



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาจุดผ่าเหล่าในโปรตีนฮีของไวรัสไข้สมอง
อักเสบที่มีผลต่อการจับตัวของไวรัสกับเซลล์ โดยใช้
ไวรัสลูกผสมเด็งกีและไข้สมองอักเสบ

โดย : ศิริธร บุตรเพ็ชร และคณะ

กรกฎาคม 2545



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาจุดผ่าเหล่าในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมอง
อักเสบที่มีผลต่อการจับตัวของไวรัสกับเซลล์ โดยใช้
ไวรัสลูกผสมเด็งกีและไข้สมองอักเสบ

โดย : ศิริธร บุตรเพชร

วันที่	5 มิ.ย. 2546
เลขทะเบียน	00033
เลขเรียกหนังสือ	PDF 43

0054

กรกฎาคม 2545

ผู้อำนวยการกองสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
จตุจักร กรุงเทพฯ 10400
โทร. 298-0455 โทรสาร 298-0476
Home page : <http://www.trf.or.th>
E-mail : trf-info@trf.or.th



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาจุดผ่านเหล่านีในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบที่มีผลต่อการจับตัวของไวรัสกับเซลล์ โดยใช้ไวรัสลูกผสมเด็งกีและไข้สมองอักเสบ

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร. ศิริธร บุตรเพชร

โครงการวิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ศ. สกล พันธุ์ยิ้ม

สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอกที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ. สกต พันธุ์ยิ้ม นักวิจัยพี่เลี้ยงที่ให้คำแนะนำตลอดการทดลอง นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.เกียรติคุณ ณัฐ ภมรประวัติ ที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยชิ้นนี้มาตลอด ผู้วิจัยได้รับ Intermediate Dengue Vector DNA และคำแนะนำเกี่ยวกับการสร้าง recombinant clone จาก Dr. Richard Kinney และ Dr. Claire Kinney, Center for Disease Control, U.S.A.

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ของสถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.มหิดล ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกการดำเนินการทดลองนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ PDF/54/2543

ชื่อโครงการ การศึกษาจุดผ่าเหล่าในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบ 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 เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาจุดผ่าเหล่าในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบ 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 ที่อยู่หน้า prM ยีนส์เป็นของไวรัสไข้สมองอักเสบ จากนั้นทำการ clone ชิ้น DNA ทั้งสองที่ได้เข้าสู่ intermediate dengue vector เพื่อทำการอ่านลำดับเบส ซึ่งก็พบว่ามียูจุดผ่าเหล่า 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 ที่ได้ให้ 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

จากการทดลองนี้พบว่าจุดผ่าเหล่า 2 จุดในโปรตีนอีเป็นการผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบที่นำมาใช้ในการทดลอง ไม่ได้เกิดจากการความไม่เที่ยงตรงของเอ็มไซม์ที่ใช้ในการสร้าง DNA และเราสามารถสร้างไวรัสลูกผสมระหว่างไวรัสเด็งกีและไวรัสไข้สมองอักเสบ ที่มี signal sequence เป็นของไวรัสไข้สมองอักเสบได้สำเร็จ และการที่ไวรัสลูกผสมเติบโตได้ดีในเซลล์นั้น แสดงว่าเราสามารถนำวิธีการสร้างไวรัสแบบนี้ ไปใช้ในการศึกษาขั้นการเปลี่ยนแปลงจุดผ่าเหล่าต่อไปได้ 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

โครงการ การศึกษาจุดผ่าเหล่าในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบ ที่มีผลต่อการจับตัวของไวรัสกับเซลล์ โดยใช้ไวรัสลูกผสมดั้งเดิมและไข้สมองอักเสบ

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

บทนำ

เชื้อไวรัส Japanese encephalitis (JE) เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคไข้สมองอักเสบ และ เชื้อไวรัสเด็งกี (Dengue virus, DEN) ที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออก จัดอยู่ในกลุ่ม Flavivirus เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็ก ประมาณ 50 nm มีสารพันธุกรรมเป็น RNA แบบ positive strand มีขนาดประมาณ 11 kb มีการเรียงตัวของยีนตามลำดับดังนี้ 5'-NC -C- PrM- E-NS1-NS2A-NS2B- NS3- NS4A- NS4B- NS5-3'-NC ส่วนโปรตีนของไวรัสจะเริ่มสร้างจากจุดเริ่มเพียงจุดเดียว (single open reading frame) เป็นโปรตีนแบบ polyprotein ก่อน ต่อมาจึงมีการตัดเป็นส่วนย่อย (processing) โดยใช้เอ็นไซม์หลายชนิด (1,2)

กลไกการก่อโรคสมองอักเสบโดยไวรัส JE ยังไม่สามารถอธิบายได้แน่ชัด มีผลงานวิจัยรายงานว่า JE มีความจำเพาะ (specific tropism) ในการทำให้เกิดการติดเชื้อ (infect) ในเซลล์สมองที่กำลังพัฒนาของหนูทดลอง (developing neuron) ได้ดีกว่าเซลล์สมองที่พัฒนาสมบูรณ์ (mature neuron) แล้ว (3,4,5) ผลการศึกษาโดยใช้ DEN-1 พบว่าระดับความรุนแรงของการเกิดอาการสมองอักเสบในหนูทดลอง (neurovirulence) มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนของไวรัสและการเกิด apoptosis (6) การศึกษาส่วนใหญ่ที่เกี่ยวกับความรุนแรงของเชื้อ มักจะเป็นการศึกษาเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงในระดับต่าง ๆ กันในสัตว์ทดลอง การศึกษาโดยใช้วิธี monoclonal anti-E neutralized escape variants และวิธีอื่นๆ พบว่าบริเวณจุดจำเพาะที่มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อไวรัส (specific determinant of virulence) ส่วนมากจะอยู่บนโปรตีนอี (E) ซึ่งเป็น โปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ที่อยู่บนส่วนเปลือกของไวรัส (7,8,9,10,11,12).

โปรตีนอี เป็นโปรตีนที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการสร้างภูมิคุ้มกัน (Dominant antigen) ต่อไวรัส ทั้งในด้านการสร้างแอนติบอดี และภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (neutralizing antibody and protective immune response) (13,14,15) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น ตัวจับกับ receptor บนผิวเซลล์ (receptor binding) และ มีส่วนสำคัญในการเกิด membrane fusion ในขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ (16,17) และเป็นโปรตีนสำคัญในการบ่งบอกความรุนแรงของไวรัสอีกด้วย (18) โปรตีนอีประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 493-501 ตัว มีกรดอะมิโน cysteine จำนวน 12 ตัว ซึ่งจะสร้าง disulfide bridges ในโมเลกุลของโปรตีนนี้ (19) การศึกษา antigenic structure โดยใช้ monoclonal antibody (20,21,22,23) และ hydrophilicity profile (24) ทำให้สามารถแสดงโครงสร้างแบบ สองมิติ (two-dimensional model) ของ

(25) โปรตีนอีโต้ ประกอบกับการศึกษาโดยใช้วิธี x-ray crystallography ร่วมกับ การอาศัย computer modelling ทำให้สามารถสร้างโครงสร้างแบบสามมิติได้ (26,27) โปรตีนอีจะจับตัวกันแบบ dimer ในลักษณะ head-to-tail โมเลกุลของโปรตีนอีสามารถแบ่งออก ได้เป็น 3 ส่วน (26,27) ได้แก่ส่วน domain I ประกอบด้วยกรดอะมิโน 128 ตัว มีส่วนที่เป็น glycosylation site และเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ส่วน domain II ประกอบด้วยกรดอะมิโน 171 ตัว เป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นการสร้าง neutralizing antibody และเชื่อว่าเป็น dimerization Domain และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการ fusion activity (28) ส่วน domain III ประกอบด้วยกรดอะมิโน 100 ตัว และเชื่อว่าส่วน lateral surface ของ domain III มีส่วนเกี่ยวข้องกับการ receptor binding (29,30)

ปัจจุบันมีการสร้าง cDNA ของไวรัสหลายชนิดในกลุ่ม flavivirus (31,32,33,34,35) รวมทั้ง cDNA ของเชื้อไวรัส JE (36) มีการใช้ cDNA clone เหล่านี้ในการศึกษา ยีน (genome) ของไวรัส ที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรค (virulence) เช่น การสร้าง heterotypic chimera ระหว่าง Tick-borne encephalitis virus (TBE) และ Dengue-4 (37,38) เพื่อใช้ศึกษาผลกระทบจากจุดผ่าเหล่าในส่วนโปรตีนอีของ ไวรัสTBE และการสร้างไวรัสที่มีความรุนแรงน้อยกว่า cDNA clone ของไวรัสJE (39) และการสร้างไวรัสลูกผสมระหว่างไวรัสโรคไขเหลือง (Yellow fever virus) และไวรัสJE เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นวัคซีน (40) ความก้าวหน้าทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ทำให้มีการสร้างสายดีเอ็นเอ (cDNA) ของไวรัสหลายชนิดรวมทั้งเชื้อไวรัส JE นี้ ซึ่งจะเป็นเครื่องมือสำคัญในการค้นหาบริเวณที่เป็นจุดกำหนดความรุนแรงของไวรัสได้ นอกเหนือไปจากการศึกษายีนของไวรัสที่ไม่ถูก neutralize โดยแอนติบอดี ซึ่งในปัจจุบันก็ยังไม่สามารถบ่งบอกจุดวิกฤตได้แน่ชัด ข้อมูลจากการศึกษายีนของไวรัสสามารถนำมาเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความรุนแรงของไวรัสได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของไวรัส กับกลไกการก่อโรคในเซลล์สมองต่อไปได้ ความรู้ที่ได้นี้ทำให้สามารถเข้าใจถึงกลไกในการเกิดโรค และจะช่วยในการค้นหาหรือสังเคราะห์ยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคไขสมองอักเสบ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการนำวิธีทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ มาใช้ในการสร้างไวรัสลูกผสม (Recombinant virus) ระหว่าง DEN และ JE เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษากลไกการเกิดการติดเชื้อไขสมองอักเสบในระดับโมเลกุลต่อไป งานวิจัยนี้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างไวรัสลูกผสม DEN/JE ที่มีส่วนยีนส์ PrM-E ของJE เข้าไปแทนที่ ในยีนส์ของ DEN-2 สายพันธุ์16681-PDK53 เป็น backbone เนื่องจากไวรัสนี้เป็นสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง(33,43) ไวรัสลูกผสม DEN/JE ที่ได้มาสามารถเติบโตได้ดีในเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยง ถึงแม้ว่าผู้วิจัยยังไม่สามารถทำการสร้างไวรัสลูกผสมที่มีจุดผ่าเหล่าจำเพาะ (site directional mutagenesis) ของโปรตีนอีของJE เนื่องจากช่วงเวลาไม่อำนวย แต่ผู้วิจัยเชื่อมั่นว่าวิธีการสร้างไวรัสลูกผสมที่ประสบผลในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปได้อย่างแน่นอน

วิธีการทดลอง

Virues and cell culture

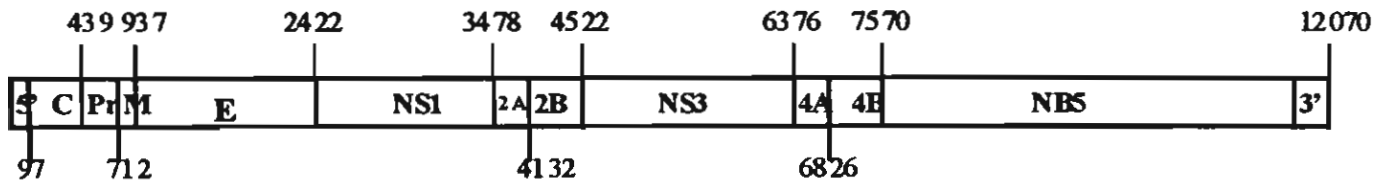
ใช้ไวรัส JE สายพันธุ์ Beijing-1 และ ไวรัส DEN2 strain 16681 ใช้เป็นไวรัส control ตลอดการทดลอง ใช้เซลล์ BHK-21 ในการทำ transfection ใช้เซลล์ Vero และ เซลล์ยุง C6/36 ในการทดสอบไวรัส เซลล์เหล่านี้ เลี้ยงอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Hyclone) ที่มี Fetal calf serum ผสมอยู่ในปริมาณ 5% สำหรับเซลล์ BHK-21 และ เซลล์ Vero จะเลี้ยงที่ 37°C ในบรรยากาศที่มี CO₂ อยู่ด้วย 2% ส่วนเซลล์ยุง C6/36 เลี้ยงที่ 30°C ในบรรยากาศที่ไม่มี CO₂

RNA extraction and Reverse transcription and Polymerase chain reaction (RT/PCR)

การสกัด RNA ของไวรัส JE จาก culture supernatant โดยใช้ QIAamp Viral RNA Kit (Qaigen) หรือใช้สาร Trizol LS (Gibco BRL, Life technologies) โดยปฏิบัติตามคำแนะนำวิธีการใช้จากผู้ผลิต เมื่อได้ RNA แล้วจะนำไปทำ RT/PCR โดยใช้ ชุดเอ็มไซม์ SuperScript, One step RT-PCR system (Gibco BRL, Life technologies) และใช้ Primer 2 คู่ที่มี specific restriction enzyme site อยู่ด้วย primer คู่ที่ 1 (JE-480 5'AAGTTGTCAACGCGTCAGGGGAAGCTTTTGATG3' MluI and cJE-2448 5' CACACCGCCGGCGGCTAAGAAGGCCAAAG3' NgoMI) จะให้ fragment ที่มีขนาด 1952 เบส สำหรับ primer คู่ที่ 2 (JE-ss2 5'AAGCAAAACAAAAGATCCGCGGGCGAAGGCTCAATCATGTGG3' NgoMI and cJE-2448 5' CACACCGCCGGCGGCTAAGAAGGCCAAAG3') ซึ่งจะให้ fragment ที่มีขนาด 2021 เบส เมื่อได้ DNA แล้วต้องทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ ชุด QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) ก่อนการนำไปใช้ในขั้นตอนการ cloning เข้าสู่ Intermediate clone ต่อไป

Construction of Intermediate DEN2/JE clone

ทำการเพิ่มจำนวน DNA ของ Intermediate clones (pD2-IP และ pD2-IV) ที่ได้รับมาจาก Dr. Richard Kinney และ Dr. Claire Kinney Center for Disease Control, USA. และ pD2-IC-P48 pD2-IC-VV50 และ pD2-IC-VE50 เพื่อใช้เป็นตัวรับ (backbone) ส่วนโปรตีนของ JE (รูปที่ 1) นอกจากนี้ต้องทำการปรับปรุง Intermediate clones โดยเพิ่ม SacII site โดยออกแบบ primers ชุดใหม่ให้มี SacII site อยู่ในส่วน 3'-end ของ prM gene และใช้ในการทำ site directed mutagenesis เพื่อให้มี specific restriction enzyme site ใน Intermediate clones เมื่อได้ DNA จากการทำ PCR แล้ว ทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรีย XL1-blue โดยการใช้วิธี Heat shock เมื่อคัดเลือก clone ที่มี restriction enzyme SacII site เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ต่อไป



