาสมิดอยู่เลย ความแตกต่าง ประการหลัง อาจจะเป็นผลสืบเนื่องมาจากการใช้สภาวะของการเพาะเลี้ยงและปริมาณของยาปฏิชีวนะในน้ำยาเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

อุปสรรคประการสุดท้ายเป็นการที่ไม่สามารถมองเห็น genome-length RNA transcript หลังจากการทำปฏิกิริยา in vitro transcription โดยใช้ SP6 RNA polymerase ในสารละลายที่มี $MgCl_2$ ในระดับสูง (32 mM) ปัญหานี้ทำให้การศึกษาค้นคว้าล่าช้ามาก โดยที่ต้องทำการแก้ไขโดยการสร้าง full-length cDNA clone ที่มี 5' promoter sequence ขึ้นมาใหม่ถึงสอง clone ด้วยกัน (โดยไม่ช่วยแก้ปัญหา) ต่อมาจึงได้พบสาเหตุโดยไม่ได้คาดหมาย และทำการแก้ไขโดยเพิ่มสัดส่วนของ RNA sample buffer และ/หรือ เติม formaldehyde ลงใน gel running buffer หรือทำ in vitro transcript ให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปแยกโดย formaldehyde-agarose gel electrophoresis

การแก้ไขปัญหาดังกล่าวทางเทคนิคเหล่านี้ได้สำเร็จช่วยให้มีความมั่นใจสูงในการนำ full-length cDNA clone เหล่านี้ไปใช้ในการศึกษาทางพื้นฐานของโรคไข้เลือดออกและเชื้อไวรัสเด็งกีในอนาคต โดยเฉพาะการสร้าง mutant ขึ้นมาใหม่จำนวนมากๆ ซึ่งจะทำได้รวดเร็วมากถ้าหากใช้วิธีการสร้าง full-length cDNA clone ที่มี mutated sequence ขึ้นมาใหม่จากการนำ mutated sequence เข้าสู่ 5' half-genome (หรือ 3' half-genome) เสียก่อนแล้วจึงเชื่อมต่อ 5' half-genome และ 3' half-genome เข้าด้วยกัน ซึ่งคาดว่าจะช่วยให้ได้ full-length cDNA mutant รวดเร็วกว่าการนำ mutated sequence เข้าสู่ full-length cDNA clone ที่มีอยู่แล้วโดยตรง

Output

1. ได้มอบ 5' half-genome, 3' half-genome และ full-length clone pool ให้แก่ Dr. Gerd Katzenmier เพื่อใช้ในการวิจัยลักษณะและการทำงานของ dengue virus protease (NS3) ในโครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สกว. โดยได้รับความเห็นชอบของ สกว. แล้ว

2. กำลังจัดเตรียมต้นฉบับที่เป็นผลจากโครงการนี้โดยตรง 1 เรื่อง คือ Cloning of full-length cDNA of dengue virus type 2 in high-copy number plasmid cloning vectors ซึ่งคาดว่าจะส่งไปขอพิจารณาตีพิมพ์ที่วารสาร Journal of Virological Methods

เอกสารอ้างอิง

- Blok J, McWilliam M, Butler HC, Gibbs AJ, Weiler G, Herring BL, Hemsley AC, Askov JG, Yoksan S, Bhammarapavati N. Comparison of a dengue-2 virus and its candidate vaccine derivative: Sequence relationships with the flaviviruses and other viruses. *Virology* 1992; 187:573-90.
- Boyer J-C and Haenni A-L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 1994; 198: 415-26.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rico C. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 1990; 44: 649-88.
- Gualano RC, Pryor MJ, Cauchi MR, Wright PJ, Davidson AD. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. *J. Gen. Virol.* 1998; 79: 437-46.
- Kang C, Wu CW. Studies on SP6 promoter using a new plasmid vector that allows gene insertion at the transcription initiation site. *Nuc. Acid Res.* 1987; 15: 2279-94.
- Kapoor M, Zhang L, Mohan PM, Padmanaphan R. Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene* 1995; 162: 175-80.
- Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapavati N, Gubler DJ. Construction of infectious cDNA clone for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-S3. *Virology* 1997; 230: 300-8.

- Lai C-J, Zhao B, Hori H, Bray M. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1991; 88: 5139-43.
- Okuno Y, Sasao F, Fukunaga T, Fukai K. An application of PAP (peroxidase-anti-peroxidase) staining technique for the rapid titration of dengue virus type 4 infectivity. *Biken J.* 1977; 20: 29-33.
- Polo S, Ketner G, Lewis R, Falgout B. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J. Virol.* 1997; 71: 5366-74.

