



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์ไนเมและการตรวจหาโปรตีน
ยับยั้งขบวนการ apoptosis จากเฮปาโต-
แมพนครติคพาร์โวไวรัสในกึ่งกลาดำ

โดย ผศ.วาสนา สุขุมศิริชาติ
ภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

30 พฤศจิกายน 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

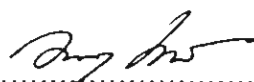
การวิเคราะห์จีโนมและการตรวจหาโปรตีน
ยับยั้งขบวนการ **apoptosis** จาก
เฮปาทอแพนครีติคพาร์โวไวรัสในถุงงูสีดำ

โดย ผศ.วาสนา สุขุมศิริชาติ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม นักวิทยาศาสตร์ที่เลี้ยงให้คำปรึกษาและแนะนำเกี่ยวกับการวิจัยจนเสร็จสิ้นโครงการวิจัย ขอขอบพระคุณ ดร.ศิริวาท กลิ่นบุหงา ที่ช่วยวิเคราะห์ Phylogenetic trees โดยโปรแกรม Phylip ขอขอบคุณนางสาว กานต์ยุพา จิตวัฒนา ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องการสกัดไวรัส ขอขอบคุณ ดร.พงโสภี อัฒ-ศาสตร์ ที่ช่วยเหลือในเรื่องการหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ข้อมูลบางส่วน ขอขอบคุณ Dr. Miloslav Juricek ที่ช่วยแนะนำการใช้โปรแกรม GCG ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์บุญเสริม วิทย์ชำนาญกุล ตลอดจนเจ้าหน้าที่บริษัทซีพีจังหวัดสงขลา ชมรมกึ่งปัตตานี และเจ้าของบ่อกึ่งจังหวัดนครปฐม ราชบุรี ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และปัตตานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เกี่ยวกับตัวอย่างกึ่งแคะเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ขอแสดงความขอบคุณหน่วยงาน สวทช. ที่ให้บริการเครื่อง Ultracentrifuge ขอขอบคุณนิสิตปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ มศว. ที่ช่วยในการออกภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างกึ่ง ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องสถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย และท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้



(ผศ.ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ)

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/31/2542

ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์จีโนมและการตรวจหาโปรตีนยับยั้งกระบวนการ Apoptosis

จากเฮปาโตแพนแครีเอติกพาร์โวไวรัสในกึ่งกลาดำ

ชื่อนักวิจัย : ผศ. ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110 โทร 02-2602122-4 ต่อ 4601

โทรสาร 02-2602122-4 ต่อ 4011 E-mail address: wasanas@swu.ac.th

เฮปาโตแพนแครีเอติกพาร์โวไวรัส เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ทำให้เกิดโรคกึ่งแควะในกึ่งกลาดำ ในการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมไวรัสแล้วนำไปวิเคราะห์หาอื่นต่างๆ โดยเฉพาะยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งการเกิด apoptosis ในกึ่ง การวิจัยได้ทำการแยกสกัดไวรัส HPV จากตับกึ่งที่ติดเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ ตรวจพิสูจน์การติดเชื้อโคลนนิ่งและหาลำดับเบส จากการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดจำนวน 6,089 เบส พบว่ามี open reading frame (ORF) 3 แห่งบนดีเอ็นเอที่เป็นบวกคือ ORF1, ORF2 และ ORF3 ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนขนาด 428, 592 และ 818 กรดอะมิโน ซึ่งเทียบเท่า 50.37, 69.82 และ 92.17 กิโลดาร์ตัน ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ORF2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ Non-structural protein (NS1) ของพาร์โวไวรัสอื่นๆ โดยมีลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ไว้ 2 แห่ง คือ ส่วนของ Replication initiation motif และ NTP-binding and helicase domain motif ส่วนลำดับกรดอะมิโนของ ORF1 ไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนใดๆ ในฐานข้อมูล แต่คาดว่า เป็นส่วนของ Non-structural protein 2 (NS2) ซึ่งยังไม่รู้หน้าที่ สำหรับ ORF3 เป็นยีนของโปรตีนห่อหุ้ม (VP) ของไวรัส เนื่องจากมี PGY motif อยู่ที่ปลายอะมิโนและมี phospholipase A2 motif ซึ่งพบในพาร์โวไวรัสสัตว์มีกระดูกสันหลังและในแมลง การจัดเรียงตัวของยีนบนจีโนมเป็นแบบ monosense genomic organization ยีนของ NS1 และ NS2 ซ้อนทับกันอยู่ทางซ้าย ส่วนยีน VP อยู่ทางขวาของจีโนมและสร้างจาก ORF3 จากข้อมูล Phylogenetic tree พบว่าไวรัส HPV มีความใกล้ชิดกับพาร์โว-ไวรัสที่พบในกึ่งและแมลง คือ IHNV, AaeDNV และ Aa/DNV นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนในส่วนที่ยีน NS1 มีความเหมือนเล็กน้อยกับ I-FLICE และ FLAME ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งเอนไซม์ caspase ใน *Homo sapiens* และจาก SDS-PAGE พบโปรตีนหลักขนาด 57 กิโลดาร์ตัน ในการวิจัยต่อไปควรมีการศึกษา *in vivo* เพิ่มเติมว่าหลังการยับยั้งการแสดงออกของยีนของไวรัส เช่น การใช้ SiRNA แล้วทำให้เกิด apoptosis ในเซลล์กึ่งที่ติดเชื้อไวรัส HPV มากขึ้นหรือน้อยลง

คำหลัก : Hepatopancreatic parvovirus, จีโนมไวรัส HPV, Apoptosis inhibitor, HPV

Abstract

Project Code : PDF/31/2542

Project title : "Genome analysis and identification of apoptotic inhibitor from hepatopancreatic parvovirus in *Penaeus monodon* "

Investigator : Assist. Dr. Wasana Sukhumsirichart, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Tel. 02-2602122-4 ต่อ 4601 Fax. 02-2602122-4 ต่อ 4011 E-mail: wasanas@swu.ac.th

Project Period : 2 years

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) is a single-stranded DNA virus that infected and cause disease in *Penaeus monodon*. In this study, the nucleotide sequence of HPV genome was determined and analyzed for its genes especially anti-apoptosis. The virus particle was isolated from infected hepatopancreas, then the DNA was purified, cloning and sequencing. The analysis of 6,089 nucleotides of the viral genome, revealed three large open reading frames (ORFs) and parts of the non-coding termini. The ORF1, ORF2, and ORF3 on the complementary (plus) strand have potential coding of 428, 592 and 818 amino acids which equivalent to 50.37, 69.82 and 92.17 kDa, respectively. The ORF2 is most likely encodes the major non-structural protein (NS1) since it contains conserved replication initiation motif and NTP-binding and helicase domains similar to those in NS1 from all other parvoviruses. The ORF2 encodes for putative non-structural protein-2 (NS2), which unknown function. The right half (ORF3) of the genome encodes a capsid protein (VP) because of the PGY motif located at the N-terminal region of VP is conserved among most parvoviruses and also contained a phospholipase A2, a novel viral enzymes found in both vertebrate and insect parvoviruses. The HPV genome organizes as monosense, two overlapping genes encode for two NS proteins and the structural protein originates from ORF3. The phylogenetic tree construction revealed that it is closely related to shrimp parvoviruses and mosquito densovirus. Part of NS1 gene showed low similarity to I-FLICE and FLAME, an apoptosis inhibitors of *Homo sapiens*. By SDS-PAGE analysis, the major protein band of the virus was found at 57 kd. For further study, the *in vivo* experiment should be carried out to observe apoptosis response when the viral gene is inhibited by in infected cell treat with RNA interference specific to putative anti-apoptotic gene of HPV virus.

Key words: Hepatopancreatic parvovirus, HPV genome, Apoptosis inhibitor, HPV

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญรูป	v
สารบัญตาราง	vii
หน้าสรุปโครงการ	viii
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	5
ผลการทดลอง	17
บทวิจารณ์	46
เอกสารอ้างอิง	49
Output	53
ภาคผนวก	54

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะและรูปร่างของอนุภาคไวรัส HPV และภาพของกึ่ง ปกติและกึ่งที่ติดเชื้อ HPV	2
รูปที่ 2 pGEM-T vector ที่ใช้ในการโคลนนิ่ง full-length genome ของ HPV	8
รูปที่ 3 แผนภาพการทำ Inverse PCR ดีเอ็นเอของ HPV	10
รูปที่ 4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของไวรัส HPV ที่สกัดได้จากชั้นต่างๆ จากการทำ urografen ultracentrifugation โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส	17
รูปที่ 5 การวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอที่เตรียม ได้ โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส	18
รูปที่ 6 การวิเคราะห์ โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE	
รูปที่ 7 การวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยไพรเมอร์ HPV 6 และ HPV 12 โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส	20
รูปที่ 8 ลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมไวรัส HPV ที่หาได้	22-24
รูปที่ 9 การจัดเรียงของยีนบนสายดีเอ็นเอที่เป็นสายบวกของไวรัส HPV	25
รูปที่ 10 ตำแหน่งจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส และการแปลรหัส	25
รูปที่ 11 Replication initiator motif I และ II ของไวรัส HPV และพาร์ไวรัสอื่นๆ ที่พบในส่วน Non-structural protein-1 (NS-1) ซึ่งมีลำดับเบส ประมาณ 119 เบสที่ไม่เปลี่ยนแปลง (Conserved region)	26
รูปที่ 12 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบริเวณ NTP-binding and helicase domain จำนวน 119 ตัว ของไวรัส HPV และพาร์ไวรัสอื่นๆ	27
รูปที่ 13 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนโครงสร้าง (Capsid protein) จาก ORF3 ของจีโนมไวรัส HPV กับลำดับเบสของ Phospholipase A2	28
รูปที่ 14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ Glycine-rich conserved region ของ ORF3 (right ORF) ของไวรัส HPVmon เทียบกับพาร์ไวรัส อื่นๆ ลูกศรแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนอาร์จินีน	28
รูปที่ 15 การเปรียบเทียบ Genomic organization จีโนมของ HPVmon กับพาร์ไวรัส ในกึ่งและแมลง อื่นๆ	32
รูปที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนส่วนหนึ่งของยีน NS1 ไวรัส กับยีนยับยั้ง การเกิด apoptosis (I-FLICE และ FLAME) ของ <i>Homo sapeins</i>	33
รูปที่ 17 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน NS2 ไวรัส กับยีนยับยั้ง การเกิด apoptosis (I-FLICE และ FLAME) ของ <i>Homo sapeins</i>	34
รูปที่ 18 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนส่วนหนึ่งของยีน VP ของไวรัส กับยีนยับยั้ง การเกิด apoptosis (I-FLICE และ FLAME) ของ <i>Homo sapeins</i>	35

	หน้า
รูปที่ 19 Phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับกรดอะมิโน จำนวน 119 ตัวในบริเวณของ NTP-binding domain (ข้อมูลในรูปที่ 12) โดยโปรแกรม GCG	36
รูปที่ 20 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ประมาณ 119 ตัวในบริเวณของ NTP-binding and helicase domain โดยโปรแกรม Clustal X	37
รูปที่ 21 Phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับกรดอะมิโน ในบริเวณของ NTP-binding and helicase domain (ข้อมูลในรูปที่ 20) โดยโปรแกรม PAUP	38
รูปที่ 22 Parsimony tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับเบสในส่วนของยีน NS-1 โดยโปรแกรม Phylip	39
รูปที่ 23 Phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในส่วนของยีน VP โดยโปรแกรม PAUP	40
รูปที่ 24 แสดง Restriction enzyme mapping ของจีโนมไวรัส HPV	41

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงตัวยับยั้งกระบวนการ apoptosis ที่เคยมีรายงานมาแล้ว	3
ตารางที่ 2 แสดงปริมาตรของละลายยูโรกราฟิน และบัฟเฟอร์ NTE ในการเตรียม gradient ในช่วง 20%-40% ปริมาตรทั้งหมด 5 มล.	5
ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบสของ HPV โดยวิธี primer walking	12
ตารางที่ 4 แสดงโปรแกรมและ servers ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีโนมไวรัส HPV	14
ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดของเอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอของไวรัส HPV	42

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนหลังปริญญาเอก

1. ชื่อโครงการวิจัย การวิเคราะห์จีโนมและการตรวจหาโปรตีนยับยั้งกระบวนการ Apoptosis จากเฮปาโตแพนครีเอติกพาร์โวไวรัสในกึ่งกลาดำ

เฮปาโตแพนครีเอติกพาร์โวไวรัสหรือ HPV เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว มีรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22-24 นาโนเมตร ไวรัสนี้ทำให้เกิดโรคในกึ่งหลายชนิด เช่น กึ่งกลาดำ กึ่งแซบวัย เป็นต้น กึ่งที่ติดเชื้อไวรัส HPV จะมีลักษณะโตช้าหรือแคระแกร็นแต่ไม่ตาย โดยปกติแล้วเซลล์ของโฮสต์ที่ติดเชื้อไวรัสจะถูกกำจัดโดยกระบวนการ apoptosis ซึ่งการเกิด apoptosis ถ้ามักเกินไปอาจทำให้โฮสต์ตายได้ เช่น การติดเชื้อไวรัสหัดหึ่ง ไวรัส Rabies เป็นต้น แต่ในกรณีของไวรัส HPV เมื่อติดเชื้อแล้วไม่ทำให้อวัยวะตาย อาจเป็นไปได้ว่าไวรัสนี้มียีนที่ยับยั้งกระบวนการ apoptosis ในเซลล์กึ่งก็ได้ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมไวรัส HPV แล้วนำไปวิเคราะห์ หายีนต่างๆ โดยเฉพาะยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งกระบวนการ apoptosis ในกึ่ง

ในการดำเนินงานวิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างตับกึ่งแคะจากจังหวัดต่างๆ ทำการสกัดอนุภาคไวรัสและทดสอบการติดเชื้อไวรัส HPV โดยเทคนิค PCR จากนั้นทำการโคลนนิ่ง หาลำดับเบสจากดีเอ็นเอสายผสมและจากดีเอ็นเอของ HPV โดยตรงโดยการทำ primer walking นำลำดับเบสที่ได้มาเชื่อมต่อกันและวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมพิเศษเพื่อหายีนทั้งหมดของไวรัส ยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งกระบวนการ apoptosis และการเรียงตัวของยีน ฯลฯ

ผลของการวิจัยที่ได้รับคือ สามารถหาลำดับเบสของไวรัสได้ทั้งหมด 6,089 เบส จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบ open reading frames (ORF) จำนวน 3 แห่ง บนดีเอ็นเอสายบวก คือ ORF1, ORF2, และ ORF3 ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนขนาด 428, 592 และ 818 กรดอะมิโน หรือเทียบเท่ากับโปรตีนขนาด 46.49, 69.82 และ 92.17 กิโลดาร์ตัน ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไวรัสกับข้อมูลในฐานข้อมูลพบว่า โปรตีนจาก ORF2 มีความคล้ายคลึงกับ Non-structural protein (NS1) ของพาร์โวไวรัสอื่นๆ โดยมีลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ไว้ 2 แห่ง คือ ส่วนของ Replication initiation motif และ NTP-binding and helicase domain motif ส่วน ORF1 คาดว่าจะเป็นยีนที่สร้างโปรตีนของ Non-structural protein (NS-2) ซึ่งยังไม่รู้หน้าที่ สำหรับ ORF3 เป็นยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้ม (capsid protein, VP) ของไวรัส เนื่องจากมี PGY motif อยู่ปลายอะมิโนและมี phospholipase A2 motif ซึ่งพบในพาร์โวไวรัส สัตว์มีกระดูกสันหลังและในแมลง การจัดเรียงตัวของยีนบนจีโนมเป็นแบบ monosense genomic organization ยีนของ NS1 และ NS2 ซ้อนทับกันอยู่ทางซ้าย ส่วนยีน VP อยู่ทางขวาของจีโนมและสร้างจาก ORF3 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ปลาย 3' และ 5' ของดีเอ็นเอของไวรัส ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ใช่ยีน ปรากฏว่ามีลำดับเบสที่เป็น Palindrome sequence ขนาด 6-8 นิวคลีโอไทด์ซึ่งมีความสำคัญต่อการลอกแบบดีเอ็นเอของไวรัส และมี Direct repeat สายสั้นๆ

เหมือนกับพาร์โวไวรัสบางชนิด จากการสร้าง Phylogenetic trees พบว่าไวรัส HPV มีความใกล้ชิดกับพาร์โวไวรัสที่พบในกิ้งและแมลง คือ IHNV, Aa/DNV และ AaeDNV นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนในส่วนของยีน NS1 มีความเหมือนเล็กน้อยกับ I-FLICE และ FLAME ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งเอนไซม์ caspase ใน *Homo sapiens* และจาก SDS-PAGE พบโปรตีนหลักขนาด 57 กิโลดาร์ตัน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโปรตีนที่ได้จากการแปลรหัส คาดว่าอาจมี Proteolytic cleavage ของโปรตีนขนาดใหญ่หรือเกิดจากการ splicing ของยีน

จากการวิจัยครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นการวิเคราะห์ยีนว่ามีความเหมือนกับยีนที่สร้างโปรตีนกระบวนการ apoptosis หรือไม่ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่ามียีนที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการนี้จริงในไวรัส HPV จึงควรมีการวิจัยต่อไปในเซลล์กิ้ง (*in vivo study*) หลังการยับยั้งการแสดงออกของยีนของไวรัส เช่น การใช้ SiRNA แล้วสังเกตดูว่ามีกระบวนการ apoptosis ในเซลล์กิ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV มากขึ้นหรือน้อยลง

