

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ PDF/54/2543

ชื่อโครงการ การศึกษาจุดผ่านเหล่านีในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบ ที่มีผลต่อการจับตัวของ
ไวรัสกับเซลล์ โดยใช้ไวรัสลูกผสมเด็งกีและไข้สมองอักเสบ

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน ศิริธร บุตรเพชร สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.มหิดล
25/25 พุทธมณฑล4 นครปฐม 73170 E-mail Address: sirit_b@lycos.com

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

วัตถุประสงค์: เพื่อสร้างไวรัสลูกผสมระหว่างไวรัสเด็งกีและไวรัสไข้สมองอักเสบ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาจุดผ่านเหล่านีในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบ ที่มีผลต่อการจับตัวของไวรัสกับเซลล์

การดำเนินงานวิจัยโดยทำการสร้าง DNA ที่มียีนส์โครงสร้าง prM-E ของไวรัสไข้สมองอักเสบ สายพันธุ์ Beijing-1 จาก RNA ด้วยวิธี reverse transcription and polymerase chain reaction ได้ชิ้น DNA 2 ขนาดคือ 1952 และ 2021 เบส ซึ่งชิ้น DNA ขนาด 2021 เบสจะมี signal sequence ที่อยู่บน prM ยีนส์เป็นของไวรัสไข้สมองอักเสบ จากนั้นทำการ clone ชิ้น DNA ทั้งสองที่ได้เข้าสู่ intermediate dengue vector เพื่อทำการอ่านลำดับเบส ซึ่งก็พบว่ามียีนส์จุดผ่านเหล่านี 2 จุดในโปรตีนอีที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1346 และ 1371 การสร้าง DNA ลูกผสมโดยการ ligation ระหว่าง intermediate clone ที่ได้กับชิ้น DNA (NS1 to 3' end non-coding region) จาก pD2-IC-P48 (ไวรัสชนิดรุนแรง) นั้นไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากพบว่า DNA ลูกผสมมีส่วนของยีนส์ NS1 ขาดหายไป แต่เมื่อใช้ pD2-IC-VE50 (ไวรัสชนิดไม่รุนแรง) มาสร้าง DNA ลูกผสมแทนก็สามารถสร้าง DNA ลูกผสมได้สำเร็จคือ pD2V/JE15 ที่มีชิ้น DNA ขนาด 2021 เบส และ pD2V/JE16 มีชิ้น DNA ขนาด 1952 เบส ประกอบอยู่ จากนั้นนำ RNA ที่สร้างได้จากการถ่ายแบบในหลอดทดลองนำไป transfect เข้าสู่เซลล์ BHK-21 แล้วตรวจการสร้างไวรัสโปรตีนในเซลล์ได้ด้วยวิธี indirect immuno-fluorescence assay พบว่าเซลล์ที่ transfect ด้วย pD2V/JE16 ไม่มีการสร้างไวรัสโปรตีน ในขณะที่เซลล์ที่ transfect ด้วย pD2V/JE15 ให้ผลบวก ไวรัสลูกผสม D2VE/JE15 ที่ให้ plaque แบบขอบไม่ชัดเจน และมีขนาดใกล้เคียงกับ plaque ของ D2IC-VE50 ไวรัส ซึ่งมีลักษณะขอบชัดเจน เมื่อทำการเลี้ยงในเซลล์ VERO หรือ LLC-mk2 ไวรัสลูกผสม D2VE/JE15 นี้ เจริญเติบโตได้ดีทั้งในเซลล์ VERO และ LLC-mk2 โดยมีระดับไวรัสประมาณ 10^5 pfu/ml

จากการทดลองนี้พบว่าจุดผ่านเหล่านี 2 จุดในโปรตีนอีเป็นการผ่านเหล่านีที่เกิดขึ้นในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบที่นำมาใช้ในการทดลอง ไม่ได้เกิดจากการความไม่เที่ยงตรงของเอ็มไซม์ที่ใช้ในการสร้าง DNA และเราสามารถสร้างไวรัสลูกผสมระหว่างไวรัสเด็งกีและไวรัสไข้สมองอักเสบ ที่มี signal sequence เป็นของไวรัสไข้สมองอักเสบได้สำเร็จ และการที่ไวรัสลูกผสมเติบโตได้ดีในเซลล์นั้น แสดงว่าเราสามารถนำวิธีการสร้างไวรัสแบบนี้ ไปใช้ในการศึกษาขั้นการเปลี่ยนแปลงจุดผ่านเหล่านีต่อไปได้ อย่างไรก็ตามก็จะต้องทำการศึกษาเกี่ยวกับการจับตัวของไวรัสลูกผสมนี้กับเซลล์ก่อน เพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบ

คำหลัก: ไวรัสเด็งกี ไวรัสไข้สมองอักเสบ ไวรัสลูกผสม โปรตีนโครงสร้าง

Abstract

Project code: PDF/54/2543

Project Title: Study of effects of mutations of E protein on cell binding activity using recombinant Dengue/Japanese encephalitis

Investigator: Siritorn Butrapet Institute of Science and Technology, Mahidol University, 25/25 Puthamonthon 4, Nakornpathom, 73170 E-mail Address: sirit_b@lycos.com

Project period : 2 years

Objective of this study is to construct recombinant Dengue and Japanese encephalitis virus(JE) for further use as a tool for mutagenesis study of the viral E protein.

DNA fragments contain structural genes (PrM and E) of JE strain Beijing-1 were generated from RNA of JE virus using reverse transcription and polymerase chain reaction, and further cloned into intermediate Dengue (DEN) backbones prior to sequencing. The DNA fragment of 1952 and 2021 were generated, and the 2021 fragment contains cleavage sequence of JE virus upstream of PrM gene. Two point mutations in the E gene (nt 1346 and 1371) were found by sequencing. Construction of recombinant DEN/JE DNA by ligation of Den genes (from NS1 to 3' end non-coding region) of pD2-IC-P48 (virulent virus) to the intermediate clone was not successful, and all of the clones showed deletion in NS-1 gene. However, several recombinant clones can be successfully derived using pD2-IC-VE50 (attenuated virus) as backbone. The recombinant pD2V/JE15 contains JE fragment 1952 and pD2V/JE16 contain JE fragment 2021. RNA was transcribed from the DNA by in vitro transcription. After transfection to BHK-21 cell using electroporation, no virus protein was detected from pD2V/JE16 transfected cells using indirect Immunofluorescence assay. However, pD2VE/JE15 infected cells showed positive result. Recombinant D2VE/JE15 viruses showed hazy plaque with the size similar to that of D2IC/VE50 virus in both Vero and LLC-mk2 cell. These D2VE/JE15 viruses grew up to about 10^5 pfu/ml in both Vero and LLC-mk2 cell but not in C6/36 cell.

In conclusion, two point mutation were found in the E gene of every clone indicate these two mutations were occurred in JE genome and were not caused by an error of polymerase enzyme. Recombinant DEN/JE viruses which contain signal sequence of JE virus were recovered from transfection. Since these viruses can grow to high titer in both Vero and LLC-mk2 cell, so these viruses can be use for mutagenesis study. However, binding characteristic of these recombinant D2VE/JE15 viruses should be investigated first.

Keywords: Dengue virus, Japanese encephalitis virus, Recombinant virus, Structural genes