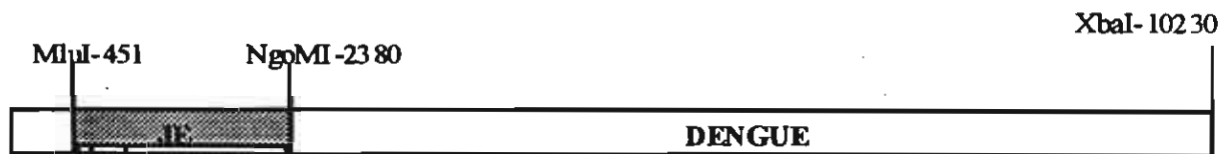
Genome of Dengue virus



pD2-IC-P48 and pD2-IC-VE50



Intermediate Dengue clone ; pD2IP and pD2IV



pD2P/JE12 and pD2VE/JE16



pD2P/JE13 and pD2VE/JE15

รูปที่ 1. รูปแสดง genome ของไวรัส Dengue, Intermediate clone และ DNAลูกผสม ระหว่าง Dengue/JE และ แสดงตำแหน่งของ restriction enzyme ที่ใช้ในการตัดต่อยีนส์

จากนั้นทำการสลับเปลี่ยนส่วนของ DNA ของ JE virus ที่ได้จากการทำ PCR เข้าไปอยู่ใน Intermediate clone ทั้งสองชนิด โดยการ Ligation ระหว่าง Intermediate clones และ JE fragment ที่ได้จากการทำ PCR ที่ 16°C เป็นเวลาหนึ่งคืน แล้วทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรีย XL1-blue โดยใช้วิธี Heat shock และคัดเลือก clone ที่มีชิ้นส่วนยีนของไวรัส JE เพื่อเพิ่มจำนวน DNA แล้วนำไปทำการอ่านลำดับเบส

DNA Sequencing

ใช้ปริมาณ DNA 15 นาโนกรัมต่อหนึ่งเบสที่ต้องการอ่าน เพื่อในปฏิกิริยาต่อครั้ง โดยใช้ DNA sequencing Kit (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, ABI PRISM, PE Applied Biosystems) โดยใช้วิธีตามที่ผู้ผลิตแนะนำ เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จแล้ว ก็ส่ง DNA ที่ได้จากการทำ PCR เพื่อโหลดเจลที่ ศูนย์ปฏิบัติการเครื่องมือรวม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.มหิดล หรือส่งที่หน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ลำดับเบสที่อ่านได้ จะนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ JE virus strain Beijing-1 ที่มีอยู่ใน GENE BANK แล้วเลือกเฉพาะ clone ที่มีลำดับเบสถูกต้องเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

Construction of full-length clone

นำ Intermediate clone DEN/JE มาย่อยด้วย เอ็มไซม์ XbaI และ NgoMI เมื่อย่อยแล้วทำการแยก DNA ให้บริสุทธิ์ DNA ที่ได้หลังจากการย่อยจะมีขนาด 5380 เบส และนำ Full-length clone ของ DEN2 ได้แก่ pD2-IC-P48 pD2-IC-VV50 และ pD2-IC-VE50 มาย่อยด้วย เอ็มไซม์ XbaI และ NgoMI แล้วนำมาแยกชิ้น DNA ที่มีขนาด 7850 เบสที่มียีนส์ NS1-NS5 ของ ไวรัส DEN2 มาใช้เป็น Backbone ในการสร้าง Full-length recombinant DNA โดยการ Ligation ที่ 16°C เป็นเวลาหนึ่งคืน แล้วทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรีย XL1-blue โดยใช้วิธี Electroporation แล้วทำการคัดเลือก clone ที่มียีนส์ของไวรัส JE โดยการย่อยด้วยเอมไซม์เฉพาะ เมื่อได้ clone แล้ว จะต้องทำการเพิ่มจำนวน DNA ให้ได้ปริมาณมาก

การสังเคราะห์ไวรัส RNA (*in vitro* transcription) และ Transfection

DNA ที่จะนำไปใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง RNA จะต้องมีความมากกว่า 2 ไมโครกรัม นำ DNA ไปย่อยด้วยเอมไซม์ XbaI เพื่อทำให้ DNA เป็นเส้นตรงก่อน การทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ RNA ของไวรัสหนึ่งครั้ง จะมีส่วนประกอบสำคัญดังนี้ linearized DNA จำนวนไม่น้อยกว่า 1 ไมโครกรัม m7A-cap, dNTPs และ RNA polymerase enzyme solution (RiboMax Large Scale RNA Production Systems, Promega) เมื่อผสมสารแล้วให้เก็บที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจะนำส่วนหนึ่งของปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบโดยการทำ electrophoresis บน agarose gel เมื่อตรวจพบ RNA แล้ว จึงนำปฏิกิริยาส่วนที่เหลือไปทำการ transfection ต่อไป

การทำ transfection จะใช้เซลล์ BHK-21 (Baby hamster kidney cell) ที่กำลังเจริญได้ประมาณ 90% confluent จำนวนประมาณ 10^7 เซลล์ ผสมกับ RNA ที่สังเคราะห์ได้ แล้วนำไปทำการ electroporation เสร็จแล้วนำเซลล์ไป เติมอาหารเลี้ยงและนำไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 37°C ในบรรยากาศที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการตรวจสอบการสร้างไวรัสโปรตีนโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ถ้าการตรวจสอบเซลล์ให้ผลบวกแสดงว่ามีการสร้างไวรัสโปรตีนในเซลล์ ก็จะนำส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำการปั่นตกตะกอน แล้วนำส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงมาผสมด้วย calf serum ที่ปริมาณสุดท้าย 10% ก่อนจะนำไปเก็บที่ -70°C เพื่อบริการตรวจหาปริมาณไวรัส การเพิ่มปริมาณของไวรัสทำโดยการเลี้ยงไวรัสในเซลล์ Vero เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

Indirect Immunofluorescence assay (IFA)

ใช้ตรวจสอบการสร้างไวรัสโปรตีนในเซลล์ โดยนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้บางส่วนมาใส่ slide และนำไปย้อมด้วยวิธี indirect immunofluorescence assay โดยใช้ Serum ที่ได้จากผู้ป่วยเป็นโรคไข้สมองอักเสบ หรือ Monoclonal antibody 2 ชนิด คือ HB112 (Flavivirus group specific) และ HB114 (Dengue virus group specific) เป็นแอนติบอดีตัวแรก และใช้ anti-mouse antibody ที่ติดสารเรืองแสง เป็นแอนติบอดีตัวที่สอง แล้วนำไปส่องดูเซลล์ที่เรืองแสงใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ให้แสง UV ถ้าพบเซลล์มีการเรืองแสง (ให้ผลบวก) ก็แสดงว่ามีการสร้างไวรัสโปรตีนเกิดขึ้นในเซลล์

การตรวจหาปริมาณไวรัส โดยใช้วิธี Plaque titration assay

การตรวจหาปริมาณไวรัส ใช้การตรวจในเซลล์ Vero ที่เลี้ยงใน 6-well tissue culture plate จนได้เซลล์เป็น monolayer จากนั้นนำไวรัสที่จะทดสอบมาทำให้เจือจางลงเรื่อยๆ ที่ละ 10 เท่า (10 fold dilution) จากนั้นนำไวรัสที่เจือจางแล้ว จำนวน 200 ไมโครลิตร มาหยดใส่ในเซลล์แต่ละหลุม จนกว่าจะหมดตัวอย่างที่ทำไว้ แล้วนำเซลล์ไปเก็บที่ ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการติดเชื้อ และจะต้องมีการนำเซลล์ออกมาเขย่าทุกๆ 15 นาที เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์แห้ง เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำเซลล์มาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดวันกิ่งแข็ง รอจนอาหารแข็งได้ที่แล้วจึงนำเซลล์ไปเก็บในที่ ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 37°C เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อครบเวลาแล้วนำเซลล์ออกมาเติมอาหารชนิดวันกิ่งแข็งที่ผสมสีย้อม (Neutral Red) แล้วนำไปเลี้ยงที่ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 37°C เป็นเวลาอีกหนึ่งคืน แล้วจึงนำมานับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น และคำนวณปริมาณไวรัสเป็น Plaque Forming Unit per milliliter (PFU/ml) ในกรณีที่ต้องการถ่ายภาพจะนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ครบกำหนดแล้วมาเติมสาร 3.7% Formaldehyde in Phosphate buffer saline แล้วทิ้งไว้เป็นเวลานานมากกว่าหนึ่งชั่วโมง ครบกำหนดเวลาแล้ว ก็เทอาหารวันทิ้งไปแล้วเติมสีย้อม 1% Crystal violet ย่อยนานประมาณ 5 นาที แล้วนำไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา แล้วตากให้แห้งก่อนนำไปถ่ายภาพ

Viral growth curve study

นำไวรัสที่ต้องการทดสอบมา Infect เซลล์ Vero ที่เลี้ยงไว้ใน Tissue culture flask ขนาด 75 cm² โดยใช้ไวรัส 5,000 PFU แล้วนำไป incubate ไวที่ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ก่อนนำมาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ก่อนนำกลับไปเลี้ยงต่อที่ 37°C นาน 12 วัน ในวันที่ 2,4,6,8,10,12 หลังการ Infection จะเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ เพื่อนำไปตรวจหาปริมาณไวรัส

ผลการทดลอง

การอ่านลำดับเบสของยีนส์ ไวรัส JE strain Beijing-1

จากการทำ RT/PCR โดยใช้ primer คู่ที่ 1 ได้ชิ้น DNA ของไวรัส JE ขนาด 1952 base-pair ประกอบด้วยยีนส์ PrM (nt-489) และ E (nt-2441) โดยที่ cleavage site ที่อยู่หน้า PrM gene เป็นของ DEN2 virus ที่ปลายด้าน 5' มี MluI site และ มี NgoMI site อยู่ปลายด้าน 3' หลังจากทำการ clone ชิ้น DNA ที่ได้เข้าสู่ Intermediate Vector; pD2-IP แล้ว จึงทำการอ่านลำดับเบส เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่อ่านได้กับ reference sequence (รูปที่ 2) พบว่า

Clone pD2-IP#5-2 มี 4 point mutations (nt 646, 1346, 1371, 2289) และ 1 amino acid deletion

Clone pD2-IP#3-3 มี 4 point mutations (nt 1171, 1346, 1371, 1968)

Clone pD2-IP#7 มี 2 point mutations (nt 1346, 1371)

จากการทำ RT/PCR โดยใช้ primer คู่ที่ 2 ได้ชิ้น DNA ของไวรัส JE ขนาดเพิ่มเป็น 2021 base-pair ซึ่งมียีนส์ PrM (nt-420) และ E (nt-2441) โดยที่ cleavage site ที่อยู่หน้า PrM gene เป็นของ JE virus มี SacII site อยู่ปลายด้าน 5' และ มี NgoMI site อยู่ปลายด้าน 3' หลังจาก clone เข้าสู่ Intermediate vector ที่สร้างขึ้นใหม่คือ pD2-IVsac และเลือก clone จำนวน 4 clones ไปทำการอ่านลำดับเบสอีกครั้ง ดูรูปที่ 3. ได้คัดเลือก clone pD2-IV/JE6 ซึ่งในยีนส์ของ JE มี 2 point mutations (nt 1346, 1371) เหมือนกับ clone pD2-IP#7

Full-length recombinant DEN2/JE DNA

เลือกใช้ Clone pD2-IP#7 (1952 base pair) เนื่องจากมี mutation น้อยที่สุด และ mutations ที่ nt 1346 และ 1371 น่าจะเป็น mutations ที่เกิดใน RNA ของไวรัสเอง ไม่ได้เกิดจาก error ของ reverse transcriptase enzyme เนื่องจากพบ mutations ที่ตำแหน่งเดียวกันนี้ใน Clone อื่นๆ ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า ในยีนส์ของ JE มี MluI site ที่ตำแหน่ง nt 931 จึงต้องทำการขจัด MluI ที่ตำแหน่ง 931 ด้วยวิธี site directed mutagenesis แล้วจะได้ intermediate clone ชนิดใหม่คือ pD2IP/JE8 (JE fragment ที่ไม่มี MluI site อยู่ใน pD2-IP ซึ่งเป็น DEN2 wild type intermediates) นอกจากนี้ได้ตัดต่อยีนส์ของ JE virus จาก pD2IP/JE8 เข้าไปใน pD2-IV vector และได้ intermediate clone ชนิดใหม่คือ pD2-IV/JE10 (JE fragment ที่ไม่มี MluI site อยู่ใน pD2-IV ซึ่งเป็น DEN2 vaccine intermediates)

สำหรับ intermediate clone ที่มี JE (2022 base pair) สร้างได้จากการ ligation ระหว่าง JE fragment (SacII-NgoMI) เข้ากับ pD2-IVsac ได้ intermediate clone ชนิดใหม่คือ pD2-IV/JE6 (JE fragment อยู่ใน pD2-IVsac ซึ่งเป็น DEN2 vaccine intermediates) จากนั้นตัดส่วนยีนส์ JE จาก pD2-IV/JE6 แล้ว

```

      N   F   Q   G   K   L   L   M   T   I   N   N   T   D   I   A   D   V
489    aa tttccagggg aagcttttga tgaccatcaa caacacggac attgcagacg
#5-2    AC GCGT
#3-3    AC GCGT
#7       AC GCGT

      Y   M   C   E   D   T   I   T   Y   E   C   P   K   L   I   M   G   N   D   P
601    gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg aatgtcctaa gctcaccatg ggcaatgatc
      T

      W   M   L   G   S   N   N   G   Q   R   V   V   F   T   I   L   L   L   L   V
901    gctggatgct tggcagtaac aacggtcaac gcgtgggtatt caccatcctc ctgctgttgg
      A
      A

      V   R   S   Y   C   Y   H   A   S   V   T   D   I   S   T   V   A   R   C   P
1141   aggtcagaag ttactgctat catgcttcag tcaatgacat ctgcacgggtg gctcgggtgcc
      G

      T   T   G   E   A   H   N   E   K   R   A   D   S   S   Y   V   C   K   Q   G
1201   ccacgactgg agaagcccac aacgagaagc gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag
      G

      C   A   K   F   S   C   T   S   K   A   I   G   R   T   I   Q   S   E   N   I
1321   catgtgcaaa attctcctgc accagcaaag cgattggaag aacaatccag tcagaaaaca
      G      G      C
      G      G      C
      G      G      C

      D   T   G   H   G   T   V   V   I   E   L   S   Y   S   G   S   D   G   P   C
1921   cggacactgg tcacggaaca gttgtcattg aactttcata ctctgggagt gatggccct
      G
      G

      T   V   N   P   F   V   A   T   S   S   A   N   S   K   V   L   V   E   M   E
2041   tgacggtgaa ccccttcgtc gcgacttcca gcgccaactc aaaggtgctg gtcgagatgg
      A      T
      A      T
      A      T

      P   P   F   G   D   S   Y   I   V   V   G   R   G   D   K   Q   I   N   H   H
2101   aacccccctt cggagactcc tacatcgtag ttggaagggg agacaagcag attaaccacc
      ---

      S   I   G   K   A   V   H   Q   V   F   G   G   A   F   R   T   L   F   G   G
2281   actccatagg gaaagctgtt caccaagtgt ttggtgggtgc cttcagaaca ctctttgggg
      A

      R   D   R   S   I   A   L   A   F   L   A   T   G
2401   cacgagaccg atcaattgct ttggccttct tagccacagg a 2441
      GCCGG C
      GCCGG C
      GCCGG C