เนื้อหางานวิจัย

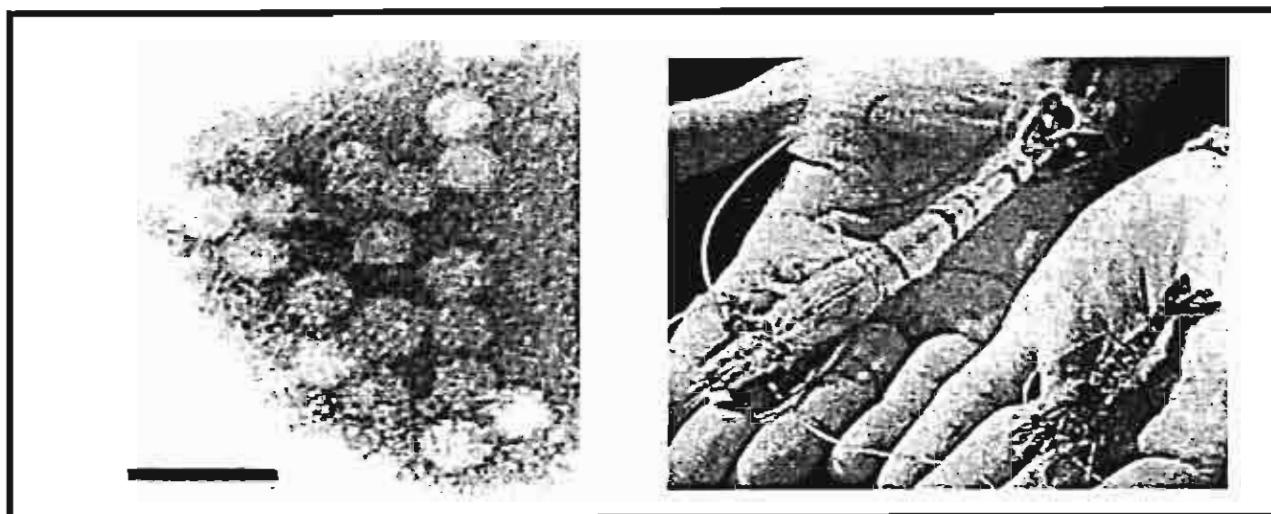
บทนำ (Introduction)

เฮปาโตแพนครีเอติกพาร์โวไวรัส (Hepatopancreatic parvovirus หรือ HPV) เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว อนุภาคไวรัสมีรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (icosahedral) ขนาด 22-24 นาโนเมตร (รูปที่ 1 ก) ไวรัสนี้ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง *Penaeids* หลายสปีชีส์ โดยเฉพาะกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญ ได้แก่ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งแชบ๊วย (*P. chinensis*) และกุ้งก้ามกาม (*Myrobacterium rosenbergii*) เป็นต้น การระบาดของไวรัสชนิดนี้พบในหลายประเทศทั่วโลก (1) สำหรับประเทศไทยการติดเชื้อไวรัส HPV ในกุ้งกุลาดำพบครั้งแรกทางภาคใต้เมื่อปี 2535 (2,3) โดยทั่วไปแล้วกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส HPV มักแสดงอาการที่ไม่จำเพาะ แต่ในระยะที่มีการติดเชื้อรุนแรงกุ้งมักมีอาการโตช้าหรือแคระแกร็น (1) เกษตรกรมักเรียกกุ้งนี้ว่า “กุ้งจิกโก” (รูปที่ 1 ข) จากการศึกษาในกุ้งที่โตช้าพบว่าอัตราการติดเชื้อไวรัส HPV (% HPV infection) มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับขนาดของกุ้ง โดยที่กุ้งที่ติดไวรัส HPV จะมีขนาดเล็กกว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัส MBV และ IHNV (รูปที่ 1 ค) ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้กุ้งโตช้า เช่นเดียวกัน (4)

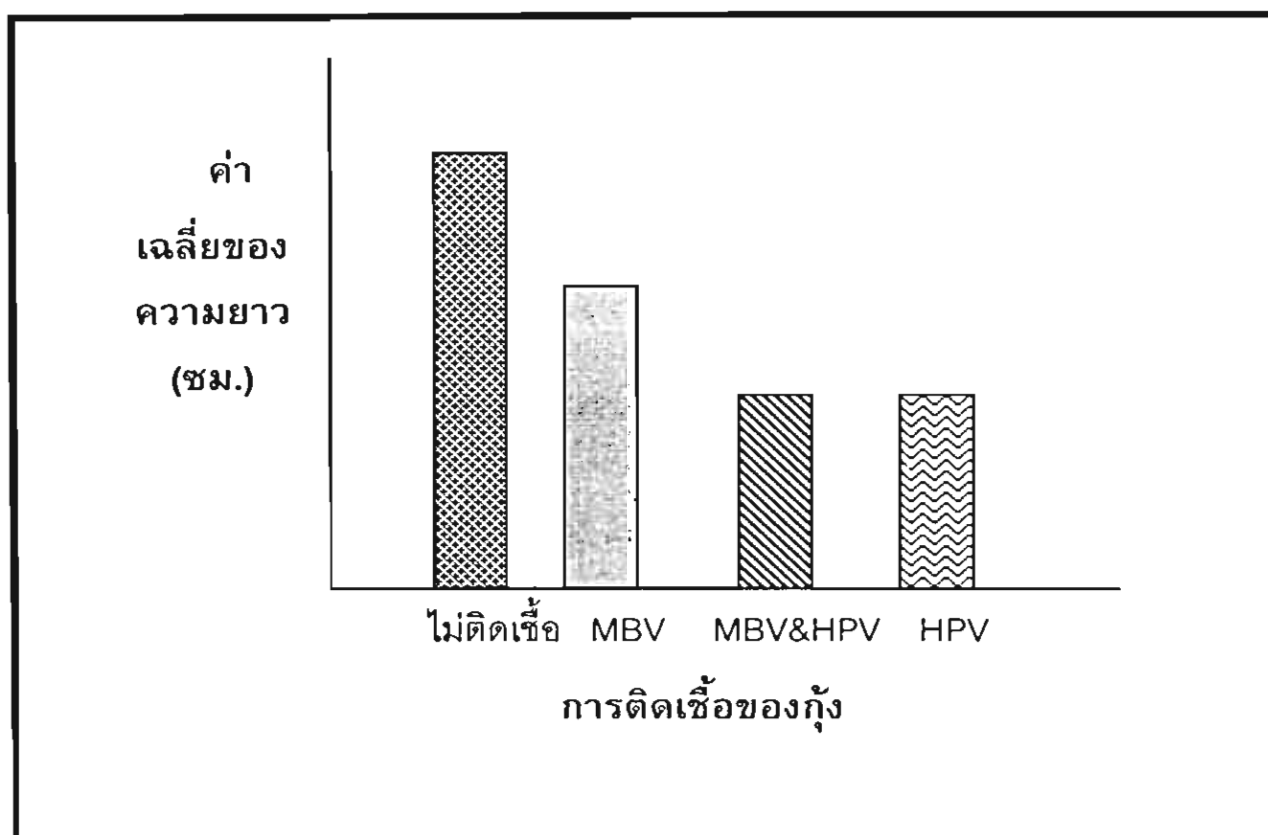
ปกติแล้วเซลล์ของโฮสต์ต่าง ๆ ตั้งแต่เซลล์ของแมลงไปจนถึงเซลล์ของคน สามารถป้องกันตัวเองจากการติดเชื้อไวรัสได้โดยการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis เซลล์ของโฮสต์ที่ตายจากกระบวนการนี้จะกลายเป็นชิ้นอยู่ใน membrane-bound apoptotic bodies และจะถูกกินโดย macrophage หรือเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงโดยไม่เกิดการอักเสบ ทำให้สามารถกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสออกได้อย่างรวดเร็ว (5, 6, 7) มีไวรัสหลายชนิดที่กระตุ้นกระบวนการ apoptosis ได้แก่ Chicken anemia virus (8), HIV-1 (9-10) และ Rabies virus (11) อย่างไรก็ตามยังมีไวรัสบางชนิดที่สามารถยับยั้งกระบวนการ apoptosis ในเซลล์ได้ ตัวอย่างเช่น ไวรัสที่เป็นสมาชิกของ *Baculoviridae* (12-14), *Herpesviridae* และ *Adenoviridae* families ได้แก่ Cowpox virus (15), Adenovirus (16), Herpesvirus (17) และ Epstein-Barr virus (18, 19) จากการศึกษาพบว่าในจีโนมของไวรัสเหล่านี้มียีนซึ่งสร้างโปรตีนที่สามารถยับยั้งกระบวนการ apoptosis ในเซลล์ได้ เรียกว่า apoptotic inhibitor (ตารางที่ 1)

ก

ข



ค



รูปที่ 1 ลักษณะและรูปร่างของอนุภาคไวรัส HPV และภาพของกึ่งปกติและกึ่งที่ติดเชื้อ HPV
 (ก) ลักษณะและรูปร่างของอนุภาคไวรัส HPV (bar = 50 nm) (ข) แสดงภาพของกึ่งปกติและกึ่งที่ติดเชื้อไวรัส HPV (ค) การเปรียบเทียบขนาดของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัส HPV กับกึ่งปกติ กึ่งที่ติดเชื้อ MBV และการติดเชื้อร่วมระหว่างไวรัส HPV กับ MBV

ตารางที่ 1 แสดงตัวยับยั้งกระบวนการ apoptosis ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (6)

Physiologic inhibitors	Viral genes	Pharmacological agents
1. Growth factor	1. Adenovirus <i>E1B</i>	1. Calpain inhibitor
2. Extracellular matrix	2. Baculovirus <i>p35</i>	2. Cysteine protease inhibitor
3. CD40 ligand	3. Baculovirus <i>IAP</i>	3. Tumor promoters
4. Neutral amino acids	4. Cowpox virus <i>crmA</i>	-PMA
5. Zinc	5. Epstein-Bar virus BHRF1, LMP-1	-Phenobarbital
6. Estrogen	6. African swine fever virus LMW5-HL	- α -hexachloro-
7. Androgens	7. Herpesvirus γ 1 34.5	cyclohexane

จากตารางที่ 1 Baculovirus มียีนที่ยับยั้งกระบวนการ apoptosis มี 2 ชนิด คือ *p35* และ *IAP* (Inhibitor of apoptosis) ซึ่งยีน *p35* สร้างโปรตีน P35 ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase ซึ่งเป็น cysteine protease และเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการ apoptosis (12,13) ดังนั้นเซลล์ของโฮสต์ที่ติดเชื้อไวรัสจะไม่ถูกทำลายจากกระบวนการนี้ นอกจากนี้แล้วโปรตีน P35 นี้ยังสามารถยับยั้งกระบวนการ apoptosis ที่กระตุ้นโดยสิ่งเร้าอื่นๆ อีกหลายชนิด (20) ได้แก่ Actinomycin D (5,8) รังสี X-ray สารที่เป็น tumor necrosis factor และ Fas-mediated apoptosis (20) และ growth factor (21)

สำหรับกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อไวรัส HPV มักไม่ตายแต่โตช้าหรือแคระแกร็น อาจสันนิษฐานได้ว่าไวรัส HPV อาจมียีนที่สามารถสร้างโปรตีนยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของกิ้งได้เช่นเดียวกับไวรัสอื่นๆ และโปรตีนที่สร้างขึ้นนี้อาจมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของกิ้งด้วย เช่น อาจมีผลต่อการควบคุมการสร้างและหลั่งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ (molting hormone) ของกิ้ง ได้แก่ ฮอร์โมน ecdysteroid (22) หรืออาจมีผลกระทบต้อปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการหลั่งฮอร์โมนเหล่านี้

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ในพาร์โวไวรัสอื่นๆ ที่อยู่ใน *Parvoviridae* family เช่นเดียวกับไวรัส HPV นั้นพบว่า *Parvovirus* H1 (23, 24) และ B19 (25) สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ได้ โดยไปกระตุ้นเอนไซม์ caspase ซึ่งจะทำหน้าที่ตัดเอนไซม์ Poly (ADP-ribose) polymerase และเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างซึ่งเป็นลักษณะของ apoptosis (24,25) นอกจากนี้ยังมีรายงานใน parvovirus B19 ว่า โปรตีน Bcl-2 ของเซลล์โฮสต์สามารถป้องกันการตายของเซลล์ที่เนื่องมาจากการเหนี่ยวนำโดย Nonstructural protein (NS1) ของไวรัสได้ (25)

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการ apoptosis กับ การเจริญเติบโตนั้น ได้มีการศึกษาในแมลง *Manduca sexta* พบว่าการลดลงของฮอร์โมนลอกคราบ เช่น 20-hydroxyecdysone จะกระตุ้นกระบวนการ apoptosis (26) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการหลั่ง

ฮอร์โมนลอกคราบและการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis เช่น การเพิ่มปริมาณของ apolipoprotein III (apop-III) (27) ปริมาณของตัวดักจับ 20-hydroxyecdysone (28) และการเหนี่ยวนำวิถีของ ubiquitin conjugation (29) เป็นต้น และจากการศึกษาในกิ้ง *Penaeus japonicus* พบว่าการสร้างและหลั่งฮอร์โมนลอกคราบ (ecdysteroid) มีความสัมพันธ์กับการสร้างและหลั่งฮอร์โมน molt-inhibiting hormone (MIH) (30)

เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งกระบวนการ apoptosis และการยับยั้งการเจริญเติบโตของกิ้งโดยไวรัสยังไม่มีรายงานการศึกษา ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ในไวรัส HPV ซึ่งเป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กและมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวขนาดของจีโนม ประมาณ 6 กิโลเบส เท่านั้น โดยมีจุดประสงค์ที่จะหาลำดับเบสทั้งหมดของไวรัสเพื่อนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างของจีโนมและหายีนทั้งหมด โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนยับยั้งกระบวนการ apoptosis ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานและมีประโยชน์ในการทำ expression ของโปรตีนนี้ออกมาศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งกระบวนการ apoptosis นอกจากนี้แล้วการหาลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนยับยั้งนี้จากไวรัส HPV ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนยับยั้งกระบวนการ apoptosis จากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อาจทำให้ทราบถึงกลไกการยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของไวรัส HPV ในกิ้งกุลาดำได้

วิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างก้าง

เก็บตัวอย่างก้างกระดูกดำจากบ่อเลี้ยงที่มีลักษณะแคระแกร็นหรือที่ชาวบ้านเรียกว่าก้างจิกโก่ อายุระหว่าง 2-4 เดือน ประมาณ 2,000 ตัว จากจังหวัด ปัตตานี นครปฐม ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และราชบุรี แยกเอาตัวออกใส่ในไนโตรเจนเหลวหรือน้ำแข็งแห้งทันที จากนั้นนำตัวก้างไปเก็บไว้ในตู้เย็น -70°C จนกว่าจะใช้

การสกัดไวรัสจากตัวก้าง

ทำการสกัดไวรัสออกจากเซลล์ของตัวก้าง ตามวิธีของ Sukhumsirichart *et al.*, 1999 ดังนี้ นำตัวก้างประมาณ 80 ตัวมาบดให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ NTE (0.2 M NaCl, 0.02 M Tris, pH 7.4, 0.02 M EDTA) ปริมาตร 40 มล. โดยใช้เครื่องบดมือถือ (Hand homogenizer) จากนั้นทำการแยกเศษเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงใน SS 34 rotor, Sorvall RC 5 C Plus ที่ 4°C 2 รอบๆ ละ 15 นาที ที่ความเร็ว 7,000 และ 13,000 รอบต่อนาที ตามลำดับ เก็บส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอด Quick-seal (Sorvall tube No. 03987) นำไปปั่นที่ $140,000\times g$ หรือ 46,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Sorvall RC) เก็บตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ NTE ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการละลายตะกอนตลอดทั้งคืนในห้องเย็น จากนั้นเตรียมสารละลายของ ยูโรกราฟิน (urografin) ที่มีความเข้มข้น 20%-40% ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณของละลายยูโรกราฟิน และบัฟเฟอร์ NTE ในการเตรียม gradient ในช่วง 20%-40% ปริมาตรทั้งหมด 5 มล.