บทบทวน

1. Protocol for Dengue Genomic RNA Preparation

1. Grow dengue virus strain 16681 in confluent monolayer of C6/36 mosquito cells at 28°C until 70-100 % cell fusion is observed. Collect culture supernatant and replace with fresh media daily until the majority of cells detaches from the flask. Usually the supernatant can be collected for upto 5 days. Store culture supernatant without adding fetal bovine serum at -80°C to -80°C until use.

All tips, tubes and reagents for use in the following steps should be RNase free by diethyl pyrocarbonate treatment.

2. To concentrate the virus by ultracentrifugation, thaw culture supernatant and spin aliquots of 10 ml in 14-ml polyallomer tubes using a swingout rotor at 40,000 rpm for 2 hours at 4 - 6 °C. Up to 40-80 ml of supernatant can be comfortably processed in one day. To save the tubes, successive spins (ie. spin virus supernatant onto the pellet from previous spin) can be done.

3. Discard the supernatant and resuspend viral pellet at the bottom of all tubes gently with 100 ul of MEM media. Extract by mixing vigorously with 400 ul of solution D (4 M guanidine isothiocyanate, 25 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% sarcosyl and 0.1 M 2-mercaptoethanol), then with 500 ul of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25 : 24 : 1 v/v) and ethanol precipitate in the presence of 0.3 M sodium acetate. Wash the resulting pellet once with 70% ethanol and let dry

If the RNA is to be extracted with RNAeasy kit (QIAGEN), follow the instruction supplied in the kit but the final elution step (30 ul of diethyl pyrocarbonate-treated water) should be done twice. The eluted genomic RNA should be kept separated as the RNA content are not equal.

4. Resuspend RNA pellet in 15-30 ul of diethyl pyrocarbonate-treated water, add RNAsin, and store in aliquots at -60 °C to -80°C until use. Before going on with the next step, a very small aliquot (ie. 0.5 or 1 ul) of the purified genomic RNA should be tested with short RT-PCR to make sure that the RNA is intact.

It is not easy and reliable to measure the amount of RNA at this step unless a very large volume of culture supernatant is used and the RNA pooled together. The dengue virus present in the supernatant of culture with good CPE is about 1×10^6 ffu/ml and assume the recovery of 50%, the final yield is approximately 40×10^6 RNA molecules/15-30 ul final volume from an 80-ml culture.

2. Protocol for Reverse Transcription and PCR

1. Start with 5 - 10 μ l of purified genomic RNA (if 5 μ l are used, add sterile DEPC-treated H_2O to make 8 μ l volume), denature by heating at 70°C and quickly chill on ice.

2. Prepare RT mix:	5X first strand RT buffer (GIBCO-BRL)	4 μ l
	0.1 M DTT	2 μ l
	2.5 mM (each) dNTPmix	4 μ l
	Backward primer (100 pmol)	1 μ l
	SuperScript II RT (200 u/ul, GIBCO-BRL)	1 μ l

3. Add RT mix to RNA solution (final volume of 20-21 μ l), incubate at 45-56 °C for 1 hour.

4. Inactivate RT by heating at 94°C for 4 minutes.

5. Add RNaseH (3 u/ul, GIBCO-BRL) 2 μ l, incubate at 37 °C for 1 hour.

6. Add 180 μ l H_2O , extract once with 200 μ l phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 v/v), spin and remove aqueous layer. Add to aqueous layer 20 μ l of 3 M sodium acetate. Ethanol precipitate, spin, wash pellet once with 70% ethanol, and let dry. Resuspend cDNA with 5-10 μ l of H_2O and store at -80 °C to -80°C until use.

7. Titrating the amount of cDNA for the amplification reaction by starting from 0.5 μ l to 1 μ l of cDNA.

Prepare the following mixtures:

7.1 cDNA mix:	cDNA	1 μ l
	10 mM (each) dNTP mix	1 μ l
	Forward primer (50 pmol)	1 μ l
	Backward primer (50 pmol)	1 μ l
	Sterile H_2O to	20 μ l

7.2 elongase mix :	5X buffer A (GIBCO-BRL)	5 μ l, (final Mg conc. 1.5-1.6 mM)
	5X buffer B (GIBCO-BRL)	5 μ l
	Elongase mix (GIBCO-BRL)	1-2 μ l
	Sterile H_2O to	30 μ l

8. Heat cDNA mix at 94 °C for 50 sec, cool to 55-60 °C and add elongase mix (final volume of 50 ul) at 55-60 °C , mix well. Add 2 drops of mineral oil.

9. Cycling parameter (Thermocycler 480):

Denaturation	94°C	30 sec,
Annealing	55-68°C	30 sec,
Extension	68°C	5-10 min, 30-35 cycles

10. Take 3 ul of amplified product for running against DNA marker in 0.8% agarose gel.

11. Optimize by varying : Mg concentration, amount of cDNA and enzyme, annealing temperature and primer concentration.