```

รูปที่ 2. Sequence alignment ของ Intermediate clones (MluI-NgoMI)

```

420
pD2IV/JE6#18
pD2IV/JE6#2
pD2IV/JE6#13
pD2IV/JE6#19
E
ccgcggggcg
ccgcgggc-
ccgcggggcg
ccgcggggcg
ccgcggggcg

  G S I M W L A S L A V V I A C A G A M K
421 aaggctcaat catgtggctc gcgagcttgg cagttgttat agcctgcgca ggagccatga
    ---
                                c
                                ≡
                                ≡
                                ≡
                                c

  L S N F Q G K L L M T I N N T D I A D V
481 agttgtcaaa tttccagggg aagcttttga tgaccatcaa caacacggac attgcagacg
                                g

  I V I P T S K G E N R C W V R A I D V G
541 ttatcgtgat tcccacctca aaaggagaga acagatgctg ggtccgagca atagacgtcg
                                t
                                ≡
                                ≡
                                ≡
                                c

  K T E N W I I R N P G Y A F L A A I L G
841 tgaaaaccga gaactggatc ataaggaatc ctggctatgc ttttctggcg gcgatacttg
                                c

  T T G E A H N E K R A D S S Y V C K Q G
1201 ccacgactgg agaagcccac aacgagaagc gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag
                                g

  C A K F S C T S K A I G R T I Q S E N I
1321 catgtgcaaa attctcctgc accagcaaag cgattggaag aacaatccag tcagaaaaca
                                g
                                g
                                c
                                ≡

  S S V K L T S G H L K C R L K M D K L A
1801 caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc taaaatgcag gctgaaaatg gacaaactgg
                                a

  T V N P F V A T S S A N S K V L V E M E
2041 tgacggtgaa ccccttcgtc gcgacttcca gcgccaactc aaaggtgctg gtcgagatgg
    a
    a
    t
    ≡

  R D R S I A L A F L A T G
2401 cacgagaccg atcaattgct ttggccttct tagccacagg a 2441
                                gccgg c
                                gccgg c

```

รูปที่ 3. Sequence alignment ของ Intermediate Clones (SacII-NgoMI)

ทำการ clone เข้าสู่ pD2-IPsac ซึ่งจะได้ clone ใหม่คือ pD2-IP/JE7 (JE fragment อยู่ใน pD2-IPsac ซึ่งเป็น DEN2 wild type intermediates)

การสร้าง Full-length clone สร้างโดยการ ligation ระหว่าง NgomI และ XbaI fragment ขนาด 7790 base-pair ที่ได้มาจาก pD2-IC-VV50 และ pD2-IC-VE50 (Full-length clone ของ vaccine virus) หรือ pD2-IC-P48 (wild type virus) กับ intermediate clones ดังนี้

pD2IV/JE10 กับ fragment มาจาก pD2-IC-VV50 ได้ pD2V/JE11

pD2IP/JE8 กับ fragment มาจาก pD2-IC-P48 ได้ pD2P/JE12

pD2IV/JE6 กับ fragment มาจาก pD2-IC-VV50 ได้ pD2V/JE9

pD2IP/JE7 กับ fragment มาจาก pD2-IC-P48 ได้ pD2P/JE13

pD2IV/JE10 กับ fragment มาจาก pD2-IC-VE50 ได้ pD2V/JE16

pD2IV/JE6 กับ fragment มาจาก pD2-IC-VE50 ได้ pD2V/JE15

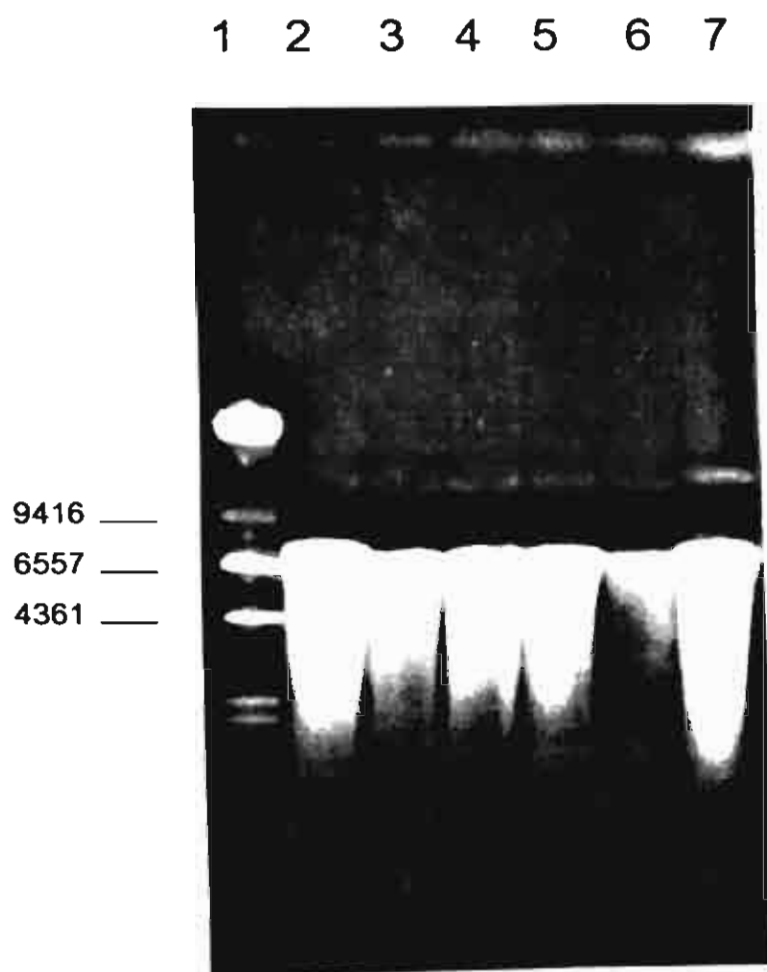
JE fragment ที่อยู่ใน Recombinant full-length clone ที่สร้างได้ซึ่งทุก clone มีขนาด 10230 base-pair สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1 ข้างล่างนี้

Backbone	JE-1652 (Mlu-NgoMI)	JE-2021 (SacII-NgoMI)
pD2-IC-VV50	pD2V/JE11	pD2V/JE9
pD2-IC-VE50	pD2V/JE16	pD2V/JE15
pD2-IC-P48	pD2P/JE12	pD2p/JE13

ตารางที่ 1. ตารางแสดง Recombinant full-length DEN2/JE clones ที่สร้างได้โดยใช้ Backbone 3 ชนิด คือ pD2-IC-P48 มาจากสายพันธุ์รุนแรง ส่วน pD2-IC-VV50 และ pD2-IC-VE50 มาจากสายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีน

ผลการทำ Transfection RNA เข้าสู่ BHK-21 และ Vero cells. โดยใช้ RNA ที่ Transcribed มาจาก recombinant DEN/JE 4 ชนิดคือ pD2V/JE11, pD2V/JE9, pD2P/JE12, และ pD2P/JE13 และใช้ pD2-IC-VV50 และ pD2-IC-P48 (รูปที่ 4) เป็น control พบว่าหลังการ transfection แล้ว 7 วันเมื่อทำการตรวจสอบเซลล์ด้วยวิธี IFA พบว่า เซลล์ที่ transfect ด้วย pD2-IC-VV50 และ pD2-IC-P48 ให้ผลบวก ส่วนเซลล์ที่ transfect ด้วย recombinant DNA ทั้ง 4 ชนิด ให้ผลลบ

และจากตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบซ้ำอีกครั้งโดยการนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ถูก transfection แล้ว มาทำให้เกิดการติดเชื้อในเซลล์ Vero อีกครั้ง แล้วนำเซลล์มาตรวจอีกครั้ง ผลการทดสอบแสดงว่า ไม่มีไวรัสถูกผสมออกมา เนื่องจาก pD2P/JE12 และ pD2P/JE13 ให้ผลลบ เมื่อยับยั้งด้วย HB112 (ซึ่งจะต้องให้



รูปที่ 4. รูปแสดง RNA ที่ได้จากการทำ *In vitro* Transcription

lane1. Markers

lane 2. pD2-p48

lane 3. pD2-VV50

lane 4. pD2V/JE9 #9

lane 5. pD2V/JE9 #11

lane 6. pD2P/JE13 #12

lane 7. pD2P/JE13 #13

ผลบวก ถ้ามีโปรตีนอีของ JE) ส่วนผลบวก (false positive) ที่ได้จากซีรัมผู้ป่วยนั้น อาจเกิดจากการ cross reactive ของ antibody หลายชนิดที่มีอยู่ในซีรัม ดังนั้นในการตรวจด้วยวิธี IFA ครั้งต่อไปจะใช้โมโนโคลนัล แอนติบอดี ในการตรวจเท่านั้น

Antibody for detection	Vero cell was infected with transfected with		
	pD2-IC-P48	pD2P/JE12	pD2P/JE13
HB46 (DEN2 specific)	++++	-	-
HB114 (DEN group)	++++	-	-
HB112 (Flavivirus specific)	+++	-	-
JE patient sera	+++	++	++

ตารางที่ 2 ตารางแสดงผลการตรวจ IFA ใน Vero cell โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี และซีรัมที่ได้จากผู้ป่วยเป็นแอนติบอดีตัวแรกในการตรวจ

เมื่อทำการตรวจสอบ Restriction enzyme pattern ของ pD2V/JE11 pD2V/JE9 pD2P/JE12 และ pD2P/JE13 โดยละเอียดอีกครั้ง พบว่า NgoMI ไม่สามารถ digest ได้(ปกติจะเป็น single cut) ต่อมาได้ทำsequence เพื่อตรวจclone pD2P/JE13 และ pD2V/JE9 พบว่ามี nucleotide deletion ใน pD2P/JE13 จำนวน 44 nucleotides ที่บริเวณ junction of E ของ JE และ DEN2 NSI ทำให้ NgoMI site ถูกเปลี่ยนแปลงไป ส่วน pD2V/JE9 พบว่ามี single nucleotide deletion ใน NSI gene ของ DEN2 (รูปที่ 5)

ส่วนผลการผลการทำ Transfection RNA โดยใช้ BHK-21 และ RNA ที่ transcribed มาจาก pD2V/JE15 (4 clones) และ pD2V/JE16 (4 clones) โดยใช้ pD2-IC-VE50 เป็น control และย้อมเซลล์ด้วยวิธี IFA หลังการ transfection แล้ว 6 วัน พบว่า เซลล์ที่ transfect ด้วย และ pD2-IC-VE50 pD2-IC-P48 และ pD2V/JE15 ให้ผลบวก ส่วนเซลล์ที่ transfect ด้วย pD2V/JE16 ให้ผลลบ ดังตารางที่3 ข้างล่างนี้

```

tgaaggaggagc tcaaagactg gcagogttgg gogacacagc ctgggacttt ggcctcattg gaggggtctt
TGGOCATTTT AGGTGACACA GOCTGGGATT TTGGATOC'TT GGGAGGAGTG TTTACATCIA TAGGAAAGGC
// // // // // // //

caactocata gggaaagctg ttcaocaagt gtttggtggt gccttcagaa cactctttgg gggaatgtct
TCTOCACCAA GTCTTTGGAG CAATCTATGG AGCTGOCTTC AGTGGGGTTT CATGGACTAT GAAAATOCTC
// // // // // // //

tggatcacac aagggccta ggggggoccta ctactttgga tgggcatcaa ogcaogagac ogatcaattg
ATAGGAGTCA TTATCACATG GATAGGAATG AATTCACGCA GCAOCTCACT GTCTGTGACA CIAGTATTGG
// // // // // // //

ctttggcctt cttagcogoc ggc
TGGGAATTGT GACACTGTAT TTGGGAGTCA TGGTGCAGGC CGATAGTGGT TGCCTTGTGA GCTGGAAAAA
// // // // // // //

CAAAGAACTG AAATGTGGCA GTGGGATTTT CATCACAGAC AACGTGCACA CATGGACAGA ACAATACAAG
// // // // // // //

TTOCAACCAG AATOOCTTC AAAACTAGCT TCAGCTATOC AGAAAGCCCA TGAAGAGGGC ATTTGTGGAA
// // // // // // //

TOCGTCACT AACAAGACTG GAGAATCTGA TGTGGAAACA AATAACACCA GAATTGAATC ACATTCTATC
// // // // // // //

```

รูปที่ 5. Partial sequence alignment แสดงส่วนที่มี Deletion ใน full-length clone pD2JE13-13

BHK-21 transfected with recombinant DEN2/JE	Mix Mabs (Mab112 +114)
pD2-IC-VE50	+
pD2V/JE15-2	+
pD2V/JE15-8	+
pD2V/JE15-12	+
pD2V/JE15-18	+
pD2V/JE16-15	-
pD2V/JE16-27	-
pD2V/JE16-13	-
pD2V/JE16-31	-
pD2-IC-P48	+

ตารางที่ 3. ตารางแสดงผลการตรวจเซลล์ BHK-21 ที่ถูก Transfect ด้วยไวรัสลูกผสม DEN2/JE โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บมาจากตัวอย่างที่ให้ผลบวก มา Infect เซลล์ Vero อีกครั้ง แล้วนำไปตรวจสอบด้วย วิธี IFA อีกครั้งได้ผลตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 ดังนี้

	pD2V/JE15-2	pD2V/JE15-8	pD2V/JE15-12	pD2V/JE15-18	pD2-IC-P48
Mab112	+	+	+	+	+
Mab 114	-	-	-	-	+

ตารางที่ 4. ตารางแสดงผลการตรวจเซลล์ VERO ที่ถูก Infect ด้วยไวรัสลูกผสม DEN2/JE โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี

ผลจากตารางที่ 3 และ 4 แสดงว่า เซลล์ที่ถูก transfect ด้วย RNA จาก pD2V/JE15 ได้สร้างไวรัสลูกผสม DEN2/JE ทั้ง 4 clone เพราะให้ผล IFA เป็นบวกเมื่อย้อมด้วย Mab112 และให้ผลลบกับ Mab 114 (จำเพาะกับไวรัส DEN เท่านั้น) ซึ่งแสดงว่าโปรตีน E นั้นไม่ใช่ โปรตีน E ของไวรัส DEN2 และเนื่องจากการ Transfection จะมี residue ของ DNA และ RNAหลงเหลืออยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี PCR แต่จะทำการตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธี PCR นี้ โดยให้ไวรัสที่ผ่านการ Passage ในเซลล์แล้วหนึ่งครั้ง ซึ่งปริมาณ RNA ที่ค้างอยู่ได้ถูกทำให้เจือจางลงจนไม่รบกวนการทำ PCR แล้ว

Virus titer ที่ตรวจได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับ การ Transfection แล้วได้ผลตามที่แสดงในตารางที่ 5 ดังนี้

Viruses	Titer (PFU/ml)
D2VE/JE15-2	1.5×10^4
D2VE/JE15-8	5.5×10^3
D2VE/JE15-12	1.4×10^4
D2VE/JE15-18	7.5×10^4

ตารางที่ 5. ตารางแสดงปริมาณไวรัสลูกผสม DEN2/JE ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ได้จากการทำ Transfection

Characterization of Recombinant DEN2/JE

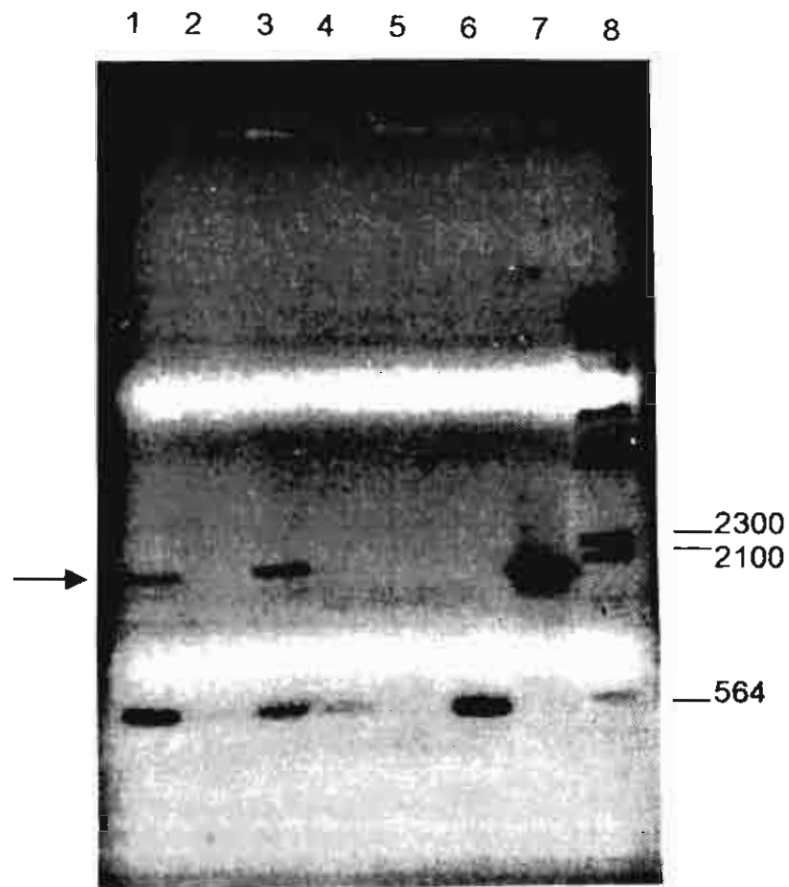
เนื่องจากปริมาณไวรัสที่เก็บได้จากการ Transfection มีปริมาณน้อย จึงนำไวรัสที่เก็บได้ไป Infect เซลล์ Vero อีกครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส โดยทำการติดเชื้อไวรัส 5000 PFU เข้าเซลล์ Vero ที่เลี้ยงไว้ใน Tissue culture flask ขนาด 225 cm^2 ผลการศึกษาลักษณะของไวรัสลูกผสมทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นผลจากการศึกษาโดยใช้ไวรัสที่เลี้ยงผ่านเซลล์ Vero แล้วหนึ่งครั้ง

-Virus identity by PCR detection

เพื่อตรวจสอบว่าไวรัสที่ได้เป็นไวรัสลูกผสมจริง จึงนำไวรัสทั้ง 4 ชนิดข้างต้น ไวรัส JE และ ไวรัส DEN2-VE50 มาทำการ Extract RNA แล้วนำไปตรวจด้วยวิธี RT/PCR โดยใช้ Primer (JE882 และ cD2-2622) ที่สามารถ Amplify ส่วนต่อระหว่าง ไวรัส JE และ ไวรัส DEN ได้ผลดังตามที่แสดงในรูปที่ 6 ว่า Primer คู่นี้จะให้ PCR product ขนาด 1340 เบส ที่จำเพาะต่อ Clone ที่เป็นลูกผสมเท่านั้น และจะไม่พบ Band ขนาดนี้ใน ตัวอย่างที่เป็น ไวรัส JE หรือ ไวรัส DEN2

- Virus growth curve

จากการศึกษาการเติบโตของไวรัสใน เซลล์ Vero (รูปที่ 7) และ LLC-mk2 (รูปที่ 8) พบว่า ไวรัสลูกผสมทั้ง 4 ชนิดสามารถเติบโตได้ดี และให้ค่า Virus Titer อยู่ในระดับ 10^4 - 10^5 PFU/ml โดย Maximum titer อยู่ในช่วงวันที่ 7-8 หลังการติดเชื้อ ในขณะที่ ไวรัส D2-VE50 ซึ่งเป็น Backbone ให้ค่า Virus Titer อยู่ในระดับ 10^5 - 10^6 PFU/ml โดย Maximum titer อยู่ในช่วงวันที่ 7-8 หลังการติดเชื้อเช่นกัน ส่วนไวรัส JE นั้นให้ค่า Virus Titer อยู่ในระดับ 10^6 - 10^7 PFU/ml โดย Maximum titer อยู่ในช่วงวันที่ 3-4 หลังการติดเชื้อ ส่วนการศึกษาการเติบโตของไวรัสใน เซลล์ yug C6/36 (รูปที่ 9) นั้นไม่สามารถนำผลมาใช้ได้ เนื่องจากค่า Virus Titer ที่ได้จากการติดเชื้อด้วย ไวรัส JE และไวรัส DEN2-16681 นั้นให้ค่าต่ำกว่าที่ควรจะเป็น (21,31) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเซลล์ที่ใช้นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการ Passage หลายครั้ง จนไม่สามารถรองรับการเจริญเติบโตของไวรัสได้



รูปที่ 6a. ภาพแสดงRT/PCR product ขนาด 1340 เบส ที่ได้จากการ amplify โดยใช้ RNA ที่extract มาจาก ไวรัสลูกผสม DEN2/JE ไวรัสJE ไวรัสDEN2 โดยใช้ primer จำเพาะ เป็นการทดลองครั้งแรก

Lane 1. D2VE/JE15-8

Lane 2. D2VE/JE15-12

Lane 3. D2VE/JE15-2

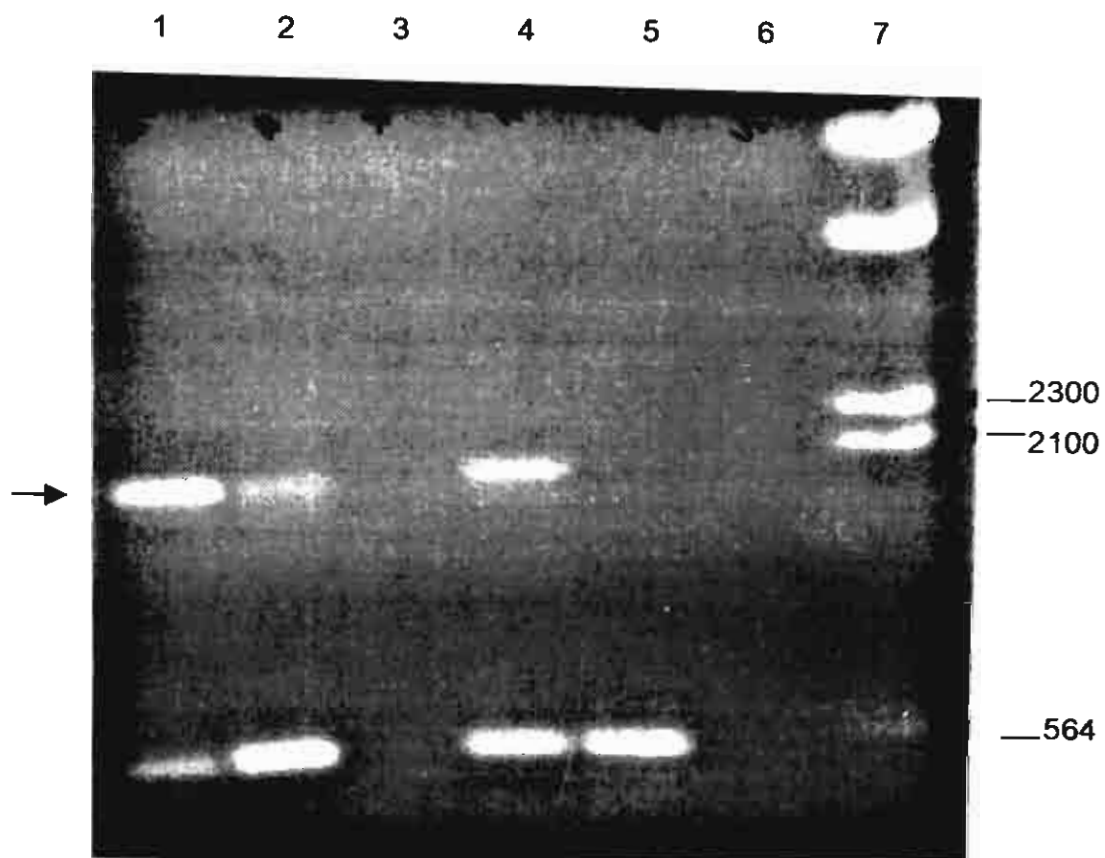
Lane 4. D2VE/JE15-18

Lane 5. D2IC-VE50

Lane 6. JE(Beijing-1)

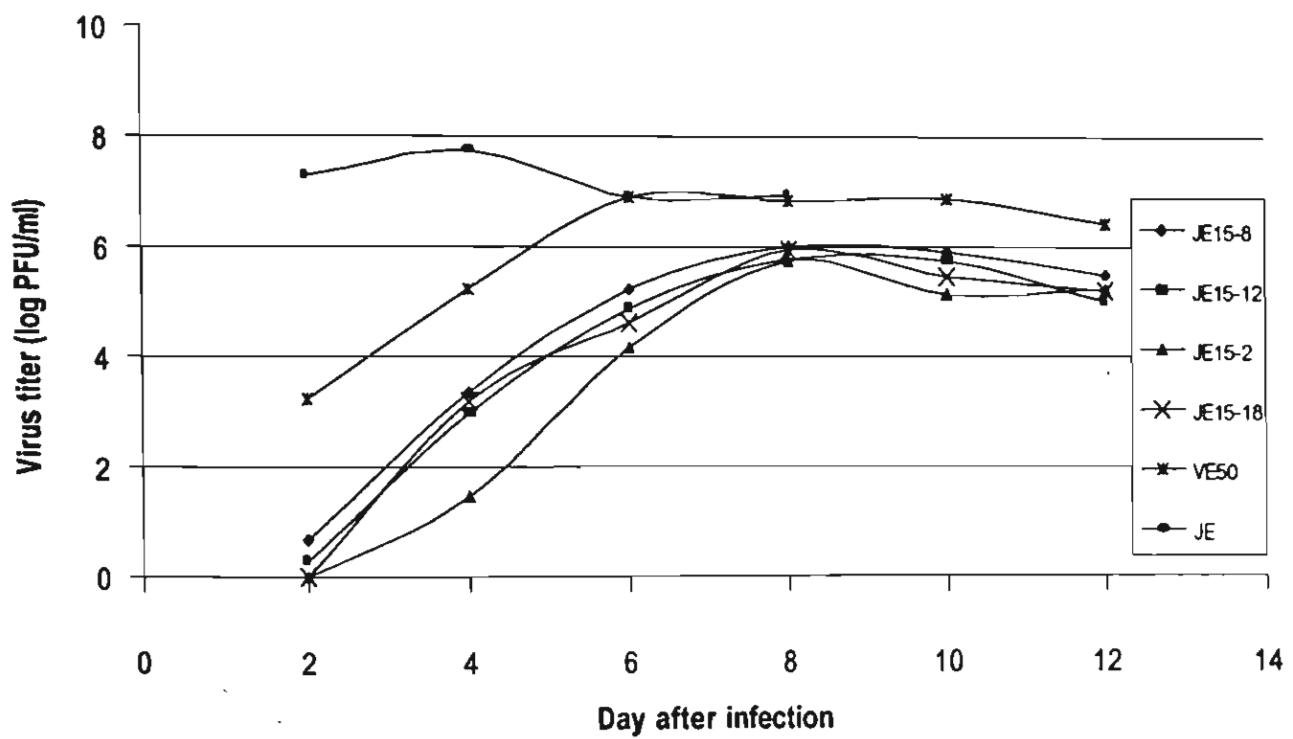
Lane 7. Plasmid DNA; pD2VE/JE15-8

Lane 8. Markers (base)