หลอดที่	%ความเข้มข้น ของ ยูโรกราฟิน	ปริมาณของสารละลาย ยูโรกราฟิน เข้มข้น 76% (มล.)	ปริมาณของบัฟเฟอร์ NTE (มล.)
1	40%	3.158	2.842
2	35%	2.763	3.237
3	30%	2.369	3.631
4	25%	1.974	4.026
5	20%	1.580	4.420

ปีเปตสารละลายยูโรกราฟีนที่มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 20%-40% ใส่หลอด Sorvall Ultra Pro 80 โดยแต่ละความเข้มข้นใช้สารละลายยูโรกราฟีนปริมาตร 1.6 มล. ทั้งสารละลายไว้ในห้องเย็นตลอดทั้งคืน เพื่อให้เกิด continuous gradient จากนั้นนำสารละลายไวรัส ปริมาตร ประมาณ 1 มล. มาหยุดชั้นบนสุดของ gradient แล้วนำไปปั่นโดยใช้ swinging rotor (Sorvall TH 641 rotor) ที่ความเร็ว 140,000xg หรือ 34,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 45 นาที แยกเอาแต่ละ fraction ออกมาแล้วใส่ในหลอด Ultra Pro 80 แล้วเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ NTE นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็วเท่าเดิม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างสารละลายยูโรกราฟีนออก เก็บตะกอนไวรัสมาละลายในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 1 มล. จากนั้นแบ่งสารละลายของไวรัส ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. แล้วนำไปเก็บในตู้เย็น -70°C

การสกัดดีเอ็นเอของไวรัส

นำสารละลายไวรัสปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ Proteinase K (ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) นำไปอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปอุ่นต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อย่อยโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ จากนั้นสกัดเอาโปรตีนออกจากสารละลายโดยใช้สารละลายผสมระหว่าง Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (24:1:1) นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัด 2 ครั้ง นำส่วนใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้สารละลาย 3 M NaOAc, pH 5.2 (1/10 เท่า) และ Absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอและละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C

การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัสที่สกัดได้

1. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอของไวรัสที่เตรียมได้ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์โดยอิเล็กโทรโฟรีซิส บนวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1% ที่ 100 โวลต์ โดยใช้ λ Hind III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker)

2. การตรวจดีเอ็นเอการติดเชื้อโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

ทำการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HPV จากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัส HPV เท่านั้น คือ 'ไพรเมอร์ 156F (5'...GCA CTT ATC ACT GTC TCT AC ...3') และ 276R (5'...GTG AAC TTT GTA AAT ACC TTG...3') ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ขนาด 156 เบส ทำ PCR ในสารละลายผสม

ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอของไวรัส (1 ไมโครลิตร), 1x PCR buffer, (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.01% {w/v} gelatin), 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 0.1 μ M primer แต่ละตัว และ *Taq* DNA polymerase 2 Units ทำ PCR จำนวน 30 รอบ โดยมีสภาวะดังนี้ Pre-denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 52 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที นำผลผลิต PCR ที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลเข้มข้น 1.5% และใช้ 100 bp Ladder DNA เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

การโคลนนิ่งและการคัดเลือก viral specific DNA fragment

1. การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (DNA library)

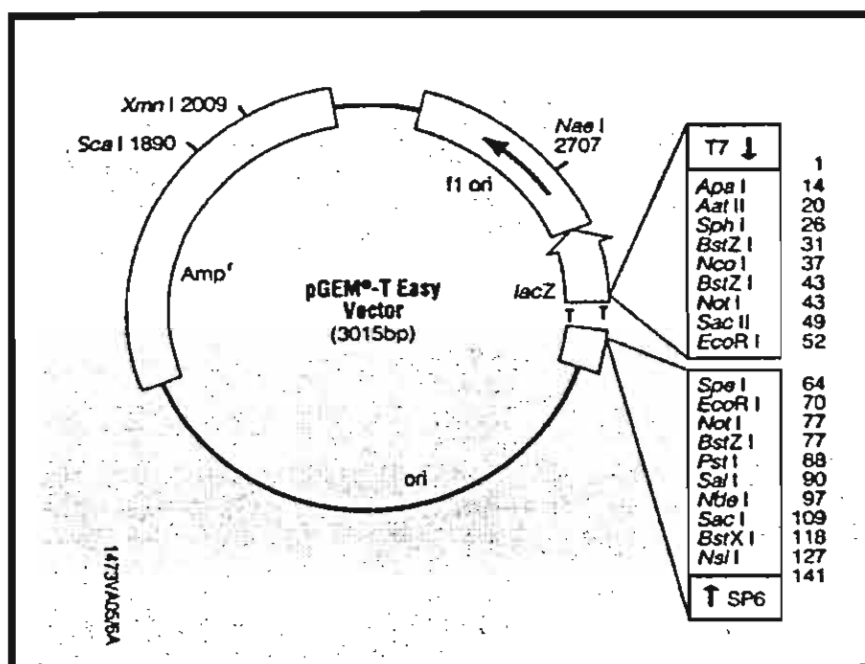
นำดีเอ็นเอของไวรัส HPV มาสร้างเป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ (complementary strand) โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase (Klenow fragment) และ hexamer จากนั้นนำไปสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น *Sua* 3A/ แล้วเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC 18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sua* 3A/ เช่นเดียวกัน โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (29) และทำ Transformation เข้าเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น *E.coli* JM 109 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้ Ampicillin (100 μ g/ml), 2% 5-bromo-4-chloro-3-indol-galactoside (X-gal) และ 1 mM Isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ทำการสกัดดีเอ็นเอสายผสมออกแล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอของ HPV ที่ติดสลาด้วย Digoxigenin-dUTP เลือก clone ที่สามารถไฮบริไดซ์ได้ดีกับดีเอ็นเอของ HPV แต่ไม่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอของกุง เพื่อนำไปหาลำดับเบส

2. การโคลนนิ่ง Full length-length genome ของ HPV

เพื่อที่จะนำดีเอ็นเอของไวรัส HPV เกือบทั้งจีโนมมาเชื่อมต่อเข้าดีเอ็นเอพาหะโคลนเข้าแบคทีเรีย แล้วนำไปหาลำดับเบสอีกครั้งหนึ่ง เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับเบสของจีโนมไวรัส HPV ที่หามาก่อนแล้ว วิธีการทำได้ดังนี้ นำดีเอ็นเอของ HPV มาทำการเพิ่มได้โดยขยายโดย PCR และใช้ไพรเมอร์ที่อยู่ตรงปลายของ 5 และ 3' ของจีโนมไวรัส ซึ่งข้อมูลได้มาจากการหาลำดับเบสของจีโนมไวรัสโดยการทำ primer walking มาก่อนแล้ว ปฏิบัติการทำ PCR ประกอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งสามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวได้ คือ Expand Long Template PCR system (Roche) ไพรเมอร์ที่ใช้ คือ HPV6 และ HPV 12 ซึ่งสามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอขนาดประมาณ 6 กิโลเบส ดีเอ็นเอของไวรัส HPV ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของการทำ PCR ได้จากอำเภอนนทบุรี จังหวัดชลบุรี จากนั้นทำ PCR ดังนี้ Pre-heat ที่ 94°C เป็นเวลา 2' จำนวน 1 รอบ ตามด้วยการทำ PCR อีก 10 รอบ โดยมี Condition ดังนี้ Denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 10 วินาที

Annealing ที่ 48°C เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 68°C เป็นเวลา 8 นาที 10 วินาที ตามด้วยการทำ PCR อีก 20 รอบ ดังนี้ Denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 10 วินาที, Annealing ที่ 48°C เป็นเวลา 30 วินาที, Extension 68°C , 10 วินาที และท้ายสุดทำ PCR อีก 1 รอบที่ 68°C เป็นเวลา 7 นาที

นำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แยกแถบ ดีเอ็นเอออกจากเจล เติมปลาย Blunt-end ของ PCR product ด้วยเบส A โดยใช้ pGEM-T cloning kit (Promega) จากนั้นโคลนเข้า pGEM-T vector ทำ Transformation เข้าแบคทีเรีย STBL2 ที่ 28°C เป็นเวลา 42 ชั่วโมง บน agar plate สกัดดีเอ็นเอสายผสมโดยเลี้ยงแบคทีเรียใน TB broth เป็นเวลา 25 ชั่วโมงครึ่ง ที่ 28°C



รูปที่ 2 pGEM-T vector ที่ใช้ในการโคลนนิ่ง full-length genome ของ HPV

3. การโคลนนิ่งผลผลิต PCR (Cloning of PCR product)

ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนของ Non-structural protein (NS1 และ NS2) และ Structural protein (capsid protein, VP) ของไวรัส ได้แก่ HNS1F/HNS1R, HNS2F/HNS2R และ HPV-F-KPN/HPV-R-HND ซึ่งจะได้ผลผลิต PCR ขนาด 1.7, 1.3 และ 2.5 กิโลเบส ตามลำดับ จัดขึ้นดีเอ็นเอเหล่านี้จากเจล ทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T และนำไป Transformation ในแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคโลนีสีขาว แล้วนำไปสกัดเอาดีเอ็นเอสายผสม

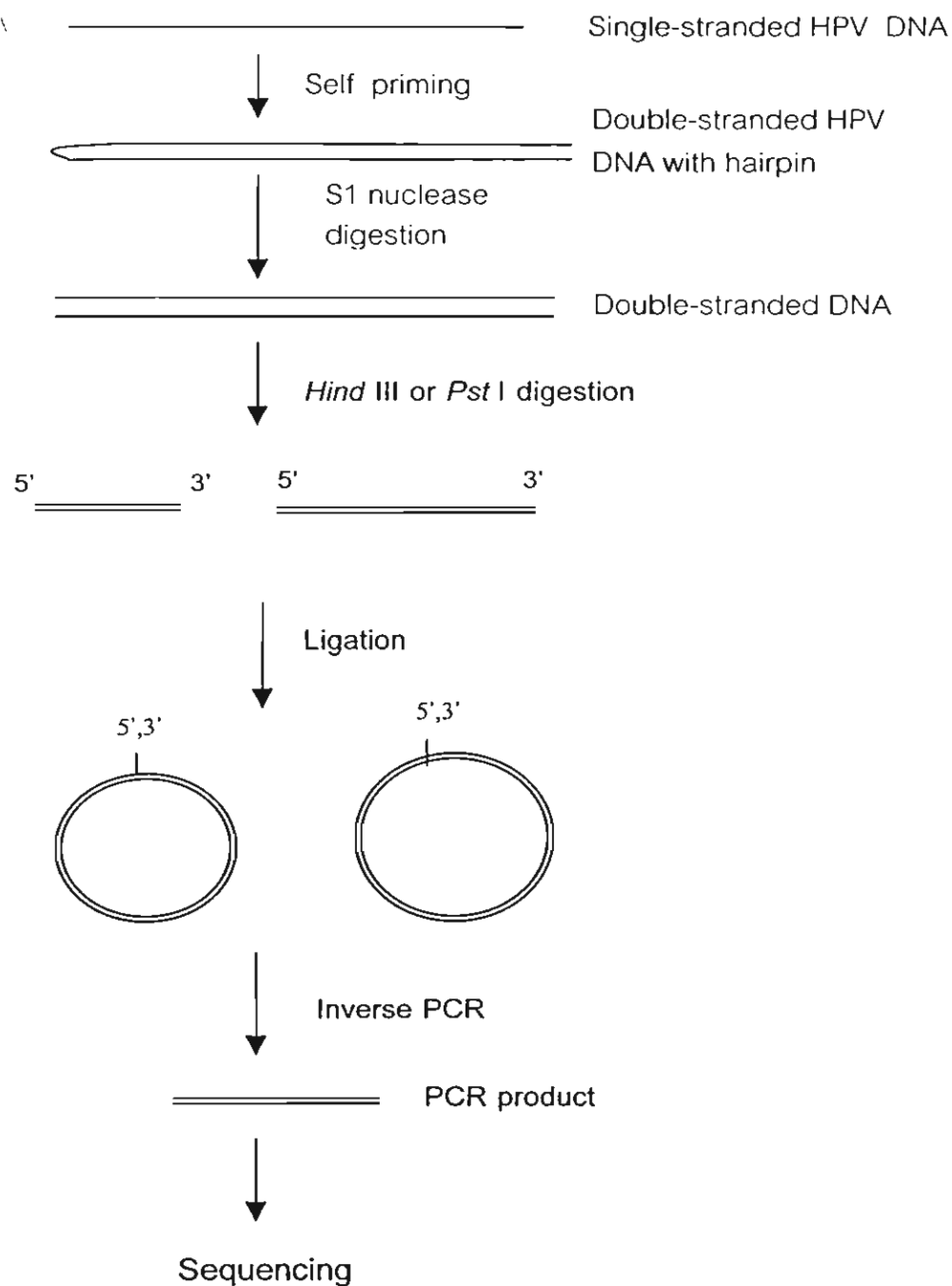
4. การโคลนนิ่งและการคัดเลือก viral specific DNA fragment ที่ปลาย 3'

4.1 การโคลนนิ่งปลาย 3' ของจีโนมไวรัส เพื่อหาลำดับเบสที่ปลาย 3'

นำดีเอ็นเอของไวรัส HPV มาสร้างเป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ (Complementary strand) โดยการทำให้ Self-priming ดังนี้ ดีเอ็นเอของไวรัส 4 ไมโครลิตร 200 μ M dNTP เอนไซม์ DNA polymerase (Klenow fragment) ปริมาตร 2 Units ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอเส้นคู่ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ (pUC 18) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III เช่นเดียวกัน โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (Biolabs) และทำ Transformation เข้าเซลล์ของแบคทีเรีย (*E. coli* JM 109) เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Ampicillin (100 μ g/ml), 2% 5-bromo-4-chloro-3-indol-galactoside (X-gal) และ 1 mM Isopropyl-D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) คัดเลือกโคโลนีสีขาวและนำไปสกัดดีเอ็นเอสายผสมออกมา

4.2 การทำ Inverse PCR

ในการหาลำดับเบสที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอไวรัส HPV โดยวิธีนี้ทำได้โดยการสร้างดีเอ็นเอเส้นคู่เสียก่อนโดยเทคนิค Self-priming จากนั้นได้ตัดดีเอ็นเอเส้นคู่ด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Pst* I (ซึ่งตามลำดับเบสที่มีข้อมูลแล้วจะตัดดีเอ็นเอของไวรัสที่ตำแหน่ง 1,324 และ 1,592 ตามลำดับ) เชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ T4 ligase (Biolabs) ที่ 16°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เชื่อมกันแล้วมาทำ Inverse PCR โดยใช้ไพรเมอร์ P8352 และ P 3829 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ใน 25 ไมโครลิตร มีดังนี้ ดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้ว (ligated product) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 10xPCR buffer, 2 mM $MgSO_4$, 200 μ M dNTP, 0.2 μ M ไพรเมอร์แต่ละตัว (P.8532, P.3829), 0.5 unit *Taq* DNA polymerase (*Vent*TM, Biolabs) ทำปฏิกิริยาที่สภาวะดังนี้ Pre-denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่ 45 °C เป็นเวลา 45 วินาที และ Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิต PCR ที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (1.5% gel)



ss = single-stranded DNA db = double stranded DNA

รูปที่ 3 แผนภาพขั้นตอนการทำ Inverse PCR ดีเอ็นเอของไวรัส HPV

นำดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant plasmids) ที่ถูกคัดเลือกไปหาลำดับเบส ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (Automate sequencer) จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Oligo 4s นำไปใช้ในการหาลำดับเบสโดยใช้จีโนมดีเอ็นเอของไวรัสเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากข้อมูลลำดับเบสที่ได้รับมาแต่ละครั้งได้นำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์และใช้ในการหาลำดับเบสต่อไปเรื่อยๆ จนได้ลำดับเบสที่ปลาย 5' ทั้งหมด ซึ่งเรียกรวีกการหาลำดับเบสแบบนี้ว่า Primer walking จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดมาเชื่อมต่อกัน ทำการออกแบบไพรเมอร์ตรงตำแหน่ง ปลาย 5' และปลาย 3' เพื่อเพิ่มขยาย Full-length gene ของไวรัส HPV และนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบ โดยปกติทำการหาลำดับเบสแต่ละช่วงอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อแก้ไขข้อมูลลำดับเบสที่ไม่ชัดเจน และเพื่อความถูกต้องของลำดับเบสที่ได้ สำหรับไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการหาลำดับเบสของจีโนมไวรัส HPV แสดงในตารางที่ 3

การวิเคราะห์ลำดับเบส

นำข้อมูลลำดับเบสมาต่อกันจนได้สายยาวแล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อหาข้อมูลต่างๆ ดังตารางที่ 4 เช่น Open reading frame (ORF), Promoter, Start/Stop codon, ยีนต่าง ๆ, การเปรียบเทียบความเหมือน/ความแตกต่าง ของยีนของไวรัส HPV กับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank (Homology search) (46-48), Secondary structure ของ non-coding sequence ที่ปลายทั้งสอง และเอนไซม์ที่สามารถตัดสายดีเอ็นเอได้ (Restriction enzyme map) เป็นต้น ซึ่งโปรแกรมและแหล่งของโปรแกรม(Severs) แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบสของ HPV โดยวิธี primer walking

รหัสของไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'ไป 3')	Melting Temperature (T_m), °C
121F	GCA CTT ATC ACT GTC TCT AC	58
276	GTG AAC TTT GTA AAT ACC TTG	56
64	TGG TTG TGT TCT GAT GTG AC	58
368	GAC AAC ATA TCC AAG AGC GA	58
HPV-3820	GAC AAT GAA TAT CCA GAC AA	54
HPV-3829	GTA ATT GTT TGT GAT GGA	49
HPV-3881	CTA TGG GAG GAC CTG GGA	58
HPV-3903	GAG AAG TTG AAC ATC CTG	52
HPV-4155	CGA AGC TCT AAC TGG ATT	52
HPV-4190	CACTTGAACATATATGGAC	58
HPV-4261	AGA AGA ACT CGG GGC TAT	54
HPV-4410	GCAATAGAAGCAGCACCA	58
HPV-4531	TGGTGCTGCTTCTATTGCC	63
HPV-4563	CAGGATGTTCAACTTCTCA	54
HPV-4564	CTGTCCATATAGTTCAAGTG	51
HPV-4565	TCTCCATCACAAACAATTAC	54
HPV-4614	TGCGGCGGCGGAAGATAC	60
HPV-5164	AGA GAA GGA AGG AGA TAC	47
HPV-5508	AGA GAA GGA AGG AGA TAC	56
HPV-8352	CGA TGA ACC ACC AAA GAT	54
HPV-8550	CAA GGT ATT TAC AAA GTT	54
HPV-8657 (HPV 1)	TAC GAC GAA ATA TAC GCA G	60
HPV-8658 (HPV 2)	ACA CAC AGA GAC GCA TAA TTC	54
HPV-8659 (HPV 3)	CAA ACT TTA TGA CAT GCT GT	58
HPV-8660 (HPV 4)	TCC ACT CCG ACG TAC TTG	48
HPV-8661 (HPV 5)	ATG ACT GTT GTT AAG ACT	48

HPV-8975 (HPV 7)	AAG GGT AAA CCA CGC ACG	58
HPV-8976 (HPV 8)	TGG TCG AGC AGT GAA GTT C	56
HPV-8977 (HPV 9)	TTC TCC ATC ACA AAC AAT TAC	58
HPV-8978 (HPV10)	GCG ATG TCT TCT GTA GTC C	54
HPV-9782 (HPV11)	TCT CCT TCC TTC TCT TTA TA	60
HPV-9852 (HPV12)	GAT CTG GAT AGT ATA CGT GTC	56
HPV-9853 (HPV14)	GAA TTC GTG AAC TTT GTA AAT AAC TTG	56
HPV 9854 (HPV15)	GAA TTC TTC TCC ATC ACA AACAAT TAC	56
HPV12940 (HPV16)	GAA TTC TAT CAC TTT ATT GTTGCC CG	58
HPV12941 (HPV17)	ACG ATG AGC CAG CCA ACA ACCA ACA A	56
HPV 13406(HPV18)	GAG ATA TTA AGC ACA GTT TC	58
HPV 17616(HPV19)	TGG AAT GAA TCG CTG GGG T	48
HPV 17678(HPV20)	TTGCGTATATTCGTCGTA	53.4
HPV 17679(HPV21)	GTAGAGACAGTGATAAGTGC	53.4
HPV10799 (VP1)	CTTCTCTGTGCATATGCTCT	
	GCT AGG GGA TCC CAT ATG GAA ACT TCT GAA	56
HPV10800 (VP2)	TCA GG	
	GCT AGC GGA TCC CAT CTA TATTC TTC TTC	56
	TTC TTC	
HNS1-F	GGGGTACCATGTTTCGCCAGGTAATGAA	64
HNS1-R	GCGTCGACTTAGCTGTCCTCAAACAGC	65
HNS2-F	GGGGTACCATGCTAACCATGAAGGAGGA	65
HNS2-R	GCTGCAGCTTACCTGGCGAAACATTTTAC	64