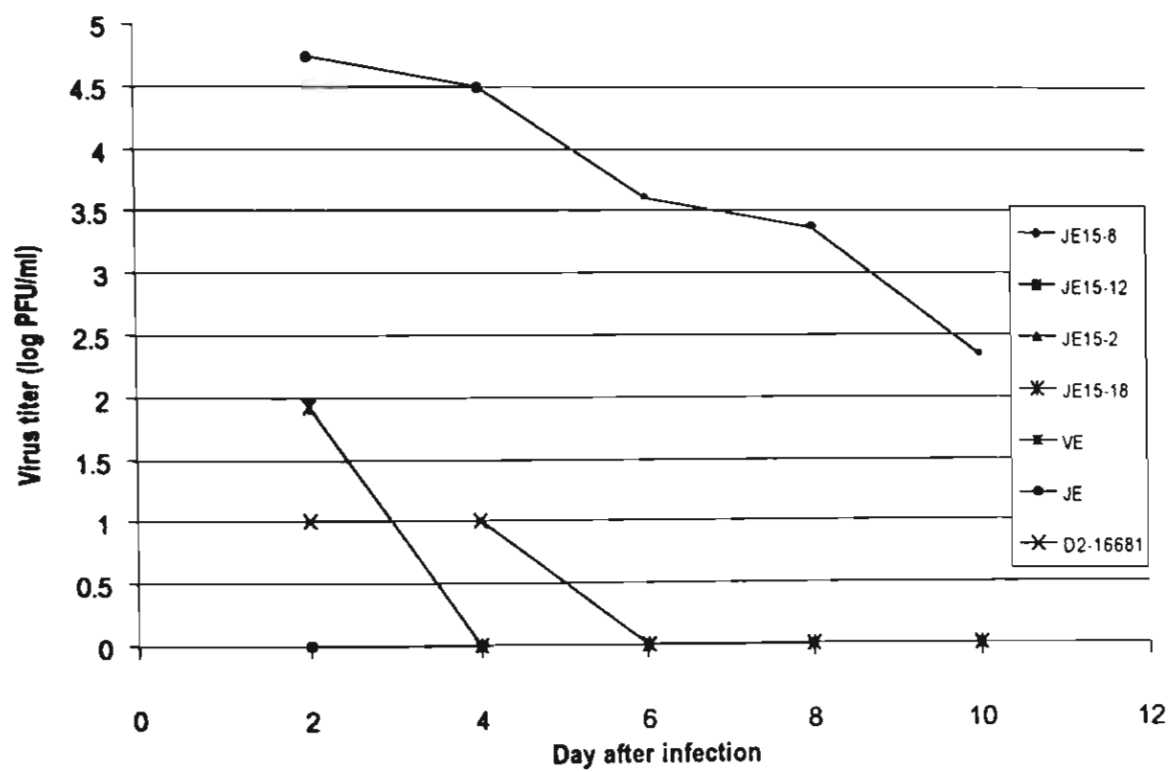


รูปที่ 6b. ภาพแสดงRT/PCR product ขนาด 1340 เบส ที่ได้จากการ amplify โดยใช้ RNA ที่extract มาจาก ไวรัสลูกผสม DEN2/JE ไวรัสJE ไวรัสDEN2 โดยใช้ primer จำเพาะ เป็นการทดลองครั้งสอง

- Lane 1. D2VE/JE15-8
- Lane 2. D2VE/JE15-12
- Lane 3. D2VE/JE15-2
- Lane 4. D2VE/JE15-18
- Lane 5. JE(Beijing-1)
- Lane 6. D2IC-VE50
- Lane 7. Markers (base)



รูปที่ 8. ลักษณะการเจริญของไวรัสลูกผสมและไวรัส DEN2 และ ไวรัส JE ใน เซลล์ LLC-mk2



รูปที่ 9. ลักษณะการเจริญของไวรัสลูกผสมและไวรัส DEN2 และ ไวรัส JE ใน เซลล์ C6/36

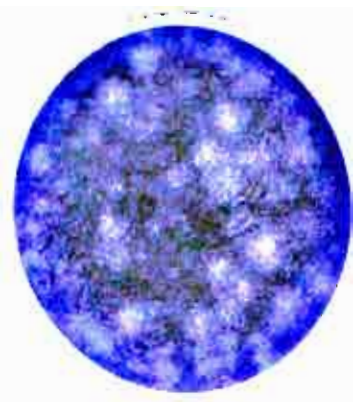
- Plaque Charaterization

เมื่อทำการศึกษาลักษณะ Plaque ของ ไวรัสลูกผสม D2VE/JE15 ทั้ง 4 ชนิด ในเซลล์ Vero หลังการติดเชื้อได้ 10 วัน พบว่า D2VE/JE15 ทั้ง 4 ชนิด จะให้ Plaque ที่มีลักษณะแบบ Hazy plaque มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 1.5-2.5 mm (ตารางที่ 6) ในขณะที่ DEN2-VE50 และ DEN2-16681 ให้ Plaque ที่มีลักษณะ Clear plaque ส่วนไวรัส JE ให้ clear plaque ขนาดใหญ่ หลังการติดเชื้อได้เพียง 5 วัน (รูปที่ 10)

เมื่อทำการศึกษาลักษณะ Plaque ของ ไวรัสลูกผสม D2VE/JE15 ทั้ง 4 ชนิด ในเซลล์ LLC-mk2 พบว่า D2VE/JE15 ทั้ง 4 ชนิด จะให้ Plaque ที่มีลักษณะแบบ Hazy plaque เช่นเดียวกับในเซลล์ Vero แต่จะมีความไม่ชัดเจนมากกว่า (รูปที่ 11) ส่วน DEN2-VE50 และ DEN2-16681 ให้ Plaque ที่มีลักษณะ Clear plaque ส่วนไวรัส JE ให้ clear plaque ที่มีขนาดปานกลาง หลังการติดเชื้อ 10 วัน ซึ่งเป็น Plaque ที่มีขนาดเล็กกว่าเมื่อเลี้ยงใน Vero

viruses	Plaque size in LLC-mk2 cell (mm /SD)	Plaque size in Verocells (mm/SD)
D2VE/JE15-8	1.3 /0.35	2.04 /0.52
D2VE/JE15-12	1.34 /0.23	2.12 /0.35
D2VE/JE15-2	1.78 /0.51	2.4 /0.61
D2VE/JE15-18	2.22 /0.56	2.04 /0.39
D2IP/VE50	2.17 /0.25	1.69 /0.52
JE (Beijing-1)	1.14 /0.23	2.56 /0.39
D2-16681	Not tested	3.05 /0.63

ตารางที่ 6. Plaque size of the recombinant DEN2/JE viruses and the parent viruses. The result calculated from an average measurement of 8-11 plaques. Plaque titration was performed on the indicated cells. The plaques were stained on day 10 post infection except for JE virus that infect to Vero cell the plaques were stained on day 5.



D2VE/JE15-2



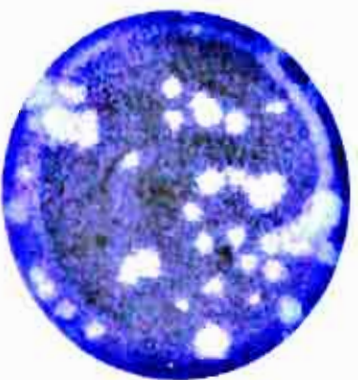
D2VE/JE15-8



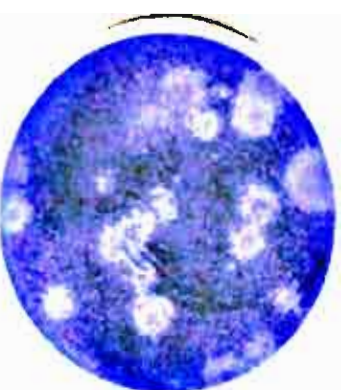
D2VE/JE15-12



D2VE/JE15-18



D2IC/VE50



D2-16681



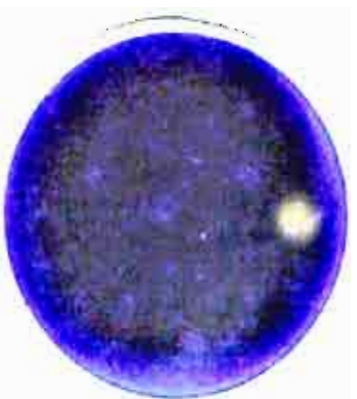
JE(Beijing-1)

Plaque characteristic of recombinant D2/JE and parent viruses in VERO cells

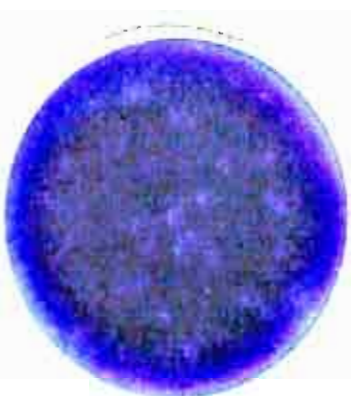
รูปที่ 10. รูปแสดงลักษณะ plaque ที่เกิดในเซลล์ Vero หลังการ Infection ด้วยไวรัสเป็นเวลา 10 วัน ยกเว้นไวรัส JE ย้อมเซลล์ หลังการ Infection ด้วยไวรัสเป็นเวลา 5 วัน



D2VE/JE15-2



D2VE/JE15-8



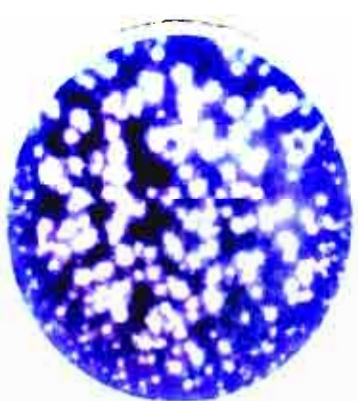
D2VE/JE15-12



D2VE/JE15-18



D2IC/VE50



JE(Beijing-1)

Plaque characteristic of recombinant D2/JE and parent viruses in LLC-mk2 cells

รูปที่ 11. รูปแบบแสดงลักษณะ plaque ที่เกิดในเซลล์ LLC-mk2 หลังการ infection ด้วยไวรัสเป็นเวลา 10 วัน

บทวิจารณ์

จากการทดลองนี้ สามารถสร้างไวรัสลูกผสม DEN2/JE โดยไวรัสที่ได้นั้นมีส่วนยีนส์ prM-E เป็นของ ไวรัส JE สายพันธุ์ Beijing-1 ที่มีความรุนแรง และยีนส์ส่วนอื่นเป็นของไวรัส DEN2 สายพันธุ์ที่ใช้เป็น วัคซีน ดังนั้นไวรัสที่ได้จะมีโปรตีนโครงสร้างเป็นของไวรัส JE จากการศึกษาในเมืองต้นพบว่าไวรัสลูกผสมที่ได้มานั้นมีลักษณะฟีโนไทป์แตกต่างจากไวรัส JE อย่างเด่นชัด ได้แก่การมี plaque ขนาดเล็ก และลักษณะแบบ Hazy นอกจากนี้ไวรัสลูกผสมมีแบบแผนการเจริญเติบโตในเซลล์ โดยใช้เวลานานกว่าและปริมาณไวรัสที่ได้สูงสุดก็แตกต่างไปจากไวรัส JE อย่างสิ้นเชิง ในขณะเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับ ไวรัส DEN2 ที่ใช้เป็น backbone พบว่าไวรัสลูกผสม DEN2/JE มีลักษณะการเติบโตใกล้เคียงกัน แต่ไวรัสลูกผสมจะให้ plaque ที่มีขนาดใหญ่กว่า ผลการทดลองเบื้องต้นที่ได้นี้แสดงว่า ไวรัสลูกผสม DEN2/JE มีมีลักษณะฟีโนไทป์คล้ายกับไวรัสที่ไม่รุนแรง ลักษณะความไม่รุนแรงที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากการควบคุมของ non-structural genes ที่เป็นแบบ attenuated ของไวรัส DEN2-VE50 (43) ซึ่งไวรัสลูกผสม DEN2/DEN1 (44) ที่ใช้แนวคิดนี้ในการสร้างก็มีลักษณะเป็นแบบไม่รุนแรงเช่นกัน อย่างไรก็ตามก็จะต้องมีการทดสอบเกี่ยวกับการก่อโรคของไวรัสลูกผสม DEN2/JE ในสัตว์ทดลองก่อนจึงจะสามารถสรุปได้ว่าไวรัสลูกผสม DEN2/JE นี้มีความรุนแรงแตกต่างไปจากไวรัส JE จริง

นอกจากนี้การพบจุดผ่าเหล่า 2 จุด ที่นิวคลีโอไทด์ 1346 และ 1371 เมื่อเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสของไวรัส JE สายพันธุ์ Beijing-1 ที่รายงานไว้ใน Genbank ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่ในโปรตีน E นั้นอาจจะมีส่วนต่อความรุนแรงของไวรัสได้เนื่องจากมีรายงานหลายๆรายงานที่แสดงถึงความเกี่ยวข้องของจุดผ่าเหล่าใน โปรตีน E ที่มีผลต่อความรุนแรงของไวรัสเช่นในกรณีของ ไวรัส JE สายพันธุ์ SA-14-14-2 (12,45) ดังนั้นควรจะต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างไวรัสลูกผสม DEN2/JE ที่ได้จากการทดลองนี้ กับไวรัสลูกผสม DEN2/JE ที่ได้ทำการแก้ไขจุดผ่าเหล่าทั้งสองจุดนั้นแล้ว เพื่อดูว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร

วิธีการที่ใช้ในการสร้าง และไวรัสลูกผสม DEN2/JE สามารถนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและ คุณลักษณะต่างๆโปรตีน E ของไวรัส JEต่อไปได้ เช่นการทำ Site directed mutagenesis ในส่วนที่ต้องการศึกษา ทั้งนี้เนื่องจากเราไม่สามารถสร้าง full-length cDNA ของไวรัส JE ได้ จึงต้องอาศัยยีนส์ที่เป็น non-structural genes จากไวรัส DEN2 มาแทนเพื่อให้สามารถสร้างไวรัสที่สมบูรณ์ออกมาได้ ดังตัวอย่างในการใช้ Yellow fever virus/JE chimera ในการศึกษาจุดผ่าเหล่า (45) อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำไวรัสลูกผสม DEN2/JE ไปใช้ในการศึกษาอื่นใด จะต้องพิสูจน์ก่อนว่าโปรตีน E ที่ ปรากฏอยู่ในไวรัสลูกผสม มีคุณสมบัติ (Authenticity) เหมือนกับโปรตีน E ของไวรัส JE จริง โดยการทดสอบการจับตัวกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะกับไวรัส JE

หนังสืออ้างอิง

1. Chambers T.J., Hahn C.S., Galler R. & Rice C.M. (1990). Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annual Review of Microbiology* 44, 649-688.
2. Rice C.M. (1996). Flaviviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp. 931-959. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.
3. Ogata A, Nagashima K, Hall W.W., Ichikawa M, Kimura-Kuroda J & Yasui K. (1991). Japanese encephalitis virus neurotropism is dependent on the degree of neuronal maturity. *J. Virol* 65, 880-886.
4. Kimura-Kuroda J, Ichikawa M, Ogata A, Nagashima K, & Yasui K. (1992). Specific tropism of Japanese encephalitis virus for developing neurons in primary rat brain culture. *Arch Virol* 130, 477-484.
5. Wang J.J., Liao C.L., Yang C.I., Lin Y.L. & Chen L.K. (1998). Localizations of NS3 and E proteins in mouse brain infected with mutant strain of Japanese encephalitis virus. *Arch Virol* 143, 2353-2369.
6. Despres P., Flamand M., Ceccaldi P.E. & Deubel V. (1996). Human isolates of dengue type 1 induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *J Virol* 70, 4090-4096.
7. McMinn P.C. (1997). The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flavivirus. *J Gen Virol* 78, 2711-2722.
8. Vratil S., Agarwal V., Malik P., Wani S.A., & Saini M. (1999). Molecular characterization of an Indian isolate of Japanese encephalitis virus that shows an extended lag phase during growth. *J Gen Virol* 80, 1665-1671.
9. Cecilia D. & Gould E.A. (1991). Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization resistant mutations. *Virology* 181, 70-77.
10. Hasegawa H., Yashida M., Shiosaka T., Fujita S. & Kobayashi Y. (1992). Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cell culture cells and virulence in mice. *Virology* 191, 158-165.
11. Ni H., Burns N.J., Chang G.J., Zhang M., Wills M.R., Trent D.W., Sanders P.J. & Barrett D.T. (1994). Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequence of the 5' non-coding region and structural protein genes of wild-type Japanese encephalitis virus strain SA 14 and its attenuated vaccine derivatives. *J Gen Virol* 75, 1505-1510.

12. Hase T, Dubois D.R., Summers P.L., Downs M.B., & Ussery M.A. (1993). Comparison of replication rates and pathogenicities between the SA 14 parent and SA 14-14-2 vaccine strains of Japanese encephalitis virus in mouse brain neurons. *Arch Virol* 130, 131-143.
13. Heinz F.X. & Roehrig J.T. (1990). Flavivirus. In *Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnostics and vaccines*. pp. 289-305. Edited by M.H.V. Van Regenmortel & A.R. Neurath. New York: Elsevier Science Publishers.
14. Mason P.W., Pincus S., Fournier M.J., Mason T.L., Shope R.E. & Paoletti E. (1991). Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology* 180, 294-305.
15. Konishi E., Pincus S., Paoletti E., Shope R.E., Burrage T. & Mason P.W. (1992). Mice immunized with a subviral particle containing Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. *Virology* 188, 714-720.
16. Marsh M. & Helenius A. (1989) Virus entry into animal cells. *Advances in Virus Research* 36, 107-151.
17. Holzmann H., Stiasny K., York H., Dorner F., Kunz C., & Heinz F.X. (1995). Tick-borne encephalitis virus envelope protein E-specific monoclonal antibodies for the study of low pH-induced conformational changes and immature virions. *Arch Virol* 140, 213-221.
18. Monath T.P. & Heinz F.X. (1996). Flaviviruses. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp 961-1034. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.
19. Nowak T. & Wengler G. (1987). Analysis of disulphides present in the membrane proteins of West Nile flavivirus. *Virology* 156, 127-137.
20. Kimura-Kuroda J. & Yasui K. (1983). Topological analysis of antigenic determinants of envelope glycoprotein V3 (E) of Japanese encephalitis virus, using monoclonal antibodies. *J Virol* 45, 124-132.
21. Kimura-Kuroda J. & Yasui K. (1986). Antigenic comparison of envelope protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 67, 2663-2672.
22. Roehrig J.T., Bolin R.A. & Kelly R.G. (1998). Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 246, 317-328.
23. Heinz F.X., Berger R., Tuma W. & Kunz C. (1983). A topological and functional model of epitopes on the structural glycoprotein of tick-borne encephalitis virus defined by monoclonal antibodies. *Virology* 126, 525-537.

24. McAda P.C., Mason P.W., Schmaljohn C.S., Dalrymple J.M., Mason T.L. & Fournier M.J. (1987) Partial nucleotide sequence of Japanese encephalitis virus genome. *Virology* 158, 348-360.
25. Mandl C.W., Guirakhoo F., Holzmann H., Heinz F.X. & Kunz C. (1989). Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *J Virol* 63, 564-571.
26. Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C. & Harrison S.C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A resolution. *Nature* 375, 291-298.
27. Kolaskar A.S. & Kulkarni-Kale U. (1999). Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus. *Virology* 261, 31-42.
28. Roehrig J.T., Hunt A.R. & Hawkes R.A. (1989). Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody. *Virology* 171, 49-60.
29. Lobigs M., Usha R., Nestorowicz A., Marshall I.D., Weir R.C. & Dalgarno L. (1990). Host cell selection of Murray Valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. *Virology* 176, 587-595.
30. Jiang W.R., Lowe A., Higgs S., Reid H. & Gould E.A. (1993). Single amino acid codon changes detected in Louping ill virus antibody resistant mutants with reduced neurovirulence. *J Gen Virol* 74, 931-935.
31. Rice C.M., Grakoui R., Galler R. & Chambers T.J. (1989). Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation, *Nature New Biology* 1, 285-296.
32. Lai C.J., Zhao B., Hori H. & Bray M. (1991). Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 88, 5139-5143.
33. Kinney R.M., Butrapet S., Chang T.-J., Tsuchiya K.R., Roehrig T.J., Bamarapavati N. & Gubler D.J. (1997). Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 230, 300-308.
34. Khromykh E.V. & Westaway E.G. (1994). Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *J Virol* 68, 4580-4588.
35. Mandl C., Ecker M., Holzmann H., Kunz C. & Heinz F.X. (1997). Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerff and high virulence strain Hypr. *J Gen Virol* 78, 1049-1057.

36. Sumiyoshi H., Hoke C.H. & Trent D.W. (1992). Infectious Japanese encephalitis RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J Virol* 66, 5425-5431.
37. Pletnev A.G., Bray M. & Lai C.J. (1993). Chimeric Tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutation on neurovirulence in mice. *J Virol* 67, 4956-4963.
38. Pletnev A.G., Bray M., Huggins J. & Lai C.J. (1992). Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10532-10536.
39. Sumiyoshi H., Tignor G.H. & Shope R.E. (1995). Characterization of a highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecularly cloned cDNA. *J Inf Dis* 171, 1144-1151.
40. Chambers T.A., Nestorowicz A., Mason P.W. & Rice C.M. (1999). Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. *J. Virol* 73, 3095-3101.
41. Hashimoto H., Nomoto A., Watanabe K., Mori T., Takezawa T., Aizawa C., Takekami T. & Hiramatsu K. (1988). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the genome of Japanese encephalitis virus Beijing-1 strain. *Virus Genes* 1:3, 305-317.
42. Butrapet S., Kimura-Kuroda J., Zhou D-S. & Yasui K. (1998). Neutralizing mechanism of a monoclonal antibody against Japanese encephalitis virus glycoprotein E. *Am J Trop Med Hyg* 58(4), 389-398.
43. Butrapet S., C. Y.-H. Haung, D.J. Pierro, N. Bhamarapravati, D.J. Gubler, and R.M. Kinney. (2000) Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK53), are defined by mutation in the 5' noncoding region and nonstructural protein 1 and 3. *J. Virol* 74: 3011-3019
44. Haung C. Y.-H., S. Butrapet, D.J. Pierro, G-J. J. Chang, A.R. Hunt, N. Bhamarapravati, D.J. Gubler, and R.M. Kinney. (2000) Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J. Virol* 74: 3020-3028
45. Arroyo J., Guirakhoo F., Fenner S., Zhang Z-X., Monath T.P., and Chambers T.J. (2001) Molecular basis of attenuation of neurovirulence of a Yellow fever virus/Japanese encephalitis virus chimera vaccine (ChimericVax-JE) *J. Virol* 75: 934-942

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ผลงานนี้สามารถนำไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการได้ แต่ต้องมีการศึกษาในแง่ของความรุนแรงของไวรัสลูกผสมที่ได้โดยละเอียดก่อน รวมทั้งความสามารถของไวรัสลูกผสมในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองก่อน หรืออาจนำไปศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนอื่น โดยการสร้างจุดผ่าเหล่าก่อนเพื่อเพิ่มเนื้อหางานวิจัยในแง่ของการนำไวรัสลูกผสมไปใช้ในเชิงApplication อย่างไรก็ตามก็ขึ้นอยู่กับเนื้อหาในระหว่างการจัดเตรียม Manuscript เพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสาร

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานนี้ใช้ประโยชน์ได้ในเชิงวิชาการ เพราะเป็นการสร้างไวรัสลูกผสม DEN2/JE เป็นครั้งแรก โดยใช้ไวรัสที่เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีนมาใช้ในการสร้าง นอกจากนี้ผลงานนี้ใช้ประโยชน์ในเชิงสาธารณะด้วยเพราะได้มีเครือข่ายความร่วมมือ กับ Arbovirus branch, Center for Diseases Control and Prevention, USA ยิ่งไปกว่านั้นในอนาคตถ้ามีการศึกษาในแง่ ความปลอดภัยและความสามารถในการนำผลงานนี้มาใช้เป็นวัคซีนสำหรับป้องกันโรคไวรัสไข้สมองอักเสบในประเทศไทยต่อไปได้ เนื่องจากไวรัส DEN2ที่ใช้เป็น Backbone นั้นเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีนอยู่แล้ว จึงถือว่างานวิจัยชิ้นนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้โดยบุคคลทั่วไป และภาคธุรกิจต่อไป

ภาคผนวก

ผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ Clones ที่ได้จากการทดลองนี้

489 N F Q G K L L M T I N N T D I A D V
 aa tttccagggg aagcttttga tgaccatcaa caacacggac attgcagacg
 #5-2 AC GCGTC
 #3-3 AC GCGTC
 #7 AC GCGTC

I V I P T S K G E N R C W V R A I D V G
 541 ttatcgtgat tcccacctca aaaggagaga acagatgctg ggtccgagca atagacgtcg
 T
 T
 T

Y M C E D T I T Y E C P K L I M G N D P
 601 gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg aatgtcctaa gctcaccatg ggcaatgatc
 T

E D V D C W C D N Q E V Y V Q Y G R C T
 661 cagaggatgt ggactgctgg tgtgacaacc aagaggtcta cgtccaatat ggacggtgca

R T R H S K R S R R S V S V Q T H G E S
 721 cgcgagaccag gcattccaag cgaagcagga gatccgtgtc agtccaaaca catggggaga

S L V N K K E A W L D S T K A T R Y L M
 781 gttcactagt gaataaaaaa gaggcttggc tggattcaac gaaagccaca cgataacctca

K T E N W I I R N P G Y A F L A A I L G
 841 tgaaaaccga gaactggatc ataaggaatc ctggctatgc ttttctggcg gcgatacttg

W M L G S N N G Q R V V F T I L L L L V
 901 gctggatgct tggcagtaac aacgggtcaac gcgtgggtatt caccatcctc ctgctgttgg
 A
 A

A P A Y S F N C L G M G N R D F I E G A
 961 tcgctccggc ttatagtttc aactgtctgg gaatgggcaa tcgtgacttc atagaaggag

S G A T W V D L V L E G D S C L T I M A
 1021 ccagtggagc cacttgggtg gacttgggtgc tagaaggaga cagctgcttg acaatcatgg

N D K P T L D V R M I N I E A S Q L A E
 1081 caaacgacaa accaacattg gacgtccgca tgatcaacat cgaagctagc caacttgctg

V R S Y C Y H A S V T D I S T V A P C P
 1141 aggtcagaag ttactgctat catgcttcag tcaactgacat ctcgacggtg gctcgggtgc

T T G E A H N E K R A D S S Y V C K Q G
 1201 ccacgactgg agaagccac aacgagaagc gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag
 G

F T D R G W G N G C G L F G K G S I D T
 1261 gcttcactga tcgtgggtgg ggcaacggat gtggactttt cgggaaggga agtattgaca

C A K F S C T S K A I G R T I Q S E N I
 1321 catgtgcaaa attctcctgc accagcaaag cgattggaag aacaatccag tcagaaaaca
 G G C
 G G C
 G G C

K Y E V G I F V H G T T T S E N H G N Y
 1381 tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg gaaccaccac ttcggaaaac catgggaatt

S A Q V G A S Q A A K F T V T P N A P S
 1441 attcagcgca agttggggcg tcccaggcgg caaagtttac agtaacacct aatgctcctt

I T L K L G D Y G E V T L D C E P R S G
 1501 cgataaccct caaacttggg gactacggag aagtcacact ggactgtgag ccaaggagtg

L N T E A F Y V M T V G S K S F L V H R
 1561 gactaaacac tgaagcggtt tacgtcatga ccgtgggggc aaagtcattt ttggtccata

E W F H D L A L P W T P P S S T A W R N
 1621 gggaaatggtt tcatgacctc gctctccctt ggacgcccc ttcgagcaca gcgtggagaa

R E L L M E F E E A H A T K Q S V V A L
 1681 acagagaact cctcatggaa tttgaagagg cgcacgccac aaaacagtcc gttgttgctc

G S Q E G G L H Q A L A G A I V V E Y S
 1741 ttgggtcaca ggaaggaggc ctccatcagg cgttggcagg agccatcgtg gtggagtact

S S V K L T S G H L K C R L K M D K L A
 1801 caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc taaaatgcag gctgaaaatg gacaaactgg

L K G T T Y G M C T E K F S F A K N P A
 1861 ctctgaaagg cacaacctat ggtatgtgca cagaaaaatt ctcgttcgcg aaaaatccgg

D T G H G T V V I E L S Y S G S D G P C
 1921 cggacactgg tcacggaaca gttgtcattg aactttcata ctctgggagt gatggccct

G
 G

K I P I V S V A S L N D M T P V G R L V
 1981 gcaagattcc gattgtctcc gttgctagcc tcaatgacat gacccccgtc gggcggctgg

T V N P F V A T S S A N S K V L V E M E
 2041 tgacggtgaa ccccttcgtc gcgacttcca gcgccaactc aaagggtgctg gtcgagatgg

A
 A
 A

T
 T
 T

P P F G D S Y I V V G R G D K Q I N H H
 2101 aacccccctt cggagactcc tacatcgtag ttggaagggg agacaagcag attaaccacc

W Y K A G S T L G K A F S T T L K G A Q
 2161 attggtacaa ggctggaagc acgctgggca aagccttttc aacgactttg aaggagctc

R L A A L G D T A W D F G S I G G V F N
 2221 aaagactggc agcgttgggc gacacagcct gggacttttg ctctattgga ggggtcttca

S I G K A V H Q V F G G A F R T L F G G
 2281 actccatagg gaaagctgtt caccaagtgt ttggtggtgc cttcagaaca ctctttgggg
 A

M S W I T Q G L M G A L L L W M G I N A
 2341 gaatgtcttg gatcacacaa gggctaattg gggccctact actttggatg ggcacacacg

R D R S I A L A F L A T G
 2401 cacgagaccg atcaattgct ttggccttct tagccacagg a 2441

GGGCT _
GGGCT _
GCCGG C

420
pD2IV/JE6#18
pD2IV/JE6#2
pD2IV/JE6#13
pD2IV/JE6#19

E
ccgcggggcg
ccgcggggc-
ccgcggggcg
ccgcggggcg
ccgcggggcg

G S I M W L A S L A V V I A C A G A M K
421 aaggctcaat catgtggctc gcgagcttgg cagttgttat agcctgcgca ggagccatga

L S N F Q G K L L M T I N N T D I A D V
481 agttgtcaaa tttccagggg aagcttttga tgaccatcaa caacacggac attgcagacg

g

I V I P T S K G E N R C W V R A I D V G
541 ttatcgtgat tcccacctca aaaggagaga acagatgctg ggtccgagca atagacgtcg

t
|||
t
|||
t

Y M C E D T I T Y E C P K L I M G N D P
601 gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg aatgtcctaa gctcaccatg ggcaatgatc