ตารางที่ 4 แสดงโปรแกรมและ Servers ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีโนมไวรัส HPV

โปรแกรมวิเคราะห์	รายการวิเคราะห์	Server/address
BLASTn, BLASTp	Homology and similarity	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ORF finder (BLAST)	searches	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
BCM Search	Open reading frame (ORF)	http://dot.imgt.bcm.edu:9331/s
Launcher	ORF, restriction mapping	eq-util.html
CLUSTAL W	Multiple sequence alignment	http://searchlauncher.bcm.jmc.edu/cgi-bin/multi-align.pl
CLUSTAL X	Multiple sequence alignment	http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph-
NetOGlyc 2.0	Glycosylation	webface?jobid=netOgly3B3FFE
Phylip	Phylogenetic tree	DC00DBF651&opt=wait http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phylip_uk.html
GCG	Alignment, ORF, Translation, DNA secondary structure, Phylogenetic tree	
DNAsis	Translation, Restriction mapping, Motif, Base composition	
DNA-STRIDER	Genome organization, Restriction mapping, Translation, Motif	
Clone manager	Genome organization, Restriction mapping, repeat sequence analysis, promoters	
	Promoter, ORF, Restriction enzyme analysis, Repetitive sequence	

การวิเคราะห์โปรตีนโดย SDS-PAGE และการทำ Western blotting

1. การทำ SDS-PAGE

นำสารละลายไวรัสปริมาณ 100 ไมโครลิตร ไปทำการระเหิดเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของไวรัสและโปรตีน เติมน้ำปริมาณ 7 ไมโครลิตร มาใส่ในสารละลาย protein buffer ที่ทำให้เซลล์แตกและทำให้โปรตีนมีประจุลบ ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM EDTA, 2% SDS, 1% β -mercaptoethanol นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำอิเล็กโทรฟอรีซิสบนวุ้น polyacrylamide เข้มข้น 12% (35) ที่ 100 volts โดยใช้ Protein marker เป็นโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย bovine serum albumin (MW 66 kDa), glutamic dehydrogenase (56 kDa), maltose-binding protein (43 kDa), lactate dehydrogenase (36 kDa), triose phosphate dehydrogenase (27 kDa) นำเจลไปย้อมด้วยสาร Coomassie brilliant blue หรือ silver stain

2. การถ่ายแถบโปรตีนลงบนแผ่น PDVF

เพื่อนำแถบของโปรตีนบน polyacrylamide gel ถ่ายไปบน PVDF membrane เพื่อนำไปหากรดอะมิโนที่ปลายอะมิโน (N-terminal sequencing) โดยใช้เทคนิค Western blotting (31) และเครื่อง Western blotting apparatus (Hoffer company)

3. การหา N-terminal amino acid sequence

หา N-terminal amino acid sequence โดยเครื่อง Automated amino acid sequencer

การโคลนนิ่งยีนของ NS1

ทำการยีนเพิ่มปริมาณยีน Non-structural gene (NS1) ของไวรัส HPV ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ I-FLICE และ FLAME โดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เพื่อที่จะโคลนนิ่งยีนเข้า expression vector แล้วนำไปทำการแสดงออกของยีนและนำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งการเกิด apoptosis ในก้างต่อไป

ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอของยีน NS-1 สำหรับยีน NS1 ใช้ไพรเมอร์ NS-1F 5'...GCGTCGACTTAGCTGTCCTCAAACAGC...3' และไพรเมอร์ NS-1R 5'...GGGGTACCATGCTAACCATGAAG GAGGA...3' ผลผลิต PCR ที่ได้ขนาด 1.7 กิโลเบส นำไปเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector และนำเข้าแบคทีเรีย *E.coli* DH5 α ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสม แล้วสกัดดีเอ็นเอออกมาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสและ PCR ตัดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* R I นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับ pQA30 expression vector

การทดสอบการยับยั้งการเกิด apoptosis ใน fibroblast cell line ของหนู

เลี้ยงเซลล์ fibroblast cell line ในน้ำเลี้ยง RPMI จนเต็มจานเพาะเลี้ยง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 3 ครั้ง เติม 1 M H_2O_2 จำนวน 4 มล. ลงไปอุ่นที่ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำสารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอ (DNAzol, Gibco™) จำนวน 1 มล. ผสมให้เข้ากัน เพื่อให้เซลล์แตกได้มากที่สุด จากนั้นเติม Absolute ethanol นำไปปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol ปั่น และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ประมาณ 50 ไมโครลิตร) ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอว่ามี DNA fragmentation หรือไม่ โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำสารละลายไวรัส มาทำให้เซลล์แตก โดยการ freeze-thaw จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปใส่ใน cell line ที่ใส่ 1 โมล ไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์นำไปอุ่นที่ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 30 นาที ใส่สารละลายสกัดดีเอ็นเอ (DNAzol) ปริมาตร 1 มล ทำการสกัดและวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอปกติ

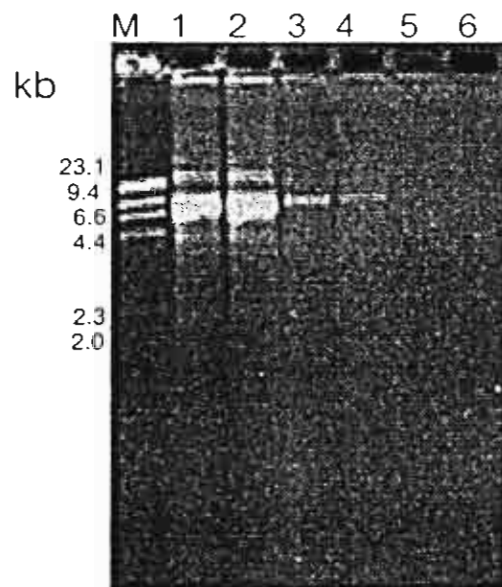
การทดสอบการเกิด apoptosis ใน lymphoid cell ของกิ้งกูดดำเมื่อทำให้ติดเชื้อไวรัส

นำ Primary cell line จาก lymphoid cell ของกิ้งกูดดำ มา infect ด้วยไวรัส HPV โดยใช้ dilution ต่างๆ ของ Viral suspension ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ณ เวลาต่างๆ เก็บเซลล์ที่เวลา day 0 2 4 และ 6 นำ lymphoid cell ของกิ้งกูดดำไปวิเคราะห์ลักษณะของดีเอ็นเอที่ได้ โดย อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ผลการทดลอง

การสกัดอนุภาคไวรัส HPV จากตับกึ่งกุลาดำและการสกัดดีเอ็นเอ

สามารถสกัดเอาอนุภาคไวรัส HPV ออกมาจากตับกึ่งโดยเมื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอแล้วนำไปวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วพบว่าได้ปริมาณไวรัสมากที่สุดใน fraction ที่มีความเข้มข้นของยูโรกราฟิน เท่ากับ 30% และรองลงมาคือทำ 35% โดยที่ปริมาณของไวรัสที่สกัดได้ดูจากปริมาณของดีเอ็นเอขนาด 6 kb (ในรูปที่ 4)



รูปที่ 4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของไวรัส HPV ที่สกัดได้จากชั้นต่างๆ จากการทำ urografin ultracentrifugation โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (1% gel)

แถว M = λ -Hind III DNA

แถวที่ 1 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากชั้นที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 30% (หลอดที่ 1)

แถวที่ 2 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากชั้นที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 30% (หลอดที่ 2)

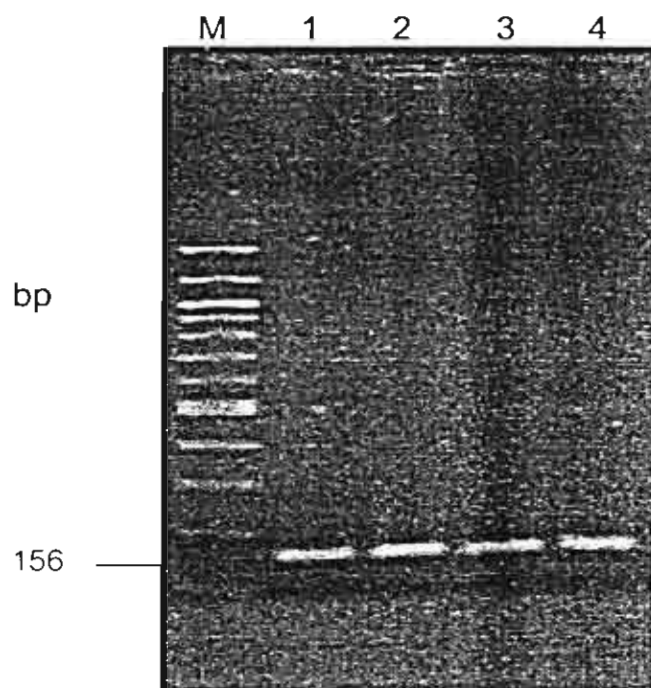
แถวที่ 3 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากชั้นที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 35% (หลอดที่ 1)

แถวที่ 4 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากชั้นที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 35% (หลอดที่ 2)

แถวที่ 5 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากชั้นที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 40% (หลอดที่ 1)

แถวที่ 6 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากชั้นที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 40% (หลอดที่ 2)

จากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 121F และ 276R ปรากฏว่า ได้ PCR product ขนาด 156 bp ซึ่งจำเพาะต่อไวรัส HPV เท่านั้น จึงสรุปได้ว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นของไวรัส HPV จริง ดังแสดงในรูปที่ 5



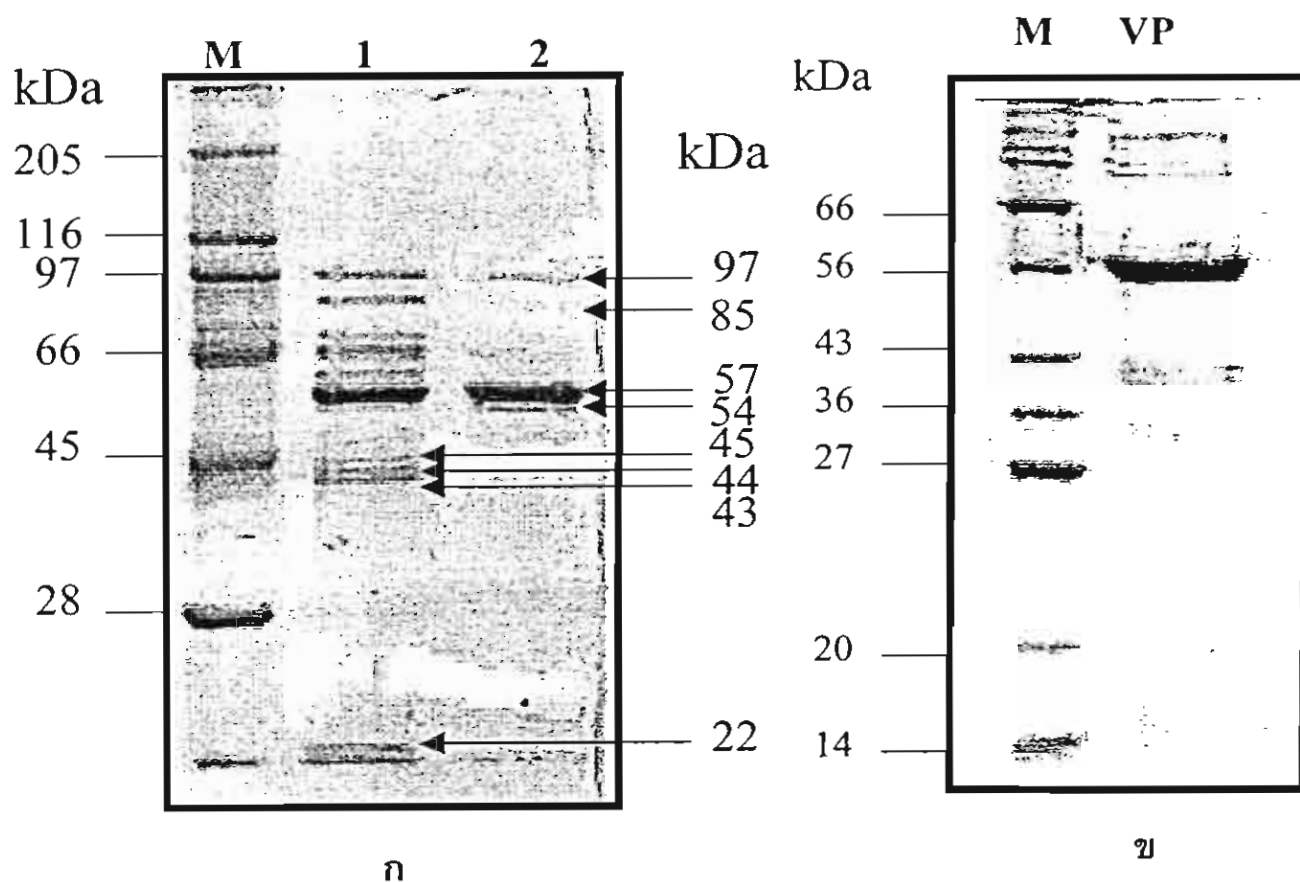
รูปที่ 5 การวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส(1% gel)

แถว M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder DNA)

แถวที่ 1-4 เป็น PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

การวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV

จากการนำเอาโปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV จาก Fraction 30% และ 35% มาวิเคราะห์โดย SDS-PAGE ปรากฏว่า พบแถบโปรตีนหลักอยู่ที่ 57 กิโลดาร์ตัน (kDa) นอกจากนี้ ยังมีโปรตีนขนาดอื่นๆ ปรากฏให้เห็น คือ โปรตีนขนาด 97, 85, 52, 45, 44, 43 และ 22 kDa (รูปที่ 6 ก) แต่โดยทั่วไปแล้วมักจะเห็นแต่โปรตีนขนาด 57 และ 54 kDa อยู่คู่กันโดยแถบโปรตีนขนาด 57 kDa มีปริมาณมากที่สุด (รูปที่ 6 ก และ ข)



รูปที่ 6 การวิเคราะห์ โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE

(ก) แถว M = เป็นโปรตีนมาตรฐาน (Protein marker)

แถวที่ 1 = โปรตีนของไวรัสจากชั้นที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 30%

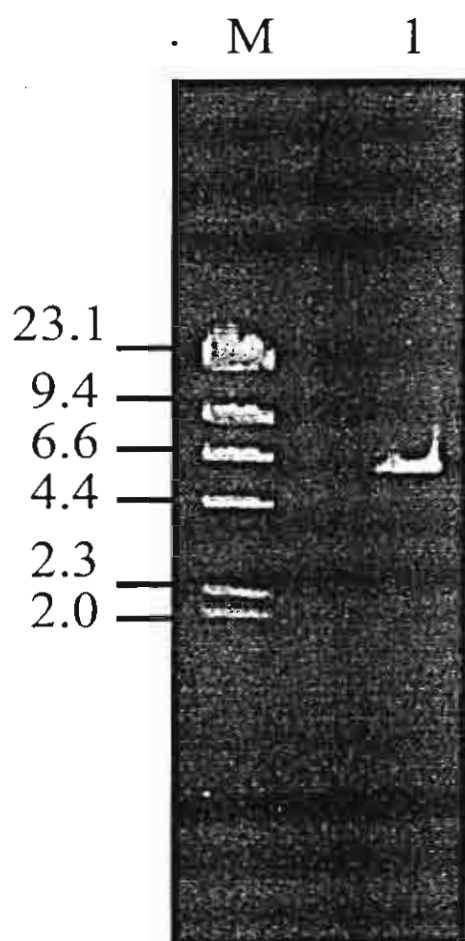
แถวที่ 2 = โปรตีนของไวรัสจากชั้นที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 35%

(ข) แถว M = โปรตีนมาตรฐาน (Protein marker)

แถวที่ VP = โปรตีนของไวรัสจากชั้นที่มีความเข้มข้นของ urografin เท่ากับ 30%

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสมที่มี Full-length gene

หลังจากเพิ่มขยายปริมาณของไวรัสโดยใช้ไพรเมอร์ HPV 6 และ HPV 12 ปรากฏว่า ได้ดีเอ็นเอสายผสม ขนาดประมาณ 6 kb ซึ่งคาดว่าจะครอบคลุมยีนทั้งหมดของไวรัส (Full-length gene) แต่จากการวิเคราะห์หาโปรโมเตอร์ของยีนแล้วปรากฏว่ายังเหลือส่วนของยีนทางปลาย 3' ของจีโนมไวรัสเล็กน้อย จึงได้ทำการหาลำดับเบสที่ปลาย 3' จากดีเอ็นเอสายผสม ที่ได้จากการโคลนนิ่งปลาย 3' สำหรับ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยไพรเมอร์ HPV 6 และ HPV 12 แสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 การวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอของไวรัส HPV โดยไพรเมอร์ HPV 6 และ HPV 12 โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (1% gel)

แถว M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ Hind III DNA)

แถวที่ 1 = PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ลำดับเบสจีโนมของไวรัส HPV

ข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมของไวรัส HPV ได้จากการหาลำดับเบสจากดีเอ็นเอสายผสม และหาจากดีเอ็นเอของไวรัส HPV โดยตรงการทำ Primer walking ปรากฏว่าสามารถหาลำดับเบสได้ทั้งหมด 6,089 เบส ซึ่งครอบคลุมยีนทั้งหมดของไวรัส แต่ส่วนลำดับเบสที่เป็น non-coding sequences ที่อยู่ตรงปลาย 5' และ 3' สามารถหาลำดับเบสได้ 133 และ 75 เบสตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของลำดับเบสของดีเอ็นเอสายลบ (Viral strand) ปรากฏว่ามีส่วนประกอบของเบส A, C, G และ T ดังนี้ 23.67%, 24.17%, 16.46, และ 36.68% ปริมาณเบส G+C เท่ากับ 40.86% และ A+T เท่ากับ 59.35% จากผลนี้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอของไวรัส HPV มี A+T ในปริมาณที่สูงซึ่งก็มีลักษณะคล้ายๆ กับพาร์โวไวรัสในกุ่มและแมลง เช่น IHNV, Aa/DNV, AaeDNV ซึ่งมีปริมาณ A+T เท่ากับ 56.96%, 61.80%, 62.50% ตามลำดับ (36, 37, 38)

การวิเคราะห์หายีน

จากข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของไวรัส HPV จำนวน 6,089 เบส ได้นำไปวิเคราะห์หา Open reading frame หรือ ORF โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์พิเศษ ได้แก่ ORF finder (BLAST), DNAsis, Clone manager, และ GCG เป็นต้น พบว่า จีโนมของไวรัส HPV ประกอบด้วย 3 ORF ใหญ่ๆ (รูปที่ 8) คือ ORF1, ORF2 และ ORF3 ซึ่งมีขนาด 1,287 1,779 และ 2,457 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ยีนเหล่านี้อยู่ระหว่างปลาย 5' และปลาย 3' ที่มีลำดับเบสที่ไม่ใช่ยีน (Non-coding sequence) โดยมีความยาวเท่ากับ 133 และ 75 เบส ตามลำดับ

โครงสร้างของ ORFs

โครงสร้างของ ORFs ของไวรัส HPV แสดงในรูปที่ 8, 9, 10

ORF1 (Left ORF)

ORF1 เริ่มต้นตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ที่ 134 และสิ้นสุดที่รหัส TAA ที่ตำแหน่ง 1,420 รหัสเริ่มต้น (ATG) ของ ORF1 มีลำดับเบสซึ่งเหมือนกับลำดับเบสของ Kosak consensus sequence (A/G-CCAUGG) (39) ซึ่งเป็นรหัสเริ่มต้นของการแปลรหัสในยูคาริโอต จำนวน 6 ในจำนวนทั้งหมด 7 เบส ดังนั้นเมื่อแปลรหัสจะได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโนจำนวน 428 ตัวหรือเทียบเท่ากับโปรตีนขนาด 50.37 กิโลดาร์ตัน เมื่อนำเอาลำดับกรดอะมิโนเหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ปรากฏว่าไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนใดๆ ดังนั้นบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนจาก ORF1 ของไวรัส HPV จึงยังไม่ทราบแน่นอน อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับพาร์โวไวรัสในกุ่มและแมลงอื่นๆ ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Brevidensovirus ยีนนี้สร้างโปรตีนจำพวก Non-structural protein-2 หรือ NS2 จากการศึกษานใน Minute virus of mice

parvovirus (MVM) พบว่าโปรตีน NS2 มีบทบาทในการควบคุมการรวมตัวของโปรตีนโครงสร้าง (capsid protein) นอกจากนี้ยังมีรายงานใน Canine parvovirus (CPV) ว่า NS2 อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการลอกแบบดีเอ็นเอของไวรัสอีกด้วย (41)

		TATA-box (P1)			
GGGGCTGCTGGAGCCTGATAAGGCTTATCGCGGAGCTAGGGGGCGGTGCGTCGGCAGACCCCTATATATTGGTAAACCTCGGGTGTGTGACA					91
Inr-box		DPE	Initiation codon		
AGAGTCCTCCTCCGATTGGTCGAGCA		114	TCAGCAAGGAGCGGAGCAAAGGTGACTATTATTATTTACTCTAGAGATCTAGTG		182
		M A S K G D Y Y Y F T F R D L V			
AACTTTGTAAATACCTTGCTCTGTCTAGATAAGATTAAATGCTATAGCTGTGAAAATGCTAACCATGAAGGAGGAGGATTCTTTGAGCCAAGTC					272
N F V N T L I C H A I N A I A V K M L T M K E E D F L S Q V					
TGGTTGCCATACATACAAGGCTTTTTCAGACAGCTCATGACTTGGGTAGAGACAGTGATAAGTGCGGTGCGGCGGGGGATGAATTTCAAGAG					362
W L P Y I Q G F Q T A E D L G R D S D K C G A A G D E F Q E					
GTTTTTCTGGATGAACGTAAATTCATAGATTTTCATGACATCTTTCCGCCGCGAGTGATTTTATCAGCTATGGTGACGAGTGGAGACATAGA					452
V F L D E R K F I D F M T S F R R S V F I S Y G D E W R H R					
TCATCTCACTTTATGGCAGATGTATTTTGGAGTGATAATCTAAGGCAATTTTGGATGATGATTTTGGAGAGTGTTTTACGCTAAATATG					542
S S H F M A D V F W S D N L R Q F W M M I F G E C F H V N M					
TCACCATGTAAGAGATTGTATGTAGACATGTTACCATACTATTATTTAGCAAAGATGACTACGGAACAGACATCTTATAGAATGGGAA					632
S P C K R L Y V D M L P Y Y Y L A K M T T E N R H L I E W E					
TACATGAATCCATGCTCTGCCACACATGTGCGGCGGAATAAGATGACTGGTATGAACCTTTTGTAGTCAGGGAGTAGTTATAGACAACGAA					722
Y M N P C P A T H V R R N K M T G M N F C S Q G V V I D N E					
TATCCAGACAATCAGATGGGTTGTTACAACATAGACGAACATCCATTACCAGGAGGTATTAGATGGAGTGGTAACACAGAATATCGTACA					812
Y P D N Q M G C Y N I D E H P L P G G I R W S G N T E Y R T					
GGTTATGTACACGTTAATAAGGTAAGGTTGGGAGTTACAGATAAAGTCAGTGACATGGAGGAGACTTCCAGTGATGAGGAGGTGCCT					902
G Y V H V N K V K W L G V T D K V S D M E E T S S D E E V P					
AGCAGTCAGGAGAAGTATATGAAGAGTAAGGAGAAGAAGGAACAGCCAAAGACATCGGAGAAGAAAGACGATGAGCCAGCAAACAAGAAG					992
S S Q E K Y M K S K E K K E Q P K T S E K K D D E P A N K K					
AGGAAGTTCTGCCTCACAAAGCGCAGCTCTGGAGAAGCAGAAGTTAGAAGTGGGAAAATTTTCCGGATGGAAGAGGAGCCGATCAACATC					1082
R K F C L T S A A L E K Q K L E L G K F F R M E E E P I N I					
AAATTATACGACTTAGAGGAAGGGAAGGAACACCACGTCATGAAGCTATACGTATCGATGGTACTAAGTCTAAGTTTGTGAAGAAGAAA					1172
K L Y D L E E G K E H H V H E A I R I D G T N S K F A K K K					
GACGAACATGGTAACGTTATCGATGATTTCAAGGTAATGTTTGTGATGGAGAGAACAAGTGTATGGTTTTTTTGTAAACACACAGTTG					1262
D E H G N V I D D F K V I V C D G E N N L Y G F F A N T Q L					
		TATA-box (P2)		Inr-box	
AACAAATTGTTTAAACAAATGGCAGATACAAAGAAATATAGTATGAAGCCAGAACAACATAAGCTTAAAGGTTTCACAGATTCAGGAG		1352			
N K L F N K W H S T K K Y S M K P E H N I S L K V S Q I Q E					
DPE		Initiation codon (P2)		Stop codon (P1)	
GTTAGGAATGAAAGATGCTGTTTGTAAAGATGGCCATTAACGATGATGTAAGGTTTTCGCCAGGTAATGAAGCTCAAGAGAGAAGGG		1442			
V R N G K M C I V K M A I N D D V K C F A R					
		M F R Q V M K L K R E G			
ATACTGGATCATAACCTCTTGTACATTTTACTCTGGTCTCATTGTAAAGTTTGAACATTGGAACGACAATGTCAGTAAAGTAAGAAAG					1532
I L D H N P L V T F Y S G L I V K F E H W N D N V S K V R K					
TTTGTGTATAAGTTTGCACAGTGGTTGTATAAGGAATGTACATACATCCACAACATAAGTGCTGCAGTTCATGATAGATGTAAGGATAAT					1622
F V Y K F A Q W L Y K E C T Y I H N I S A A V H D R C K D N					
TGTTGTAAAGACTCAGCCAAATAAGTATGTAAGAACATATACGGTCCTCATTTACACATTTTATTGGAGAGTGTCAATGAAAATTGGAGT					1712
C C K D S A N K V C K N I Y G P H L H I L L E S V N E N W S					
AAAAGTAGCAAGAGGGTTTTATTCGCGGCTACGAGAAGATACTTCAACACGACAACAACAATATGGGAGGACCTAGGACTACAGAAG					1802
K S S K R V L F R G Y E K I L Q H D N K Q L W E D L G L Q K					
ACATCGCCTTCGTCGATGAGTCTGTGGGATGGTGAGATGTTCAAGTGGTATATGTTTCAGGGACAGGAAATACGCAAGTGTTCATGGAACA					1892
T S P S S M S L W D G E M F K W Y M F R D R K Y A S V H G T					
TATTACTACAGTAGCGATGCGGAGTTCTTGAACAAGTTAATGAAAAAGAAAGCACTCAGGAGAGGGACGACTTGTACGAGAAAGCTTGT					1982
Y Y Y S S D A E F L N K L M K M K D T Q E R D D L Y E K A C					
CAGTTTAAGAGGGATAGGAATACAGCAAGGAAGATTGAAAAAGTACTGCTAAGACATTAGATGGTGGTGAAAAACAATGACAACATAAGA					2072
Q F K R D R N T A R K I E N S T A K T L D G G E N N D N I R					
CTAAGCAGTTCTAGGGCTATATACTTAGAAAAATTTACAGGTATTGGAGAAGTATCTAGTAAAACATAAATGTTACACCATTCAGGACTTT					2162
L S S S R A I Y L E N L Q V L E K Y L V K H K C Y T I Q D F					
AAGATGATGCAGAGAAGCGACGATGAGATTTGGGTAATACATGTATGACATCCAGAATCTAGAAAAAGTCATAGAGAAGTTAAACATT					2252
K M M Q R D D E I W V N Y M Y D I Q N L E K V I E K L N I					

ATGGAGTACAGTCTACAACAGGCAGACTACATAGAGGGAAACACATGGATAGGAGAAGATTTATGGAACACTAACAGTGCATATATGAAG 2340
 M E Y S L Q Q A D Y I E J N T W I G E D L W N T N S A Y M K
 ACTATCAAGAGGGGTACTGATAGGTATTACTGGTACATTCAAAGACACATTTCAAACAGGGCCAGTTTAGTCGGACAGAGCAGACAGATT 2430
 T I K R G T D R Y Y W Y I Q R H I S N K A S I V S Q F K Q I
 TGTATCGACGGGGCATACTGATGTTTAAAGATAATAGAGAACATGAAGGTAGAGTCGAGGCCAAAGACAATACCGATAGTAAGCAAGAAT 2520
 C I D G A Y M M F K I I E N M E V E S K P K E I P I V S K N
 AAGACAGTACAGTGGATACAAGATTTTATGGATATCATACACGGAACTTACCCAAGATTAACTGTATGATGTTATATGGCAATAGTAAC 2610
 K T V Q W I Q D F M E I I H G N L T K I N C M M L Y G N S N
 AGTGGGAAACCGCAGCTGATTGAGGCTCTAACGGGCTGATAAACACAGCCATAATGACAAATGTGGTGATGGTGGAACTTCCACTTT 2700
 S G K T Q L I E A L T G L I N T A I M T N V G D G G T F H F
 AGCAACATAACAGAGATGAGTACAATTGTAGTAGGAAATGAACTAAGATCAGGACTCAGACAATTGAGCAATGGAAGGGATTGTGTGGG 2790
 S N I T E M S T I V V G N E T K I S T Q T I E Q W K J L Q G
 GGAGAGAACATAACATGCCAATGAAGTACAAGGAACACAGACACACATGTTGAGGAAACCTGTATTTTGACCAACCAACATCATCCA 2880
 G E N I T M P M K Y K E H K T H M F E K P V F L T N Q H H P
 CTGGTAGAGATATCAAACATGACGATAGAAAGGCTATAGAGAACAGATGTTTTATGTATAAGGTAGAATTGGGAAGCGAGGCAGTAAAT 2970
 L V E I S N Y D D R K A I E N R C F M Y K V E L S S E A V N
 TATA-box (F3) Inr-box DPE
 GCACATATAAAATTTCTAACAGGATGATTCCGATCAAGAAGAATCCAGAACTGACTCAGTTTATATTGGCATGTATGCAATATTAATA 3060
 A H I K F F N R M I P I K K N P E L T Q F I L A C M C Y V H
 TTGAATATATGGACAGGGCAGATAAGAAGTTTAAAGATTGGGTTTTCAACAACCTTTATGACATGCTGTTTGAGGACAGCTAAAATATGT 3150
 L N Y M D R A D K K F K I G F F N N F M T C C L P T A K I C
 Stop codon (P2)
 ACGAGAACGTTTGACTTTCCCGGGCAACAATAAGTGTATAAGATAAAATCGTGCGTTTGAGTATCCACATCACACATAGAGGTAGTACAC 3240
 T R T F D F F G Q Q
 CATGAGTCTATCATGGGAGCAGTCGTGTCCGACAGTGTGAGTTATAGCTGTGGTAACTGAAGTGGTCGAATTCATAGTCGATGTCGTG 3330
 GAAGTGGCTTTTCATGGTGGCAGAGGCTGTACAGGTCGTTGCAGACACAGTCAATTACTTTACTGGCGGCGATAGTGTGCGAAGAACGAT 3420
 AGAGCGATCCGGAGACGCAGGCAGCTAATGAGGTGAGCAGTACAGCAGAATCGACAAACGTAGGAGGAACTCAGGGCTACATGTTAGGAC 3510
 Initiation codon (P3)
 CCGAACAGTTGGACGATTACATAGATAGAGCTACAGACATAGACTAATGTACCTACAAGAAAAGGAGGAATTATTATCGGAGTAAACAC 3600
 M S P T R K G G N Y Y A S K H
 TTCCAAAGTAAGCGAAAGAATAAACTAGCGAGAGTGAAAGATTTACTGGCAAGTAAGAAGAAGGAGAGAAGATTTAAAGGAAAAGGAAAT 3690
 F Q S K R K N K L A R V K D L L A S K K K E R R F K G K G N
 ACTCTAAGTGAGAAGCCAAGTACATCAGAGTGAACCGATCCGGTAAGACAAAGATTTCCAGAATTAGAACAGGAGGAGAGAATACATTT 3780
 T L S E K P S T S E W N D P V R Q R F P E L E Q E E R N T F
 GCAGGATTACTAGCAATAGAAGCAGCACCAGACCAAAGACAATTAGGGCGCGATAATAACAATCAACTAGCACTAGTACAGAGAGACACA 3870
 A G L L A I E A A P D Q R Q L G R D N N Q L A L V Q R D T
 AGAGTAGCAGTAAGACAAAGTACAAACAGAGGAGAAGCATTAGAGGTAGTAAGAGCAGCAAACGAAGCAATAAGAAGTGGTGGAGATAGA 3960
 R V A V R Q S T N R G E A L E V V R A A N E A I R S G G D R
 TTAGCAGAATTAGTACAAGCATACGCATCAGGATTTTCAGACAGCACAGAAATAGTAGAAGTAAGACAAGAAGATAGAGTACAGAGAGAC 4050
 L A E L V Q A Y A S G F S D S T E I V E V R Q E D R V Q R D
 ATATTCGAAGAAGAAGGACAGAATTTATTGGCTATTGAGATTGCATTACAAGAACCAGCAGTGTAGCGCAACAGTTAGACCAGGAGAGA 4140
 I F Q E E G Q N L L A I E I A L Q E P S S V A Q Q L D Q E R
 ACTCCAGCAGTCAAGAGAGCTCTAGAATAACAGCAGAAGAAGAACGGATAGAACGCATAGAAAACGCTAAGAAATATATTGAAGAAGTC 4230
 T P A V K R A L E L T A E E E R I E R I E N A K K Y I E E V
 ATAGAAGAGACAAATCAAGAACTACAAGAACAAGAGAGACAAGAGGTAAAGTGCAGCGCGCGGAGATACGATGAACACCGAAGCACCCGTC 4320
 I E E T N Q E L Q E Q E R Q E V S A A A E D T M N T E A P V
 CCGATGGAACCTTCTGAATCCGGAGCCACCGCCGACCGCAGCAACGAGCTGCTGCGGGCGGCGCGGTAGCGGAGCGGAGGAGAATCT 4410
 P M E T S E S G A T A A P Q Q R A A A G G G G S G G G G E S
 GCAGGGTACGGAAAAAACCCAGCGATTCTATCCAGCGCCACCGCAATAAACCCGTTGATCTCAAACACATCGGAGACAACGTATATGTG 4500
 A G Y G K N P S D S F Q R H R N K P V D L K H I G D N V Y V
 GCTCAGAGAGTTTATAAGGTAGAAGCTGAGTGTAACTGGTAGGGGACAAGTTATCGTGGTCAAACACGACAAACAGTAAATATCTCAGG 4590
 A Q R V Y K V E A E C K L V G D K L S W S N T T N S K Y L R
 AGACTGTTGGGAATAAACGGCAACAGTAACTCTGGAGATATTAAGCACAGTTTCTACACACAGCTATCTGGAAGTATTGGTTTGGGAAAT 4680
 R L L G I N G N S N S G D I K H S F Y T Q L S G S I G L G N
 CTTGCTCTGGGTAACATACATAAATCTGCTGGGTATGGACAACATATCCAAGAGCGAGGACAGTTGGGCTATCATAGCCACCAGGGGCAAG 4770
 L A L G N Y I N S W G M D N I S K S E D S W A I I A T R G K

```

ATGAACCATCTACAGGCATTGAGATGGTTCACAATACCAAGGAGAACTGTAGTGGGATATACAAGTGCACCGCTACAGTTTGGTAAA 4862
M N H L Q A F E M V P Q Y Q G E T V V G Y T S A P L Q F G K

CTTTTGGGACATGTATACTATCCAGATCCCAAAGGTGAAGAAAGGATAAAGATAGCAAGTAAAGCTGATGCCAAAGAATCTAAGATGTTT 4952
L L G N V Y Y P D P K G E E R I K I A S K A D A K E S K M F

AAGGATGCAATGGCAGGTTATCTATTAGATGACGACATGAACCAGACAAAAGTCACATCAGAACACCAACCGTATTTGCATTTCACAGAC 5042
K D A M A G Y L L D D D M N Q T K V T S E H N H V F A F T D

TTGAGAGATTGCCAGTAATAAGCGAAGTAGCAGCATACCAGACCAACGATGAACCACCAAAAATAAATGGCATTGGAATAGAATACCAG 5132
L R D S P V I S E V A A Y Q T N D E P P K I N G I G I E Y Q

GGATTCAACTTAACATCAGACACAAATGCAGCTCTCATTGGTCTCATGCCAAGTAACGTATATAAGAGAAGGAAGGAGATACAGTCAGGT 5222
G F N L T S D T N A A L I G L M P S N C I K R R K E I Q S G

ATGGACAACGTAGTACTATGGTCCATGAAGAGTAACAGACTCATAGACAAAAGATTTTGGAGCCAGAAGGATGGACCAAAAAGAGCATG 5312
M D N V V L W S M K S N R L I D K R F W K P E G W T K K S M

AACGGTATGGCTAAAGACAAAGTGAACATTACACCAACACCTATGATATATATGAAGAAGCTCACGTAACCAGGACAAACAGATTATGCA 5402
N G M A K D K V N I T P T T Y D I Y E E A H V T R T T D Y A

GAATGGGCTAGGAATGAAATATTCTATGATGCAAAACACITTCATACGGAAGTGTGGACCAAGTGACATAGGAAATTTGTACAGAAATAC 5492
E W A R N E I F Y D A N T S Y G S V G F S D I G N F V Q K Y

AACTTATCAGACCAATATGCTACAGACATATTCTTTATGCCATATGTTACACACAGAGAGGCATAATTCAAGACATAGTCATAAATTTT 5582
N L S D Q Y A T D I F F M P Y V H T Q R G I I Q D I V I N F

GACTTAACAATGCAAATTATGGTCAAGAGAATTCCACGTCAAGTATATAATGATTTTACCACATCAACACTAGAGCCATGAACCCAGTT 5672
D L T M Q I M V K R I P R Q V Y N D F Y H I N T R A M N P V

AAATATGACAGTGCGGTAGAAAGATCATTCCGATACGACGAAATATATGCAAGATCCATAAAAATACATGAAAACATAAGTGGAACTCAT 5762
K Y D S A V E R S F G Y D E I Y A R S I K I H E N I S G T H

GGAAGTAAGTATGCAGATAGAGGACCAATAAGTCATATGGAAGCAACAAAGAGGAACCTTTACCAGAGAGCATATGCACAGAGAAGAATA 5852
G S K Y A D R G P I S H M E A T K R N S Y Q R A Y A Q R R I

ATACTAGATCAGGGTGTATCAAAAATGAAGACAAGAAGTAGTGCAGCGCGGGAAGATGACATTCCAGAAGATTGTGACGACTTCCTAGAA 5942
I L D Q G V S K M K T R S S A A A E D D I P E D C D D F L E

ACTTCTGAAATGGATCCACCGCCGCGAGCCGAGTTGCCGAAGAAGAAGAAGAAATATAGAGTTAATGTAATGTTGACATAATACAAAT 6032
T S E M D P P P Q P Q L P K K K K K Y R V N V

Stop codon (P3)
GTATATATTTGAGTTACAATAAAGGTTATAAAAATCACGCGTGCCTGTTTACCCTT 6089