E D V D C W C D N Q E V Y V Q Y G R C T
661 cagaggatgt ggactgctgg tgtgacaacc aagaggtcta cgtccaatat ggacgggtgca

R T R H S K R S R R S V S V Q T H G E S
721 cgcggaccag gcattccaag cgaagcagga gatccgtgtc agtccaaaca catggggaga

S L V N K K E A W L D S T K A T R Y L M
781 gttcactagt gaataaaaaa gaggcttggc tggattcaac gaaagccaca cgatacctca

K T E N W I I R N P G Y A F L A A I L G
841 tgaaaaccga gaactggatc ataaggaatc ctggctatgc tttctgtggc gcgatacttg

S

W M L G S N N G Q R V V F T I L L L L V
901 gctggatgct tggcagtaac aacgggtcaac gcgtgggtatt caccatcctc ctgctgttgg

A P A Y S F N C L G M G N R D F I E G A
961 tcgctccggc ttatagtttc aactgtctgg gaatgggcaa tcgtgacttc atagaaggag

S G A T W V D L V L E G D S C L T I M A
1021 ccagtggagc cacttgggtg gacttgggtg tagaaggaga cagctgcttg acaatcatgg

N D K P T L D V R M I N I E A S Q L A E
1081 caaacgacaa accaacattg gacgtccgca tgatcaacat cgaagctagc caacttgctg

V R S Y C Y H A S V T D I S T V A R C P
1141 aggtcagaag ttactgctat catgcttcag tcaactgacat ctcgacgggtg gctcgggtgcc

T T G E A H N E K R A D S S Y V C K Q G
1201 ccacgactgg agaagcccac aacgagaagc gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag

F T D R G W G N G C G L F G K G S I D T
1261 gcttcactga tcgtgggtgg ggcaacggat gtggactttt cgggaaggga agtattgaca

C A K F S C T S K A I G R T I Q S E N I
1321 catgtgcaaa attctcctgc accagcaaag cgattggaag aacaatccag tcagaaaaca

K Y E V G I F V H G T T T S E N H G N Y
1381 tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg gaaccaccac ttcggaaaac catgggaatt

S A Q V G A S Q A A K F T V T P N A P S
1441 attcagcgca agttggggcg tcccaggcgg caaagtttac agtaacacct aatgctcctt

I T L K L G D Y G E V T L D C E P R S G
1501 cgataaccct caaacttggg gactacggag aagtcacact ggactgtgag ccaaggagtg

L N T E A F Y V M T V G S K S F L V H R
1561 gactaaacac tgaagcgttt tacgtcatga ccgtgggggtc aaagtcattt ttggtccata

E W F H D L A L P W T P P S S T A W R N
1621 gggaaatggtt tcatgacctc gctctccctt ggacgcccc ttcgagcaca gcgtggagaa

R E L L M E F E E A H A T K Q S V V A L
1681 acagagaact cctcatggaa tttgaagagg cgcacgccac aaaacagtcc gttgttgctc

G S Q E G G L H Q A L A G A I V V E Y S
1741 ttgggtcaca ggaaggaggg ctccatcagg cggtggcagg agccatcgtg gtggagtact

S S V K L T S G H L K C R L K M D K L A
 1801 caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc taaaatgcag gctgaaaatg gacaaactgg

a

L K G T T Y G M C T E K F S F A K N P A
 1861 ctctgaaagg cacaacctat ggtatgtgca cagaaaaatt ctcgttcgcg aaaaatccgg

D T G H G T V V I E L S Y S G S D G P C
 1921 cggacactgg tcacggaaca gttgtcattg aactttcata ctctgggagt gatggccct

K I P I V S V A S L N D M T P V G R L V
 1981 gcaagattcc gattgtctcc gttgctagcc tcaatgacat gacccccgtc gggcggtg

T V N P F V A T S S A N S K V L V E M E
 2041 tgacggtgaa ccccttcgtc gcgacttcca gcgccaactc aaaggtgctg gtcgagatgg

a

t

a

t

P P F G D S Y I V V G R G D K Q I N H H
 2101 aacccccctt cggagactcc tacatcgtag ttggaagggg agacaagcag attaaccacc

W Y K A G S T L G K A F S T T L K G A Q
 2161 attggtacaa ggctggaagc acgctgggca aagcctttc aacgactttg aaggagctc

R L A A L G D T A W D F G S I G G V F N
 2221 aaagactggc agcgttgggc gacacagcct gggactttgg ctctattgga ggggtcttca

S I G K A V H Q V F G G A F R T L F G G
 2281 actccatagg gaaagctggt caccaagtgt ttggtggtgc cttcagaaca ctctttgggg

M S W I T Q G L M G A L L L W M G I N A
 2341 gaatgtcttg gatcacacaa gggctaattg gggccctact actttggatg ggcacacag

R D R S I A L A F L A T G
 2401 cacgagaccg atcaattgct ttggccttct tagccacagg a 2441

cacgagaccg atcaattgct ttggccttct tagccacagg a

AGTTGTTAGT	CTACGTGGAC	CGACAAAGAC	AGATTCTTTG	AGGGAGCTAA	GCTCAACGTA	GTTCTAACAG
TTTTTTAATT	AGAGAGCAGA	TCTCTGATGA	ATAACCAACG	GAAAAAGGCG	AAAAACACGC	CTTTCAATAT
GCTGAAACGC	GAGAGAAACC	GCGTGTCTGAC	TGTGCAACAG	CTGACAAAGA	GATTCTCACT	TGGAATGCTG
CAGGGACGAG	GACCATTAAA	ACTGTTTCATG	GCCCTGGTGG	CGTTCCTTCG	TTTCCTAACA	ATCCCACCAA
CAGCAGGGAT	ATTGAAGAGA	TGGGGAACAA	TTAAAAAATC	AAAAGCTATT	AATGTTTTGA	GAGGGTTCAG
GAAAGAGATT	GGAAGGATGC	TGAACATCTT	GAATAGGAGA	CGCAGATCTG	CAGGCATGAT	CATTATGCTG
tggetcgcga	gcttggcagt	tgttatagcc	tgcgcaggag	ccatgaagtt	gtcaaatttc	caggggaagc
ATTCCAACAG	TGATGGCGTT	CCATTTAACC	ACACGT----	-----	-----	AACGGAGAAC
Ttttgatgac	catcaacaac	acggacattg	cagacgttat	cgtgattccc	acctcaaaaag	gagagaacag
CACACATGAT	CGTCAGCAGA	CAAGAGAAAG	GGAAAAGTCT	TCTGTTTAAA	ACAGAGGATG	GCGTGAACAT
atgctgggtc	cgagcaatag	acgtcggcta	catgtgtgag	gacactatca	cgtacgaatg	tcctaagctc
GTGTACCCTC	ATGGCCATGG	ACCTTGGTGA	ATTGTGTGAA	GACACAATCA	CGTACAAGTG	TCCCCTTCTC
accatgggca	atgatccaga	ggatgtggac	tgctgggtgtg	acaaccaaga	ggtctacgtc	caatatggac
AGGCAGAAATG	AGCCAGAAGA	CATAGACTGT	TGGTGCAACT	CTACGTCCAC	GTGGGTAAC	TATGGGACGT
Ggtgcacgcg	gaccaggcat	tccaagcgaa	gcaggagatc	cgtgtcagtc	caaacacatg	gggagagttc
GTACCACCAT	GGGAGAACAT	AGAAGAGAAA	AAAGATCAGT	GGCACTCGTT	CCACATGTGG	GAATGGGACT
Actagtgaat	aaaaaagagg	cttggctgga	ttcaacgaaa	gccacacgat	acctcatgaa	aaccgagaac
GGAGACACGA	ACTGAAACAT	GGATGTCATC	AGAAGGGGCC	TGGAAACATG	TCCAGAGAAT	TGAAACTTGG

```

Tggatcataa ggaatcctgg ctatgctttt ctggcggcga tacttggetg gatgcttgge agtaacaacg
ATCTTGAGAC ATCCAGGCTT CACCATGATG GCAGCAATCC TGGCATAACAC CATAGGAACG ACACATTTCC
// // // // // // //

gtcaacgcgt ggtattcacc atcctcctgc tgttggtcgc tccggcttat agtttcaact gtctgggaat
AAAGAGCCCT GATTTTCATC TTACTGACAG CTGTCACTCC TTCAATGACA ATGCGTTGCA TAGGAATGTC
// // a // // // // // // //

gggcaatcgt gacttcatag aaggagccag tggagccact tgggtggact tgggtgctaga aggagacagc
AAATAGAGAC TTTGTGGAAG GGGTTTCAGG AGGAAGCTGG GTTGACATAG TCTTAGAACA TGGGAAGCTGT
// // // // // // //

tgcttgacaa tcatggcaaa cgacaaacca acattggaag tccgcgatgat caacatcgaa gctagccaac
GTGACGACGA TGGCAAAAAA CAAACCAACA TTGGATTTTG AACTGATAAA AACAGAAGCC AAACAGCCTG
// // // // // // //

ttgetgaggt cagaagttac tgctatcatg cttcagtcac tgacatctcg acggtggctc ggtgccccac
CCACCCTAAG GAAGTACTGT ATAGAGGCAA AGCTAACCAA CACAACAACA GAATCTCGCT GCCCAACACA
// // // // // // //

gactggagaa gcccacaacg agaagcgagc tgatagtagc tatgtgtgca aacaaggctt cactgatcgt
AGGGGAACCC AGCCTAAATG AAGAGCAGGA CAAAAGGTTT GTCTGCAAAC ACTCCATGGT AGACAGAGGA
// // // // // // //

gggtggggca acggatgtgg acttttcggg aagggaagta ttgacacatg tgcaaaattc tcoctgcacca
TGGGGAAATG GATGTGGACT ATTTGGAAAG GGAGGCATTG TGACCTGTGC TATGTTTCTG TCAAAAAGA
// // // // // // //

gcaaagcgat tggaagaaca atccagtcag aaaacatcaa atacgaagtt ggcatttttg tgcattggaac
ACATGGAAGG AAAAGTTGTG CAACCAGAAA ACTTGGAATA CACCATTGTG ATAACACCTC ACTCAGGGGA
// g // // g // // c // // // // // // //

caccacttcg gaaaaccatg ggaattatto agcgcaagtt ggggcgtccc aggcgggcaaa gtttacagta
AGAGCATGCA GTCGGAAATG ACACAGGAAA ACATGGCAAG GAAATCAAAA TAACACCACA GAGTTCATC
// // // // // // //

acacctaatg ctccctcgat aaccctcaaa cttggtgact acggagaagt cacactggac tgtgagccaa
ACAGAAGCAG AATTGACAGG TTATGGCACT GTCACAATGG AGTGCTCTCC AAGAACGGGC CTCGACTTCA
// // // // // // //

ggagtggact aaacactgaa gcgttttaag tcatgaccgt ggggtcaaag tcatttttgg tccataggga
ATGAGATGGT GTTGCTGCAG ATGGAAAATA AAGCTTGGCT GGTGCACAGG CAATGGTTCC TAGACCTGCC
// // // // // // //

atggtttcat gacctcgctc tcccttggac gccccttcg agcacagcgt ggagaaacag agaactcctc
GTTACCATGG TTGCCCGGAG CGGACACACA AGGGTCAAAT TGGATACAGA AAGAGACATT GGTCACCTTC
// // // // // // //

```

```

atggaatttg aagaggcgca cgccacaaaa cagtcggttg ttgctcttgg gtcacaggaa ggaggcctcc
AAAAATCCCC ATGCGAAGAA ACAGGATGTT GTTGTTTTAG GATCCCAAGA AGGGGCCATG CACACAGCAC
// // // // // // //

atcaggcggtt ggcaggagcc atcgtggttg agtactcaag ctcaagtgaag ttaacatcag gccacctaaa
TTACAGGGGC CACAGAAATC CAAATGTCAT CAGGAAACTT ACTCTTCACA GGACATCTCA AGTGCAGGCT
// // // // // // //

atgcaggctg aaaatggaca aactggctct gaaaggcaca acctatggta tgtgcacaga aaaattctcg
GAGAATGGAC AAGCTACAGC TCAAAGGAAT GTCATACTCT ATGTGCACAG GAAAGTTTAA AGTTGTGAAG
// // // // // // //

ttcgcgaaaa atccggcgga cactggtcac ggaacagttg tcattgaact ttcatactct gggagtgatg
GAAATAGCAG AAACACAACA TGAACAATA GTTATCAGAG TGCAATATGA AGGGGACGGC TCTCCATGCA
// // // // // // //

gccctgcaa gattccgatt gtctccgttg ctagcctcaa tgacatgacc cccgtcgggc ggctggtgac
AGATCCCTTT TGAGATAATG GATTGGAATA AAAGACATGT CTAGGTCGC CTGATTACAG TCAACCCAAT
// // // // // // //

ggtgaacccc ttcgtcgga cttccagcgc caactcaaag gtgctggctg agatggaacc ccccttcgga
TGTGACAGAA AAAGATAGCC CAGTCAACAT AGAAGCAGAA CCTCCATTCG GAGACAGCTA CATCATCATA
a // // // // // // //
// // // // // // //

Gactcctaca tcgtagttgg aaggggagac aagcagatta accaccattg gtacaaggct ggaagcacgc
GGAGTAGAGC CGGGACAAC TGAAGCTCAAC TGGTTTAAGA AAGGAAGTTC TATCGGCCAA ATGTTTGAGA
// // // // // // //

tgggcaaagc cttttcaacg actttgaagg gagtcaaag actggcagcg ttgggcgaca cagcctggga
CAACAATGAG GGGGGCGAAG AGAATGGCCA TTTTAGGTGA CACAGCCTGG GATTTTGGAT CCTTGGGAGG
// // // // // // //

ctttggctct attggagggg tcttcaactc catagggaag gctgttcacc aagtgtttgg tgggtgcctc
AGTGTTTACA TCTATAGGAA AGGCTCTCCA CCAAGTCTTT GGAGCAATCT ATGGAGCTGC CTTAGTGGG
// // // // // // //

agaacactct ttgggggaat gtcttgatc acacaagggc taatgggggc cctactactt tggatgggca
GTTTCATGGA CTATGAAAAT CCTCATAGGA GTCATTATCA CATGGATAGG AATGAATTCA CGCAGCACCT
// // // // // // //

tcaacgcacg agaccgatca attgctttgg ccttcttagc cgccggc
CACTGTCTGT GACACTAGTA TTGGTGGGA- -----ATT GTGACACTGT ATTTGGGAGT
// // // // // // //
// // // // // // //

CATGGTGCAG GCCGATAGTG GTTGC GTTGT GAGCTGGAAA AACAAAGAAC TGAAATGTGG CAGTGGGATT
// // // // // // //
// // // // // // //