```

รูปที่ 8 แสดงลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมไวรัส HPV ที่หาได้ โดยที่ลำดับกรดอะมิโนของ ORF ต่างๆ เขียนอยู่ใต้ลำดับเบส รหัสเริ่มต้นของการแปลรหัส (ATG) รหัสหยุด (TAA) และ Poly A (AATAAA) ชีดด้วยเส้นใต้ โปรโมเตอร์ P1, P2 และ P3 แสดงจาก TATA-boxes, Inr-box, DPE ลำดับเบสซ้ำที่ปลาย 5' และปลาย 3' แบบ Direct repeat เขียนกำกับข้างบนด้วยลูกศร (→) และ short palindrome เขียนกำกับข้างบนด้วย (—)



รูปที่ 9 การจัดเรียงของยีนบนสายดีเอ็นเอที่เป็นสายบวกของไวรัส HPV (Organization of HPV genome) เส้นตรงครึ่งช่องแสดงตำแหน่งของรหัส ATG ส่วนตำแหน่งของรหัสหยุด (stop codon) แทนด้วยเส้นตรงเต็มช่อง ส่วนช่องว่างหมายถึงช่วงของยีน

	TATA-box (~25)	Inr-box	DPE	Initiation Codon	N-terminal
		———— (28) ———			
Consensus	TATATAA	<u>TCAGTG</u> GT T A	GNNNAGACGT	GCCACCATGG G	
NS2-protein	TATATAT 62	AGAGTC 88	GTGAAGTTCT 122	AGCACGATGG 143	MASKGDY...
NS1-protein	TATAGTA 1,298	TCACAG 1,339	GGAAAGATGT 1,367	TGTAAAATGT 1,405	MFRQVM...
VP-protein	TATAAAA 2,976	TCAGTT 3,029		GTCCCGATGG 3,558	MSPTRKG...

รูปที่ 10 ตำแหน่งจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส การแปลรหัส ซึ่งทำนายจากการเทียบลำดับเบสกับ consensus TATA-box, transcriptional start signal (Inr-box), Downstream promoter element *DPE) และรหัสเริ่มต้นของการแปลรหัส (ATG)

ORF2 (Mid ORF)

ORF2 เริ่มต้นที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,405 และสิ้นสุดที่รหัส TAA ที่ตำแหน่ง 3,183 ATG เริ่มต้นของการแปลรหัสที่ ตำแหน่งที่ 1,405 มีลำดับเบสที่เหมือนกับ Kozak consensus sequence จำนวน 4 ใน 7 นิวคลีโอไทด์ เมื่อ ORF2 แปลรหัสจะได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโนจำนวน 592 ตัว ซึ่งเทียบเท่ากับน้ำหนักโมเลกุล 69.82 กิโลดาร์ตัน

จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 592 ตัว ปรากฏว่า มีความคล้ายคลึงกับ non-structural protein-1 (NS1) ของพาร์โวไวรัสอื่นๆ โดยที่มีคล้ายคลึงกับ NS1 ของ IHNV (Accession No. AF273215) (33), Aa/DNV (Accession No. X74945) (34), (AaeDNV) (Accession No. M37899) (35) โดยมีความเหมือน (Identity) เท่ากับ 34%, 24% และ 23% ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 พบว่ามีบริเวณที่อนุรักษ์ ไว้ (Highly conserved motif) จำนวน 2 แห่ง ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของพาร์โวไวรัส อื่นๆ ด้วย (36) บริเวณที่ 1 อยู่ระหว่างกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 82-124 บริเวณนี้เรียกว่า Replication initiation motif (รูปที่ 11) อีกบริเวณหนึ่ง เรียกว่า NTP-binding and helicase domain เริ่มต้นที่นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 397 ถึง 472 (รูปที่ 12) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในพาร์โวไวรัส จากความเหมือนนี้จึงสรุปได้ว่า ORF2 เป็นยีนที่สร้าง non-structural protein (NS1) ของไวรัส

นอกจากนี้แล้วผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนในส่วน of NTP-binding and helicase domain พบว่าลำดับกรดอะมิโนของไวรัส HPV มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัส IHNV และพาร์โวไวรัสในยูงในกลุ่ม brevidensoviruses (AaeDNV และ Aa/DNV) ในระดับ 32-35% ในขณะที่มีความเหมือนกับพาร์โวไวรัสในยูงในกลุ่ม Densovirus และ Iteravirus (JcDNV และ BmDNV) (42, 43) ในระดับ 29% เท่านั้น

Replication initiator motif		
	I	II
Aa1DNV (331-390)	GDHIHILFS-19-SATSAGNAEATITFSKVKFLRNYILYCI RYGI	[X74945]
AaeDNV (372-431)	GDHIHILFS-19-SATSAGSAEATITFSKVKFLRNYILYCI RYGI	[M37899]
IHNV (258-315)	GDHWHITYS-17-GVTFAARAEAEATTVLVRNIKRWILYLI RYGI	[AF273215]
AAV2 (88-162)	YFHMHVLE-34-WFAVTKTRNGAGGGNKVVDECYIPNYLLPKTQ	[AF043303]
HPVmon (122-270)	GPHLHILLE-17-KSSKRVLFRGYEKILQHDNKQLWEDLGLQKTS	[]
B19 (79-147)	GYHIHVIG-28-VKLKFLPGMTTKGKYFRDGEQFIENYLMKKIP	[AB030673]
MVM (125-216)	GWHCHVLIG-51-LLTYKHKQTKKDYTKCVLFGNMIAYYFLTKKK	[NC-001510]
JcDNV (132-192)	GDHIHVIHD-20-SVQKTGKPKVFIWFEKRTDWYDVFYFFVRKR	[S47266]
BmDNV (518-599)	FKHIHGIPW-41-TSATTSSVANANAQYPIDVFHFDEAYETNYGI	[M15123]
CeDNV (289-344)	EGHFHILHA-18----PRKNKAIPIDPVDEHIRNIMFYNTKWPR	[AF375296]
consensus	...HSH&&&.	6.Y6.....

รูปที่ 11 Replication initiator motif I และ II ของไวรัส HPV และพาร์โวไวรัสอื่นๆ ที่พบในส่วน of Non-structural protein-1 (NS-1) ซึ่งมีลำดับเบสประมาณ 119 เบสที่ไม่เปลี่ยนแปลง (Conserved region)

NTP-binding and helicase domains

	A	B	C
AaeDNV (607-725)	KINGMVLEGITNAGKSLILDNLLAMV-23-SILFEEPMIT-30-TPTWITTAT		[M37899]
Aa1DNV (567-685)	KINGMVLEGITNAGKSLILDNLLAMV-23-SVLFEEPMIT-30-TPTWITTAT		[X74945]
AAV2 (317-434)	KRNTIWLFGPATTGKTNIIEAIAHTV-22-VIWWEEGKMT-30-TPVIVTSNT		[AF043303]
B19 (311-428)	KKNTLWFGYGGPSTGKTNLAMAIKSV-22-LVVWDEGIIK-30-VPVVITSNG		[AB030673]
MVM (382-499)	KRNTVLFGHPASTGKSIIAQAIQAV-22-LIWVEEAGNF-30-TPVIMTTNE		[NC-001510]
IHHNV (472-590)	KINTLVLGQPTGTGKSLTIGALLGKL-23-YALFEEPRIS-30-IPFISTNK		[AF273215]
HPVMON (377-501)	KINCMMLYGNSNSGKTQLIEALTGLI-23-IVVGNETKIR-30-KPVFLTNQH		[]
JcDNV (390-506)	KLNAFLIISPPSAGKNFFDFMIFGLL-24-VLLWNEPNYE-30-TPVILITNN		[S47266]
BmDNV (57-176)	KTNTFQIVSPPSAGKNFFIETVLAFF-24-VNYWDEPNFE-30-TPVIITANY		[M15123]
HPVchin (33-152)	KGNTLSEE-PSTSGWKDPVRQRFPAL-30-LGRDSNNQLA-30-SGGERLAEL		[AY008257]
Consensus	KkN.666.gppgtGKt66a..6a..6	666ddp.66	tp66&tt6
	r s sa s l ee ss		
	i		

รูปที่ 12 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบริเวณ NTP-binding and helicase domain จำนวน 119 ตัว ของไวรัส HPV และพาร์โวไวรัสอื่นๆ ซึ่งประกอบด้วย domain A, B, และ C ตัวเลขในวงเล็บ () แสดงถึงตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนในโปรตีนของไวรัสแต่ละชนิด รหัสใน GenBank แสดงไว้ในวงเล็บ [] สำหรับ Consensus amino acid ที่เหมือนกันทั้งหมด เขียนด้วยตัวหนา ถ้าเหมือนกันบางส่วนเขียนไว้ข้างล่าง สัญลักษณ์ & หมายถึงกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (ได้แก่ M, N, L, F, Y, I, V, W) และจุด (.) แสดงถึงกรดอะมิโนใดๆ

ORF3 (Right ORF)

ORF3 อยู่ทางขวา (Right ORF) ของจีโนม เริ่มต้นที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 3,558 และสิ้นสุดที่รหัส TAA ที่ตำแหน่ง 5,922 (รูปที่ 8) ตำแหน่งของ ORF3 อยู่ห่างจาก ORF2 เท่ากับ 375 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแตกต่างจากพาร์โวไวรัสในแมลง (Mosquito brevidensoviruses) ซึ่ง ORF ทั้งหมดจะอยู่ซ้อนทับกัน (Overlapping) จุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (ATG) ที่ตำแหน่ง 3,558 (A/GCCAUGG) มีลำดับเบสเหมือนกับ Kozak consensus sequence จำนวน 3 ใน 7 นิวคลีโอไทด์ เมื่อ ORF3 แปลรหัสจะได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโนจำนวน 818 ตัว ซึ่งเทียบเท่ากับน้ำหนักโมเลกุล 92.17 กิโลดาร์ตัน

จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 818 ตัว ปรากฏว่า มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนโครงสร้าง (Structural protein; capsid protein; VP) ของพาร์โวไวรัสอื่นๆ โดยมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV ที่แยกได้จากกุ่ม *P. chinensis* (HPVchin) มากที่สุด ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ORF3 ทำหน้าที่สร้างโปรตีนโครงสร้าง (VP) ของไวรัส HPV

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP พบว่ามีบริเวณที่อนุรักษ์ไว้ (Highly conserved motif) จำนวน 2 แห่ง บริเวณที่ 1 อยู่ปลายอะมิโน (N-terminal) ที่ตำแหน่ง 424 บริเวณนี้มีความคล้ายคลึงกับ Phospholipase A2 motif (รูปที่ 13) และอีกบริเวณหนึ่งเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนมาก เรียกว่า Glycine-rich region อยู่ห่างจาก ATG เท่ากับ 279 กรดอะมิโน (รูปที่ 14) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในพาร์โวไวรัสอื่นๆ ด้วย

HPVmon	SKADAKESKMFKDAMAGYLLDDDMNQTKVTSEHNVFAFTDLRDSFVISEVAAYQTNDP
HPVchin	NHSGQYRIFDGLDGYTLDDDMNQKKVTADQHHVFMETDLRDAPMISEVTAYLNTDNP
PLA2	SWWDFADYGCYCGRGGSGTPVDDLDR--CCQVHDHCYNEAAVCD-----DRL
PPV	ARGLTLPGYKYLGPNSLDQGEPTNPS-DAAAKEHDEAYDKYIKSGKN-PYFYFSAADEK
	: . . . : : : . *
HPVmon	PKINGIGIEYQGFLNLTSDTNAALIGLMP SNCI----
HPVchin	AQINGIGIEHQGFMSNDANTALIGVMP SNCI----
PLA2	AAICFAGAPYNNNNYNID-----LKARCQ----
PPV	FIKETEHAKDYGGKIGHYFFRAKRAFAPKLSETDSP

รูปที่ 13 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนโครงสร้าง (Capsid protein) ของจีโนมไวรัส HPV (HPVmon) กับลำดับกรดอะมิโนของ Phospholipase A2 (PLA2) motif ของ Porcine parvovirus; PPV (GenBank Accession No. L 23427) และ Phospholipase A2 จากซีรัมของงูเห่าจากไต้หวัน (*Naja naja atra*; GenBank Accession No. X77755)

	↓	↓
HPVmon	-----METSESGA---TAAPQQRAAAGGGGSGGG---GESAGYGKNPSDSFQRHRNKPV	
MVM	MSDG--TSQPD SGN---AVHSAARVERAADGPGGSGGGGSGG-GGVGVSTGSYDNQTH----	
H-1	MSDGTETNQPD TG---IANARVERSADGGGSSGGGSGG-GGVGVSTGTYNQTT----	
FPV	MSDG--AVQPDGG---QPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGI STGT FNNQTE----	
PPV	MSENVEQHNPINAG----TELSATGNESGGGGGGGGGGRGAGGVGVSTGSFNNQTE----	
AaeDNV	MADS--TSMHDHGE---QRGTRKR RDAGAGGSGAGIGKGT SNYVKEGYGPNMSE-----	
Aa1DNV	MADS--TTMEHDG---RGTRKRREAD-GGSGQGVGKGN SNAVKEGYGPNITEMVPRNI	
BPV	MEVSN DIPNDEAGN-QPIELATRSVVGSGSVGGGGRGG-SGVGYSTGGWTGGTI----	
B19	-----MTSVNSAEASTGAGGGGSSNSVKSMWSEGAT-----	
AAV2	DADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHDST----	
IHHNV	MCADSTRTS PRKRS---RRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIHITFQTRYFE	

รูปที่ 14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ Glycine-rich conserved region ของ ORF3 (right ORF) ของไวรัส HPVmon เทียบกับพาร์โวไวรัสอื่นๆ ลูกศรแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนอาร์จินีน

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV โดย SDS-PAGE ในรูปที่ 6 ปรากฏว่ามีแถบโปรตีนหลายแถบ แต่ที่เป็นโปรตีนหลักและมีปริมาณมากที่สุดคือโปรตีนขนาด 57 กิโลดาร์ตัน ส่วนแถบโปรตีนอื่นๆ มีขนาด 97, 54, 35, 34 และ 33 กิโลดาร์ตัน