```

TTTCATCACAG	ACAACGTGCA	CACATGGACA	GAACAATACA	AGTTCCAACC	AGAATCCCCT	TCAAAACTAG
CTTCAGCTAT	CCAGAAAGCC	CATGAAGAGG	GCATTTGTGG	AATCCGCTCA	GTAACAAGAC	TGGAGAATCT
GATGTGGAAA	CAAATAACAC	CAGAATTGAA	TCACATTCTA	TCAGAAAATG	AGGTGAAGTT	AACTATTATG
ACAGGAGACA	TCAAAGGAAT	CATGCAGGCA	GGAAAACGAT	CTCTGCGGCC	TCAGCCCCT	GAGCTGAAGT
ATTCATGGAA	AACATGGGGC	AAAGCAAAAA	TGCTCTCTAC	AGAGTCTCAT	AACCAGACCT	TTCTCATTGA
TGGCCCCGAA	ACAGCAGAAT	GCCCCAACAC	AAATAGAGCT	TGGAATTTCG	TGGAAGTTGA	AGACTATGGC
TTTGGAGTAT	TCACCACCAA	TATATGGCTA	AAATTGAAAG	AAAAACAGGA	TGTATTCTGC	GACTCAAAAC
TCATGTCAGC	GGCCATAAAA	GACAACAGAG	CCGTCCATGC	CGATATGGGT	TATTGGATAG	AAAGTGCCT
CAATGACACA	TGGAAGATAG	AGAAAGCCTC	TTTCATTGAA	GTAAAAACT	GCCACTGGCC	AAAATCACAC
ACCCTCTGGA	GCAATGGAGT	GCTAGAAAGT	GAGATGATAA	TTCCAAAGAA	TCTCGCTGGA	CCAGTGTCTC
AACACAATA	TAGACCAGGC	TACCATACAC	AAATAACAGG	ACCATGGCAT	CTAGGTAAGC	TTGAGATGGA
CTTTGATTTC	TGTGATGGAA	CAACAGTGGT	AGTGACTGAG	GACTGCGGAA	ATAGAGGACC	CTCTTTGAGA
ACAACCACTG	CCTCTGGAAA	ACTCATAACA	GAATGGTGCT	GCCGATCTTG	CACATTACCA	CCGCTAAGAT
ACAGAGGTGA	GGATGGGTGC	TGGTACGGGA	TGGAAATCAG	ACCATTGAAG	GAGAAAGAAG	AGAATTTGGT

CAACTCCTTG	GTCAAGCTG	GACATGGGCA	GGTCGACAAC	TTTTCCTAG	GAGTCTTGGG	AATGGCATTG
TTCTGGAGG	AAATGCTTAG	GACCCGAGTA	GGAACGAAAC	ATGCAATACT	ACTAGTTGCA	GTTTCTTTTG
TGACATTGAT	CACAGGGAAC	ATGTCCTTTA	GAGACCTGGG	AAGAGTGATG	GTTATGGTAG	GCGCCACTAT
GACGGATGAC	ATAGGTATGG	GCGTGACTTA	TCTTGCCCTA	CTAGCAGCCT	TCAAAGTCAG	ACCAACTTTT
GCAGCTGGAC	TACTCTTGAG	AAAGCTGACC	TCCAAGGAAT	TGATGATGAC	TACTATAGGA	ATTGTACTCC
TCTCCCAGAG	CACCATACCA	GAGACCATTG	TTGAGTTGAC	TGATGCGTTA	GCCTTAGGCA	TGATGGTCCT
CAAAATGGTG	AGAAATATGG	AAAAGTATCA	ATTGGCAGTG	ACTATCATGG	CTATCTTGTG	CGTCCCAAAC
GCAGTGATAT	TACAAAACGC	ATGGAAAGTG	AGTTGCACAA	TATTGGCAGT	GGTGTCCGTT	TCCCCACTGC
TCTTAACATC	CTCACAGCAA	AAAACAGATT	GGATACCATT	AGCATTGACG	ATCAAAGGTC	TCAATCCAAC
AGCTATTTTT	CTAACAACCC	TCTCAAGAAC	CAGCAAGAAA	AGGAGCTGGC	CATTAAATGA	GGCTATCATG
GCAGTCGGGA	TGGTGAGCAT	TTTAGCCAGT	TCTCTCCTAA	AAAATGATAT	TCCCATGACA	GGACCATTAG
TGGCTGGAGG	GCTCCTCACT	GTGTGCTACG	TGCTCACTGG	ACGATCGGCC	GATTTGGAAC	TGGAGAGAGC
AGCCGATGTC	AAATGGGAAG	ACCAGGCAGA	GATATCAGGA	AGCAGTCCAA	TCCTGTCAAT	AACAATATCA
GAAGATGGTA	GCATGTCGAT	AAAAAATGAA	GAGGAAGAAC	AAACACTGAC	CATACTCATT	AGAACAGGAT
TGCTGGTGAT	CTCAGGACTT	TTTCCTGTAT	CAATACCAAT	CACGGCAGCA	GCATGGTACC	TGTGGGAAGT

CGGACATGAA TGGGTCACGG ATTTTAAAGG GAAGACTGTT TGGTTCGTTC CAAGTATAAA AGCAGGAAAT

GATATAGCAG CTTGCCTGAG GAAAAATGGA AAGAAAGTGA TACAACTCAG TAGGAAGACC TTTGATTCTG

AGTATGTCAA GACTAGAACC AATGATTGGG ACTTCGTGGT TACAACTGAC ATTCAGAAA TGGGTGCCAA

TTTCAAGGCT GAGAGGGTTA TAGACCCAG ACGCTGCATG AAACCAGTCA TACTAACAGA TGGTGAAGAG

CGGGTGATTC TGGCAGGACC TATGCCAGTG ACCCACTCTA GTGCAGCACA AAGAAGAGGG AGAATAGGAA

GAAATCCAAA AAATGAGAAT GACCAGTACA TATACATGGG GGAACCTCTG GAAAATGATG AAGACTGTGC

ACACTGGAAA GAAGCTAAAA TGCTCCTAGA TAACATCAAC ACGCCAGAAG GAATCATTCCT TAGCATGTTC

GAACCAGAGC GTGAAAAGGT GGATGCCATT GATGGCGAAT ACCGCTTGAG AGGAGAAGCA AGGAAAACCT

TTGTAGACTT AATGAGAAGA GGAGACCTAC CAGTCTGGTT GGCCTACAGA GTGGCAGCTG AAGGCATCAA

CTACGCAGAC AGAAGGTGGT GTTTTGATGG AGTCAAGAAC AACCAAATCC TAGAAGAAAA CGTGGAAGTT

GAAATCTGGA CAAAAGAAGG GGAAAGGAAG AAATTGAAAC CCAGATGGTT GGATGCTAGG ATCTATTCTG

ACCCACTGGC GCTAAAAGAA TTTAAGGAAT TTGCAGCCGG AAGAAAGTCT CTGACCCTGA ACCTAATCAC

AGAAATGGGT AGGCTCCCAA CCTTCATGAC TCAGAAGGCA AGAGACGCAC TGGACAACTT AGCAGTGCTG

CACACGGCTG AGGCAGGTGG AAGGGCGTAC AACCATGCTC TCAGTGAACCT GCCGGAGACC CTGGAGACAT

TGCTTTTACT	GACACTTCTG	GCTACAGTCA	CGGGAGGGAT	CTTTTATTTC	TTGATGAGCG	GAAGGGGCAT
AGGGAAGATG	ACCCTGGGAA	TGTGCTGCAT	AATCACGGCT	AGCATCCTCC	TATGGTACGC	ACAAATACAG
CCACACTGGA	TAGCAGCTTC	AATAATACTG	GAGTTTTTTC	TCATAGTTTT	GCTTATTCCA	GAACCTGAAA
AACAGAGAAC	ACCCCAAGAC	AACCAACTGA	CCTACGTTGT	CATAGCCATC	CTCACAGTGG	TGGCCGCAAC
CATGGCAAAC	GAGATGGGTT	TCCTAGAAAA	AACGAAGAAA	GATCTCGGAT	TGGGAAGCAT	TGCAACCCAG
CAACCCGAGA	GCAACATCCT	GGACATAGAT	CTACGTCCTG	CATCAGCATG	GACGCTGTAT	GCCGTGGCCA
CAACATTTGT	TACACCAATG	TTGAGACATA	GCATTGAAAA	TTCTCAGTG	AATGTGTCCC	TAACAGCTAT
AGCCAACCAA	GCCACAGTGT	TAATGGGTCT	CGGGAAAGGA	TGGCCATTGT	CAAAGATGGA	CATCGGAGTT
CCCCTTCTCG	CCATTGGATG	CTACTCACAA	GTCAACCCCA	TAACTCTCAC	AGCAGCTCTT	TTCTTATTGG
TAGCACATTA	TGCCATCATA	GGGCCAGGAC	TCCAAGCAAA	AGCAACCAGA	GAAGCTCAGA	AAAGAGCAGC
GGCGGGCATC	ATGAAAAACC	CAACTGTCGA	TGGAATAACA	GTGATTGACC	TAGATCCAAT	ACCTTATGAT
CCAAAGTTTG	AAAAGCAGTT	GGGACAAGTA	ATGCTCCTAG	TCCTCTGCGT	GACTCAAGTA	TTGATGATGA
GGACTACATG	GGCTCTGTGT	GAGGCTTTAA	CCTTAGCTAC	CGGGCCCATC	TCCACATTGT	GGGAAGGAAA
TCCAGGGAGG	TTTTGGAACA	CTACCATTGC	GGTGTCAATG	GCTAACATTT	TTAGAGGGAG	TTACTTGGCC
GGAGCTGGAC	TTCTCTTTTC	TATTATGAAG	AACACAACCA	ACACAAGAAG	GGGAACTGGC	AACATAGGAG

```

AGACGCTTGG AGAGAAATGG AAAAGCCGAT TGAACGCATT GGGAAAAAGT GAATTCCAGA TCTACAAGAA
// // // // // // //
// // // // // // //

AAGTGAATC CAGGAAGTGG ATAGAACCTT AGCAAAAGAA GGCATTAAAA GAGGAGAAAC GGACCATCAC
// // // // // // //
// // // // // // //

GCTGTGTCGC GAGGCTCAGC AAAACTGAGA TGGTTCGTTG AGAGAAACAT GGTACACCA GAAGGGAAAG
// // // // // // //
// // // // // // //

TAGTGGACCT CGGTTGTGGC AGAGGAGGCT GGTCACTACTA TTGTGGAGGA CTAAAGAATG TAAGAGAAGT
// // // // // // //
// // // // // // //

CAAAGGCCTA ACAAAGGAG GACCAGGACA CGAAGAACCC ATCCCCATGT CAACATATGG GTGGAATCTA
// // // // // // //
// // // // // // //

GTGCGTCTTC AAAGTGGAGT TGACGTTTTTTC TTCATCCCGC CAGAAAAGTG TGACACATTA TTGTGTGACA
// // // // // // //
// // // // // // //

TAGGGGAGTC ATCACCAAAT CCCACAGTGG AAGCAGGACG AACACTCAGA GTCCTTAACT TAGTAGAAAA
// // // // // // //
// // // // // // //

TTGGTTGAAC AACAACTCTC AATTTTGCAT AAAGGTTCTC AACCCATATA TGCCCTCAGT CATAGAAAAA
// // // // // // //
// // // // // // //

ATGGAAGCAC TACAAAGGAA ATATGGAGGA GCCTTAGTGA GGAATCCACT CTCACGAAAC TCCACACATG
// // // // // // //
// // // // // // //

AGATGTACTG GGTATCCAAT GCTTCCGGGA ACATAGTGTC ATCAGTGAAC ATGATTTCAA GGATGTTGAT
// // // // // // //
// // // // // // //

CAACAGATTT ACAATGAGAT ACAAGAAAGC CACTTACGAG CCGGATGTTG ACCTCGGAAG CGGAACCCGT
// // // // // // //
// // // // // // //

AACATCGGGA TTGAAAGTGA GATACCAAAC CTAGATATAA TTGGGAAAAG AATAGAAAAA ATAAAGCAAG
// // // // // // //
// // // // // // //

AGCATGAAAC ATCATGGCAC TATGACCAAG ACCACCCATA CAAAACGTGG GCATACCATG GTAGCTATGA
// // // // // // //
// // // // // // //

AACAAAACAG ACTGGATCAG CATCATCCAT GGTCAACGGA GTGGTCAGGC TGCTGACAAA ACCTTGGGAC
// // // // // // //
// // // // // // //

```

GTCGTCCCCA TGGTGACACA GATGGCAATG ACAGACACGA CTCCATTGCG ACAACAGCGC GTTTTAAAG
 // // // // // // //
 // T // // // // // // //
 AGAAAGTGA CACGAGAACC CAAGAACC GAAGAAGGCAC GAAGAACTA ATGAAATAA CAGCAGAGTG
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 GCTTTGGAAA GAATTAGGGA AGAAAAAGAC ACCCAGGATG TGCACCAGAG AAGAATTCAC AAGAAAGGTG
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 AGAAGCAATG CAGCCTTGGG GGCCATATTC ACTGATGAGA ACAAGTGGAA GTCGGCACGT GAGGCTGTTG
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 AAGATAGTAG GTTTTGGGAG CTGGTTGACA AGGAAAGGAA TCTCCATCTT GAAGGAAAGT GTGAAACATG
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 TGTGTACAAC ATGATGGGAA AAAGAGAGAA GAAGCTAGGG GAATTCGGCA AGGCAAAAGG CAGCAGAGCC
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 ATATGGTACA TGTGGCTTGG AGCACGCTTC TTAGAGTTTG AAGCCCTAGG ATTCTTAAAT GAAGATCACT
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 GGTCTCCAG AGAGAACTCC CTGAGTGGAG TGGAAGGAGA AGGGCTGCAC AAGCTAGGTT ACATTCTAAG
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 AGACGTGAGC AAGAAAGAGG GAGGAGCAAT GTATGCCGAT GACACCGCAG GATGGGATAC AAGAATCACA
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 CTAGAAGACC TAAAAAATGA AGAAATGGTA ACAAACCACA TGGAAGGAGA ACACAAGAAA CTAGCCGAGG
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 CCATTTTCAA ACTAACGTAC CAAAACAAGG TGGTGCGTGT GCAAAGACCA ACACCAAGAG GCACAGTAAT
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 GGACATCATA TCGAGAAGAG ACCAAAGAGG TAGTGGACAA GTTGGCACCT ATGGACTCAA TACTTTCACC
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 AATATGGAAG CCCAACTAAT CAGACAGATG GAGGGAGAAG GAGTCTTTAA AAGCATTCAG CACCTAACAA
 // // // // // // //
 // // // // // // //
 TCACAGAAGA AATCGCTGTG CAAACTGGT TAGCAAGAGT GGGGCGCGAA AGGTTATCAA GAATGGCCAT
 // // // // // // //
 // // // // // // //