แต่จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสพบโปรตีนโครงสร้างเพียงหนึ่งชนิด ดังนั้นเหตุที่มีโปรตีนหลายชนิดจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE อาจเกิดจากมี Proteolytic cleavage ของโปรตีนโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่ ซึ่ง Proteolytic cleavage โปรตีนโครงสร้างนี้ เคยมีรายงานในพาร์โวไวรัสในสัตว์ฟันแทะ (Rodent parvovirus) ว่าโปรตีนโครงสร้าง (VP2) จะถูกย่อยที่ตำแหน่งหลังกรดอะมิโนอาร์จินีน (R) ที่อยู่บนหน้าบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนมาก ๆ (Glycine-rich region) สำหรับโปรตีนโครงสร้างของไวรัส HPV มีกรดอะมิโนอาร์จินีน 2 ตำแหน่ง อยู่หน้าและหลังบริเวณที่มีไกลซีนมาก ถ้ามีการย่อยโปรตีนที่อาร์จินีนตำแหน่งที่ 1 (nt 4,368) จะได้โปรตีนขนาด 270 และ 548 กรดอะมิโน ซึ่งเทียบเท่ากับ 30.42 และ 58.60 กิโลดาร์ตัน ตามลำดับ แต่ถ้าย่อยโปรตีนที่อาร์จินีนตำแหน่งที่ 2 (nt 4,439) จะได้โปรตีนขนาด 294, 524 ซึ่งเทียบเท่ากับ 33.13, 61.76 กิโลดาร์ตัน และถ้าตัดทั้งสองตำแหน่งจะได้ชิ้นโปรตีนขนาด 270, 524 และ 27 กรดอะมิโน ซึ่งเทียบเท่ากับ 30.43, 59.05 และ 3.04 กิโลดาร์ตัน ซึ่งอาจไม่สอดคล้องกับขนาดโปรตีนที่วิเคราะห์ได้โดย SDS-PAGE อย่างไรก็ตาม อาจมีสาเหตุอื่นเกิดขึ้นก็ได้ เช่นการ splicing หรือการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่นๆ เป็นต้น นอกจากนี้แล้วมีรายงานใน ไวรัส HPV จาก *P. chinensis* มีโปรตีนโครงสร้างขนาด 54 กิโลดาร์ตันซึ่งเท่ากับ minor protein ของไวรัส HPV ซึ่งมักจะเห็นเป็น doublet กับโปรตีนโครงสร้างขนาด 57 กิโลดาร์ตัน

นอกจากการมี Proteolytic cleavage แล้ว อาจมีการ splicing ที่ตำแหน่งต่างๆ ของยีนก็ได้ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสแสดงให้เห็นว่ามีตำแหน่งต่างๆ ในยีนที่สามารถเกิด splicing ได้

ตำแหน่งและลำดับเบสของโปรโมเตอร์และบริเวณควบคุมการถอดรหัส

การวิเคราะห์โปรโมเตอร์และบริเวณควบคุมการถอดรหัสที่อยู่ด้านหน้าและด้านหลังของ ORF1, ORF2, ORF3 ปรากฏว่าพบบริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์และ Poly A หลายตำแหน่ง ที่ด้านหน้า (Upstream sequence) ของ ORF1 มีลำดับเบสที่ทำหน้าที่เป็น TATA-box อยู่ห่างจาก ATG ไปทางซ้ายมือ ที่ตำแหน่ง 62 ดังนี้ TATATATAT (รูปที่ 8) ตำแหน่ง GC-rich region (GGGGCGG) ที่ 39-45 ทำหน้าที่เป็น ตัวกระตุ้น (Activator element) มี Transcriptional start signal (Inr-box) (AGAGTC) อยู่ที่ตำแหน่ง 92-97 และ Downstream promoter element (DPE) (GTGAAGTT) ที่ตำแหน่ง 117-124 ดังนั้นบริเวณนี้น่าจะทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ได้ ให้ชื่อโปรโมเตอร์นี้ว่า P1

บริเวณควบคุมการถอดรหัส ตำแหน่งที่ 2 พบอยู่ด้านหน้าของ ORF2 บริเวณที่เป็น TATA-box อยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1,298-1,304 มีลำดับเบสเป็น TATAGTA ลำดับเบสของ GC-rich region (GGCACAG) อยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1,281-1,287 ลำดับเบสของ Transcriptional start signal (Inr-box) คือ TCACAG อยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1,337-1,342 และ ลำดับเบส GGAAAGATGT อยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1,361-1,370 ทำหน้าที่เป็น Downstream promoter element (DPE) ดังนั้น บริเวณนี้น่าจะทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ของ

ORF2 ได้ ให้ชื่อโปรโมเตอร์นี้ว่า P2 จะเห็นได้ว่าการถอดรหัส ORF1 และ ORF2 ถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์ที่ต่างกันซึ่งแตกต่างจากพาร์โวไวรัสบางชนิดที่ทั้ง ORF1 และ ORF2 ถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์เดียวกัน

บริเวณควบคุมการถอดรหัส ตำแหน่งที่ 3 พบอยู่ด้านหน้าของ ORF3 บริเวณที่เป็น TATA-box อยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 2,976-2,982 มีลำดับเบสเป็น TATAAAA ลำดับเบสของ GC-rich region (GCGAGGC) อยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 2,957-2,963 ลำดับเบสของ Transcriptional start signal (Inr-box) คือ TCAGTTT อยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 3,027-3,032 ให้ชื่อโปรโมเตอร์นี้ว่า P3 ทำหน้าที่ควบคุมการแปลรหัสของ ORF3 หรือยีน VP

ในการวิเคราะห์หา Poly A signal (AATAAA) ซึ่งเป็นบริเวณที่ mRNA จะถูกตัดออก หรือมีการสิ้นสุดการสร้าง mRNA ในลำดับเบสของไวรัส HPV ปรากฏว่าพบลำดับเบสนี้จำนวน 6 ตำแหน่ง ลำดับเบส AATAAA ชุดแรกพบที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,639 ซึ่งอยู่ห่างจากรหัสหยุดของ ORF1 มาทางขวามือจำนวน 219 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งน่าจะเป็นสัญญาณ Poly A ที่ทำหน้าที่ได้ สำหรับ AATAAA ชุดที่สองอยู่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 3,179 ซึ่งอยู่บริเวณเดียวกับรหัสหยุดของ ORF2 ดังนั้น Poly A ณ ตำแหน่งนี้ไม่น่าทำงานได้ ส่วน AATAAA ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 3,621 น่าจะทำหน้าที่เป็นสัญญาณหยุดการถอดรหัสของ ORF2 นอกจากนี้ยังมี poly A อีกสองชุดที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 4,458 และ 5,105 อยู่ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสมจึงไม่น่าทำหน้าที่ได้ ส่วน AATAAA ชุดท้ายพบที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 6,050 ซึ่งอยู่ห่างจากรหัสหยุดของ ORF3 จำนวน 35 เบส และอยู่ใกล้กับลำดับเบส CAYTG (CAAATG) ที่ตำแหน่ง 6,028-6,033 และ G/T-rich sequence (GTGGTTT) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 6,077-6,093 ดังนั้นบริเวณนี้น่าจะเป็น Polyadenylation site ของอาร์เอ็นเอสังเคราะห์ (mRNA) ของไวรัส HPV

Potential splicing site

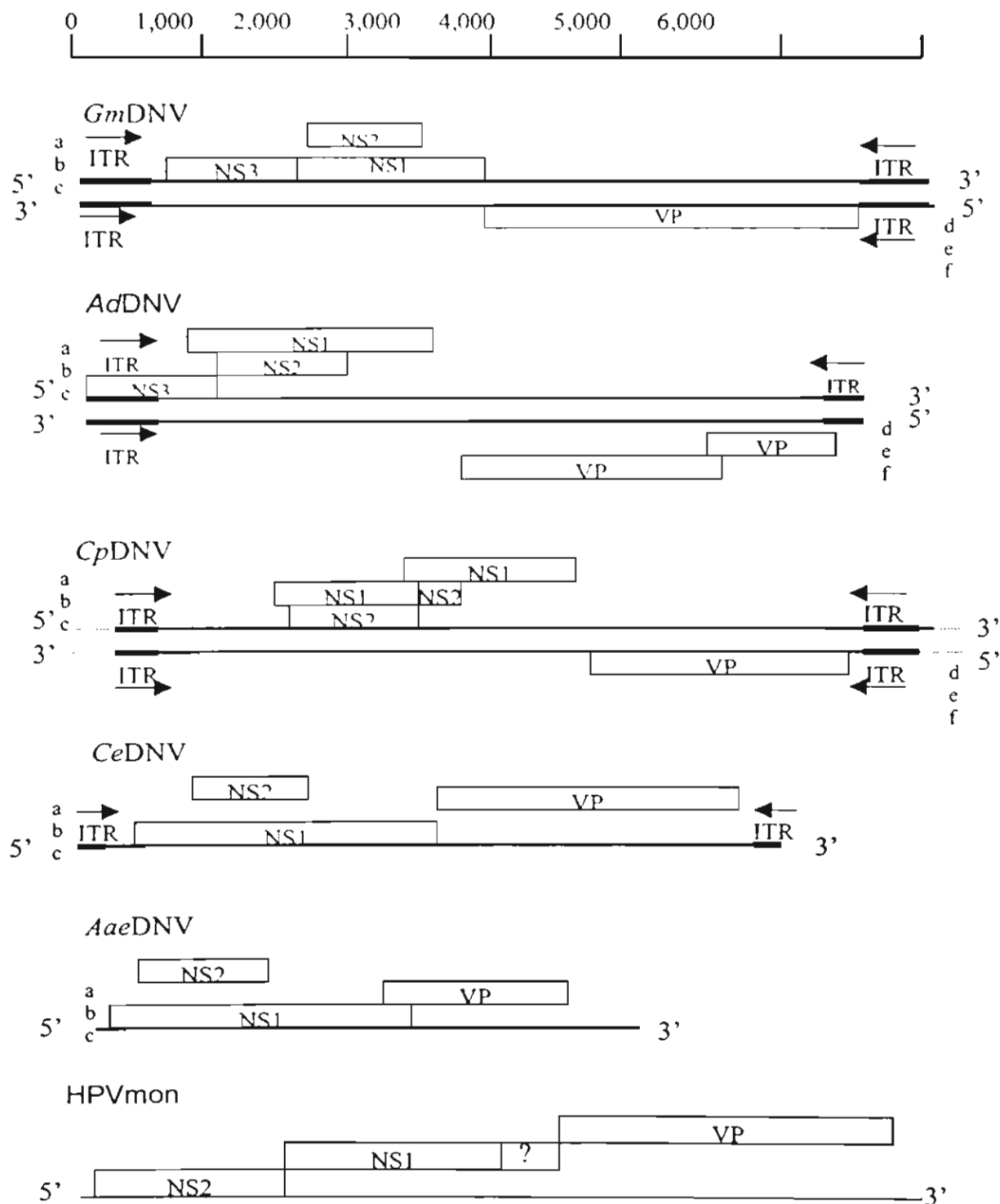
เมื่อใช้ลำดับเบสของ consensus สำหรับ 5' donor, 3' acceptor sites (38) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ A/CAGGTA/GAGT และ (T/C)NCAGGC/T พบว่า putative 5' donor site D1, AAGGTGACT ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 144-152 และ 5' donor site D2, AAGGTGAAG ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 4,894-4,903 และ 3' acceptor sites A1 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น TTTCGCCAGGT ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1,408-1,418 และ 3' acceptor sites A2 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น TCTACAGGT ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 4,781-4,789 (รูปที่ 8) นอกจากนี้ยังพบลำดับเบส CAGG อีกหลายตำแหน่งในยีนนี้

การวิเคราะห์ปลาย 3' และปลาย 5' ของลำดับเบสที่ไม่ใช่ยีน (Non-coding sequences)

ลำดับเบสที่ไม่ใช่ยีนตรงปลาย 3' ของดีเอ็นเอไวรัส มีความยาว 133 เบส ถ้าการทำนายโปรโมเตอร์ P1 ถูกต้อง ที่ปลาย 5' มีจำนวนเบสที่ไม่ใช่ยีน จำนวน 75 เบส ทั้งสองปลายประกอบด้วยลำดับเบสที่มีลักษณะเป็น Palindromic sequence สายสั้นๆ ขนาด 6-8 เบส ซึ่งสามารถจับกันเป็นโครงสร้างรูปก๊ีบ (Hair-pin) ที่ทำให้เกิดการจับคู่เบสได้ (รูปที่ 8) ซึ่งลักษณะเช่นนี้มีในลำดับเบสของพาร์โวไวรัสต่างๆ ไป (41) อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของไวรัส HPV ที่ปลายทั้งสองไม่พบโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นแขน Y- และ T-type หรือ โครงสร้างรูปก๊ีบสายยาวๆ (Long hair-pin) เหมือนกับพาร์โวไวรัสที่พบในแมลง (45) ที่ปลาย 5' ของดีเอ็นเอไวรัส HPV ประกอบด้วย ลำดับเบสซ้ำแบบ direct repeat ขนาด 10-18 เบส (รูปที่ 8) ซึ่งการมีลำดับเบสซ้ำแบบนี้พบในจีโนมของ AaeDNV, Aa/DNV, JcDNV และ พาร์โวไวรัสในสัตว์ฟันแทะ (46) การวิเคราะห์ลำดับเบสของจีโนมไวรัส HPV พบว่าไม่มีเบสคู่สมของปลาย 5' และปลาย 3' หรือมีลักษณะเบสซ้ำแบบ Inverted repeat ลักษณะเช่นนี้จะเหมือนกับจีโนมของไวรัสในกุง และแมลง (*Brevidensovirus*) และพาร์โวไวรัสในสัตว์มีกระดูกสันหลังซึ่งปลาย 5' และปลาย 3' ไม่มีเบสคู่สมกัน (44, 45)

การจัดเรียงยีนในจีโนมของไวรัส HPV (Organization of HPV genome)

การจัดเรียงยีนในจีโนมของไวรัส HPV เป็นแบบ monosense genomic organization กล่าวคือ ยีนต่างๆ อยู่บนสายดีเอ็นเอสายเดียวกัน แต่การจัดเรียงยีนในจีโนมของไวรัส HPV จะแตกต่างจากพาร์โวไวรัสอื่นๆ เรื่องลำดับของยีนที่จัดเรียงตัวกันบนจีโนมจะเรียงจาก ORF1 (NS2), ORF2 (NS1), และท้ายที่สุดเป็น ORF3 (VP) ในขณะที่พาร์โวไวรัสอื่นๆ มีการจัดเรียงยีนดังนี้ Left ORF (NS1), Mid ORF (NS2), และ Right ORF (VP) การจัดเรียงยีนใน จีโนมของพาร์โวไวรัสต่างๆ แสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 การเปรียบเทียบ Genomic organization จีโนมของ HPVmon กับพาร์โวไวรัสอื่นๆ ที่พบในแมลง GmDNV: *Galleria mellonella* (Genus Densovirus, subgroup A), AdDNV : *Acheta domesticus* (Genus Densovirus, subgroup B), CpDNV : *Culex pipiens* (Genus Densovirus, subgroup C), CeDNV : *Casphalia extranea* (Genus Iteravirus) , AaeDNV : *Aedes aegypti* (Genus Brevidensovirus), ITR : Inverted terminal repeat

การเปรียบเทียบยีนของไวรัส HPV กับยีนของโปรตีนยับยั้งกระบวนการ apoptosis

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NS1 พบว่ามีส่วนหนึ่งของยีน (ประมาณ 300 กรดอะมิโน) มีความคล้ายคลึงกับยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของ *Homo sapeins* (รูปที่ 16) สำหรับความคล้ายคลึงของยีน NS2 และ VP กับยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งกระบวนการ apoptosis แสดงในรูปที่ 17 และ 18

FLAMEdelta I-FLICE3 Flamebeta HPVApo	MSAEVIHQVEEALDTDEKEMLLFLCRDVAIDVPPNVRDLLDILRERGLKLSVGDLAELLY MSAEVIHQVEEALDTDEKEMLLFLCRDVAIDVPPNVRDLLDILRERGLKLSVGDLAELLY MSAEVIHQVEEALDTDEKEMLLFLCRDVAIDVPPNVRDLLDILRERGLKLSVGDLAELLY MMQRSDDIWNVNYMYDIQNLKLVIEKLNIMEYSLOQADYIEGNTWIGEDLWNTNSAYMKT * * : : : : : * : : .
FLAMEdelta I-FLICE3 Flamebeta HPVApo	RVRRFDLLKRIKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIIFLMKDYM RVRRFDLLKRIKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIIFLMKDYM RVRRFDLLKRIKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIIFLMKDYM IKRGTDRIYYWYIQRHISNRASLVGQSRQICIDGAYMMFKIENMKVESRPKTIPIVSKNK * * . . . : : . . : : : : : * : * : * * : . . . * : . . .
FLAMEdelta I-FLICE3 Flamebeta HPVApo	GRGKISKEKSFLD---LVVELEKLNLVAPDQDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYKQSVQG GRGKISKEKSFLD---LVVELEKLNLVAPDQDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYKQSVQG GRGKISKEKSFLD---LVVELEKLNLVAPDQDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYKQSVQG TVQWIQDFMDI IHGNLPKINCMMLYGNSNSGKTQLIEALTGLINTAIMTNVGDGGTFHFS * : : * : . * : * : . . : * : . . .
FLAMEdelta I-FLICE3 Flamebeta HPVApo	AGTSYRNVLQAAIQKSLKDPSNNFRLHNGRSKEQRLKEQLGAQQEPVKKSIQSEAFPLPQ AGTSYRNVLQAAIQKSLKDPSNNFRLHNGRSKEQRLKEQLGAQQEPVKKSIQSEAFPLPQ AGTSYRNVLQAAIQKSLKDPSNNFR----- NITEMSTIVVGNETKIRTQTIEQWKGLCGGENITMPMKYKEHKTHMFRKPVFLTNQHHLPL * * . . . : : :
FLAMEdelta I-FLICE3 Flamebeta HPVApo	SIPEERYKMKSKPLGICLIIDCIGNETENAHSWIFTLN-----SMA--TCMIGTAE SIPEERYKMKSKPLGICLIIDCIGNETELLRDFTSLGYEVQKFLHLSMHGISQILGQFA SIPEERYKMKSKPLGICLIIDCIGNETELCGVRGPAGG-----QQPLGGGW VEISNYDDRKAIEENRCFMKYVELGSEAVNAHIKFPNRMIPKKNPELTQFILACMQYVHL .: . * : : : : * : :
FLAMEdelta I-FLICE3 Flamebeta HPVApo	FLPR-----RNIMFG--CSTL----- CMPEHRDYDSFVCVLVSRGGSQSVYGVQDTHSGLPLHHIRRMFMGDSCPYLAGPKPMFFI ASDE-----ECGIQGSEARAVHSSPRS-- NYMDR-----ADKKFKIGFNNFMTCCCLRTAKI * : :
FLAMEdelta I-FLICE3 Flamebeta HPVApo	----- QNYVVSEGQLEDSSLLEVDGPAMKNVEFKAQKRGLCTVHREADFFWSLCTADMSLLEQSH ----- CTRTFDFFPGQ-----
FLAMEdelta I-FLICE3 Flamebeta HPVApo	----- SSPSLYLQCLSQKLRQERKRPLDLHIELNGL ----- -----

รูปที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนส่วนหนึ่งของยีน NS1 ไวรัส (300 aa) กับยีนยับยั้งการเกิด apoptosis (I-FLICE และ FLAME) ของ *Homo sapeins*


```

FLAMEdelta      -----MSAEVIHQVEEALDTDEKEMLL-----FLCRDVAIDVVPPNV
I-FLICE3        -----MSAEVIHQVEEALDTDEKEMLL-----FLCRDVAIDVVPPNV
Flamebeta       -----MSAEVIHQVEEALDTDEKEMLL-----FLCRDVAIDVVPPNV
VPHPV-818       MSPTRKGGNYASKHFQSKRKNKLARVKDLLASKKKERRFKGKGNTLSEKPSTSEWNDPV
                  : : :*: * :*: * :      *... : .      *

FLAMEdelta      RDLLDILRERGKLSVG-----DLAELLYRVRFRDLLKR-----
I-FLICE3        RDLLDILRERGKLSVG-----DLAELLYRVRFRDLLKR-----
Flamebeta       RDLLDILRERGKLSVG-----DLAELLYRVRFRDLLKR-----
VPHPV-818       RQRFPELEQEERNTFAGLLAIEAAPDQRLGRDNNNQLALVQRDTRVAVRQSTNRGEALE
                  *: :  *... : ...      :      *: *  *... : :

FLAMEdelta      ILKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIFLMKDYMGRGKISKEKS
I-FLICE3        ILKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIFLMKDYMGRGKISKEKS
Flamebeta       ILKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIFLMKDYMGRGKISKEKS
VPHPV-818       VVRAANEAIRSGGDRLAELVQAYASGFSDESTIVEVRQEDRVQRDIQEEGQNLLAIEIA
                  :::  .:*. :  * ..*. *   : :  * : : . :   : :  *:.. : : * :

FLAMEdelta      FLD---LVVELEK-----LNLVAP-DQLDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYQSVQG
I-FLICE3        FLD---LVVELEK-----LNLVAP-DQLDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYQSVQG
Flamebeta       FLD---LVVELEK-----LNLVAP-DQLDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYQSVQG
VPHPV-818       LQEPSSVAQQLDQERTPAVKRAELTAEERIERIENAKKYIEEVIEETNQELQEQRQE
                  : :   :. :*: :      *:.* : : : :*:.. * *... :*: :   :*. *

FLAMEdelta      AGTSYRNVLQAAIQKSLKD-----PSNNFRLHN
I-FLICE3        AGTSYRNVLQAAIQKSLKD-----PSNNFRLHN
Flamebeta       AGTSYRNVLQAAIQKSLKD-----PSNNFR---
VPHPV-818       VSAAAEDTMNTEAPVPMETSESGATAAPQQRAAAGGGGSGGGGESAGYGKNPSDSFQRHR
                  .... :. : : :      ...      **..*

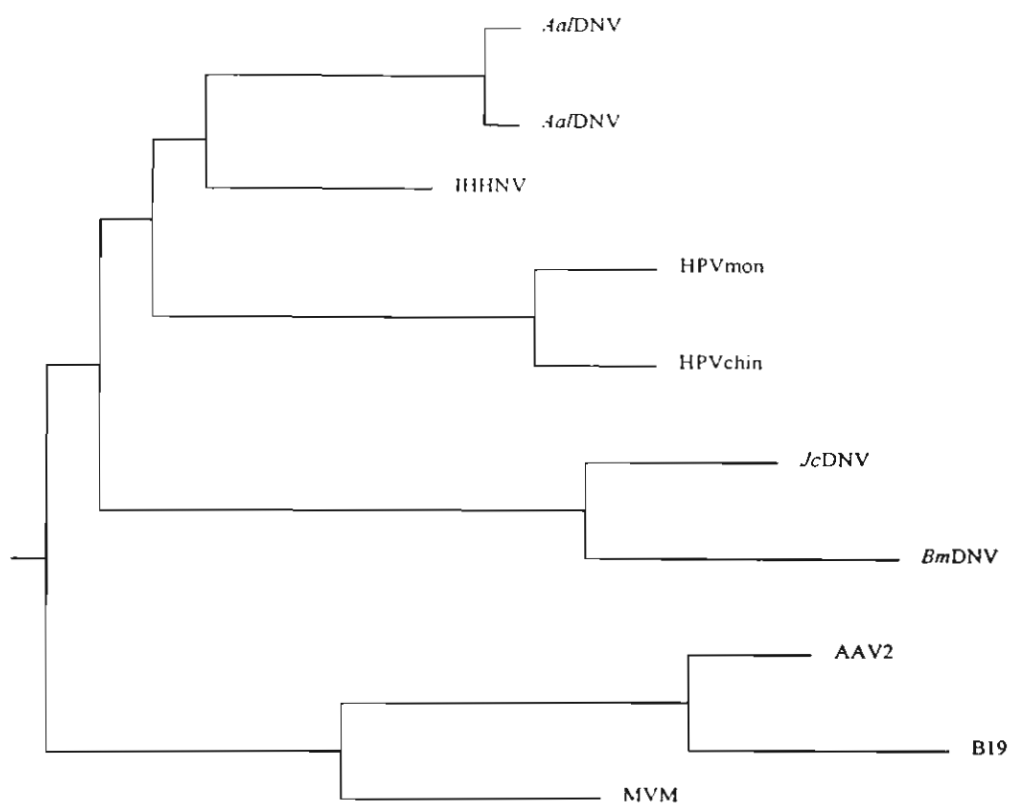
```

รูปที่ 18 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนส่วนหนึ่งของยีน VP ไวรัส กับยีนยับยั้งการเกิด apoptosis (I-FLICE และ FLAME) ของ *Homo sapeins*

การสร้าง Phylogenetic trees

เพื่อจะเปรียบเทียบว่าไวรัส HPV มีความใกล้เคียงหรืออยู่ในกลุ่มใดของ Parvoviridae family จึงมีการสร้าง Phylogenetic trees ขึ้นโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของจีโนมทั้งหมด ลำดับกรดอะมิโนของ NTB-binding and helicase domain, NS1, และ VP gene ปรากฏว่า ไวรัส HPV มีความใกล้ชิดกับพาร์โวไวรัสในกุ่ม (IHNV) และพาร์โวไวรัสในยุง (AaeDNV, Aa/DNV)

Phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ NTP-binding and helicase domain จำนวน 119 กรดอะมิโน (รูปที่ 19, 21) ข้อมูลลำดับเบสของ ข้อมูลลำดับ NS1 (รูปที่ 22) และข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของยีน VP (รูปที่ 23) แสดงให้เห็นว่า ไวรัส HPV มีความใกล้ชิดกับพาร์โวไวรัสในกุ่ม (IHNV หรือ PstDNV และในยุง (AaeDNV และ Aa/DNV) มากกว่าพาร์โวไวรัสในแมลง (JcDNV, CeDNV, BmDNV) และพาร์โวไวรัสในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (B19, MVM, AAV2) ข้อมูลนี้อาจจัดให้ไวรัส HPV อยู่ในกลุ่ม *Densoviridae* subfamily



รูปที่ 19 Phylogenetic tree ของกรดอะมิโน จำนวน 119 ตัวในบริเวณของ NTP-binding and helicase domain จากข้อมูลในรูปที่ โดยโปรแกรม GCG

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

```

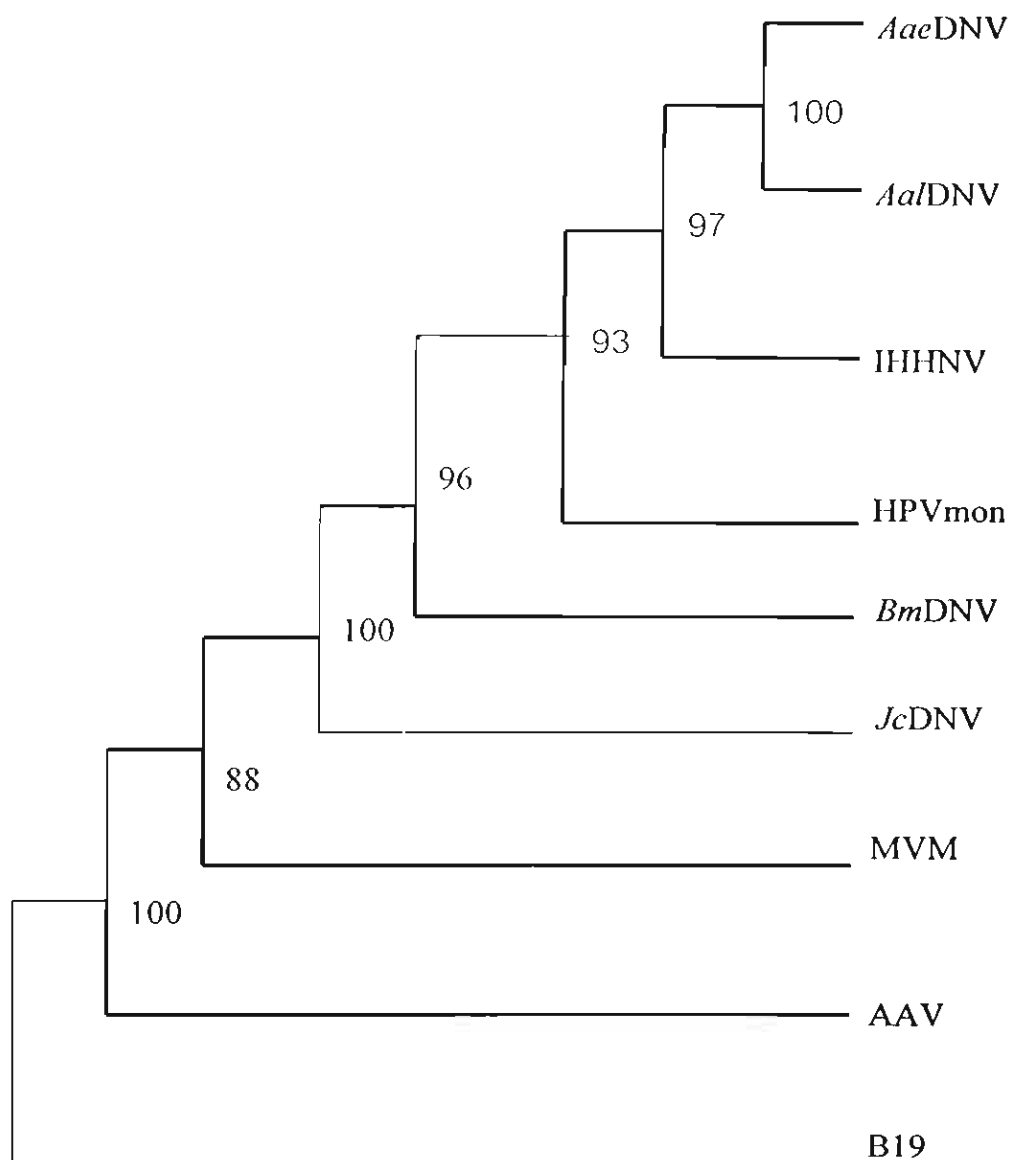
Jc      -----VNVLDRRI PKLNAFLIISPPSAGKNFFF
Mpe     -----YNVIDKRVPKLSICIKSPPSAGKNFFF
Bm      -----YEILEKKHQKTNTFQIVSPPSAGKNFFI
Ce      -----YEILEKKHQKTNTFQIVSPPSAGKNFFI
Bge     -----VDTLECNIPKRNCFVVCSPPSAGKNFFF
Pig     -----LAWLGKELGKRNTIWLFGPPTTGKTNIA
Simian  -----LAWVQKQLGKRNTIWLFGPPSTGKTNIA
B19     -----LRWIDKKCKGKNTLWFGPPSTGKTNIA
AAV     -----LGWATKKFGKRNTIWLFGPATGKTNIA
MVM     -----CCVLNRQGGKRNTVLFHGPASTGKSI IA
Mouse   -----CCVLNRQGGKRNTVLFHGPASTGKSI IA
Feline  -----ACVLNRQGGKRNTVLFHGPASTGKSI IA
Aae     -----EI IKTKRYKKINGMVLEGITNAGKSLIL
Aal     -----EI IKPKRYKKINGMVLEGITNAGKSLIL
INNHV   -----IIVADKKLDKINTLVLQGPSTGKSLTI
HPV     -----MDI IHGNLPKINCMMLYGNSNSGKTQLI
          * * * * *

Jc      DMIFGLLSY-----GQLGQANRHNLF AFQEAPNK-RVLLWNEPNYESSLTDTIKMMFG
Mpe     DAVASYLLSY-----GMFGTANKNNNFSWADGAGK-RLVLWNEPNYEQYHIEKIKELLG
Bm      ETVLAFYWNT-----GVIQNFNRYNNFPLMEAVNR-RVNYWDEPNFEPDATETLKKLFA
Ce      ETVLAFYWNT-----GVIQNFNRYNNFPLMEAVNR-RVNYWDEPNFEPDATETLKKLFA
Bge     DGVDYDYLNS-----GQMNNPNKYNQFAYQDCHNR-RIIWNENPHYEPREMENLKMFLFA
Pig     MSLATAVPSY-----GMVNWN--ENFPFNDVPHK-SILWDEGLIKSTVVEAAKAILG
Simian  MSLASAVPTY-----GMVNWN--ENFPFNDVPHK-SILWDEGLIKSTVVEAAKAILG
B19     MAIAKAVPVY-----GMVNWN--ENFPFNDVAGK-SLVVWDEGLIKSTIVEAAKAILG
AAV     EAIHTVPFVY-----GCVNWTN--ENFPFNDVAGK-SLVVWDEGLIKSTIVEAAKAILG
MVM     QAIAQAVGNV-----GCYNAAN--VNFPFNDCTNK-NLIWVEEAGNFGQQVNFKAICS
Mouse   QAIAQAVGNV-----GCYNAAN--VNFPFNDCTNK-NLIWVEEAGNFGQQVNFKAICS
Feline  QAIAQAVGNV-----GCYNAAN--VNFPFNDCTNK-NLIWVEEAGNFGQQVNFKAICS
Aae     DNLLAMVKP-----EEIPRERDNSGFHLDQVPGA-GSILFEEPMITPVNVGTWKLLLE
Aal     DNLLAMVKP-----EEIPRERDNSGFHLDQVPGA-GSILFEEPMITPVNVGTWKLLLE
INNHV   GALLGKLNT-----GLVTRTGDSTNTHLQNLIGK-SYALFEEPRISQITVDDFKLLFE
HPV     EALTGLINT-----AIMTNDGDDGTFHFSNITEMSTIVVGNETKIRTQTIEQWKGKCG
          : * : * :

Jc      GDPYTVRVKNRM-DAHVKRTPV IILTNNTPVPMYETA-----
Mpe     GDTTRIHVKYAN-DVSVQVRVPI IILTNNHLNII S-----
Bm      GTSLKATVKFKQ-EANVQKTPV IITAN-YDKFTKEVWDDRI-----
Ce      GTALKATVKFKQ-EANVQKTPV IITAN-HDKFTKEVWDDRI-----
Bge     GDNLSANVKCKP-QANVKRTPV IIVLNSLPNFCQQTAFN-----
Pig     GQNCRVQDKNKG-SVEVQGT PVLITSNNDMTRVVS GNTVTL-----
Simian  GQPCRVDQKNKG-SVEVSGT PVLITSNNDMTRVVC GNTVTL-----
B19     GQPTRVDQKMRG-SVAVPGVPV VITSNGDITFVVS GNTTT-----
AAV     GSKVRVDQKCKS-SAQIDPT PVI VTSNTNMCAVIDGNSTT-----
MVM     GQTIRIDQKGKG-SKQIEPT PVI MTNENITVVRIGCEER-----
Mouse   GQTIRIDQKGKG-SKQIEPT PVI MTNENITVVKIGCEERPEHTQPI RDRM
Feline  GQTIRIDQKGKG-SKQIEPT PVI MTNENITVVRIGCEERPEHTQPI RDRM
Aae     GKTIKTDVKNKD-KEPIERTPTWITTATPITNNIDMNETS-----
Aal     GKTIKTDVKNKD-KEPIERTPTWITTATPITNNVHMNET-----
INNHV   GSDLEVNIKHQE-SEIMGRIP I FISTNKDIDYVVPADGK-----
HPV     GENITMPMKYKEHKTHMFRKPVFLTNQHHLPLVEISNYDDR-----
          * * : * :

```

รูปที่ 20 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ประมาณ 119 ตัวในบริเวณของ NTP-binding and helicase domain โดยโปรแกรม Clustal X



รูปที่ 22 Parsimony tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับเบสในส่วนของยีน NS1 โดยโปรแกรม Phylip