



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการสร้างไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ 4 ด้วยวิธี **reverse genetics** เพื่อใช้
ในการศึกษาความแตกต่างด้านแอนติเจนภายในซีโรทัยป์

โดย

ดร.พร้อมสิน มาศรีนวล

30 มิถุนายน 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการสร้างไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ 4 ด้วยวิธี **reverse genetics** เพื่อใช้
ในการศึกษาความแตกต่างด้านแอนติเจนภายในซีโรทัยป์

ดร.พร้อมสิน มาศรีนวล

ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project code: TRG5880167

Project Title : Construction of dengue virus serotype 4 by reverse genetics technique for studying genotypic and antigenic variations

Investigator : Dr. Promsin Masrinoul

E-mail Address : promsin.mas@mahidol.ac.th

Project period: 1 July 2015 to 30 June 2017 (extended project period to 30 June 2018)

Dengue disease is a major public health problem in many countries. It is caused by dengue virus (DENV) which is antigenically distinguished into four serotypes, DENV1-4. Based on phylogenetic analysis, DENV serotype could be further classified into distinct genotypes. However, there is little information about an importance of genotypic difference within serotype in protective immunity from subsequent infection. The preliminary study of the screening of DENV4 based on neutralization capacity by human dengue immune sera revealed the variability of neutralization titer. Therefore, we hypothesize that genetic variation within DENV serotype may affect to the neutralization sensitivity. By the use of reverse genetics, we successfully generated DENV4 genotype 1 from virus which was isolated from Thai dengue patient and recombinant DENV4 expressing structural protein of different genotype of DENV4 (genotype II). These viruses were tested for their neutralization sensitivity against human DENV4 immune sera. Interestingly, the level of neutralizing antibody titer of recombinant DENV4 genotype 2 was 2-2.5 fold higher than that of DENV4 genotype I. The result indicates that antigenic variation within serotype of dengue virus affect to neutralization capability. Therefore, the recombinant DENV4 generated by reverse genetics in this project are valuable for studying the antigenic variation in dengue virus research and also development of effective vaccine.

Keywords (3-5 words): dengue virus, reverse genetics, antigenic variation

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5880167

ชื่อโครงการ การสร้างไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ 4 ด้วยวิธี reverse genetics เพื่อใช้ในการศึกษาความแตกต่างด้านแอนติเจนภายในซีโรทัยป์

ชื่อนักวิจัย ดร.พร้อมสิน มาศรีนวล

E-mail Address : promsin.mas@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2558 ถึงวันที่ 31 มิถุนายน 2560 (ขยายเวลาต่อถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2561)

โรคติดเชื้อไวรัสเด็งกีเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศรวมทั้งในประเทศไทย มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกีซึ่งมีอยู่ 4 ซีโรทัยป์ (DENV1-4) การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของไวรัสพบว่าภายในแต่ละซีโรทัยป์มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งแยกย่อยได้หลายจีโนทัยป์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลมากนักว่าความแตกต่างของไวรัสในด้านภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจะส่งผลต่อการป้องกันการติดเชื้อไวรัสที่ตามมามากเท่าไร การศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์ไวรัสของซีรัมต่อ DENV4 หลากหลายสายพันธุ์พบว่าซีรัมของคนที่มีภูมิคุ้มกันต่อ DENV4 สามารถหลบเลี่ยงฤทธิ์ไวรัสได้ แต่อยู่ในระดับที่แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงมีความเป็นไปได้ที่ความแตกต่างภายในซีโรทัยป์จะส่งผลต่อความยากง่ายในการหลบเลี่ยงฤทธิ์จากซีรัมของคนที่มีภูมิคุ้มกันต่อ DENV4 ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงได้สร้างไวรัสเด็งกีขึ้นโดยใช้เทคนิคทาง reverse genetics จาก DENV4 genotype 1 สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศไทย นอกจากนี้ได้สร้างไวรัสรีคอมบิแนนท์ที่เปลี่ยนแปลงส่วนโปรตีนโครงสร้างให้มีความแตกต่างทางจีโนทัยป์ (genotype 2) ของ DENV4 เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจนของ DENV4 ซึ่งเมื่อนำไวรัสที่สร้างขึ้นไปทดสอบความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์กับซีรัมของคนที่มีภูมิคุ้มกัน พบว่าไวรัสที่ต่างจีโนทัยป์มีระดับของแอนติบอดีที่หลบเลี่ยงฤทธิ์ในระดับที่ต่างกันถึง 2-2.5 เท่า แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างภายในซีโรทัยป์มีผลต่อระดับความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์ ดังนั้นการสร้างไวรัสด้วยเทคนิค reverse genetics ที่ได้จากโครงการนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจนของ DENV รวมทั้งการศึกษาค้นคว้าครอบคลุมทางภูมิคุ้มกันเพื่อใช้ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกีต่อไป

คำหลัก ไวรัสเด็งกี reverse genetics ความหลากหลายภายในซีโรทัยป์

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ร่วมกับมหาวิทยาลัยมหิดล ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ให้ทุนที่เล็งเห็นความสำคัญและสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ที่ช่วยให้การดำเนินงานของโครงการนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์เป็นอย่างดีจากผู้ที่ให้ความช่วยเหลือในกิจกรรมการวิจัยดังต่อไปนี้ ศ.ดร.นพ. ประเสริฐ เอื้อวรากุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล และ ศ.ดร.นพ. สุธี ยกสำน ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับคำแนะนำและแรงผลักดันที่ทำให้งานวิจัยสำเร็จ

ขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่าน ดร.ขวัญศิริ นิลแบน คุณฐิติกัลป์ ใจมิกดิ์ ดร.รจนกร พูลมานะอุสาทะกุล ดร.ชุตินา เทพฤทธิ์ ดร.อลิตา คงชนะกุล คุณกัญจิมาส เกตุสุวรรณ คุณสมนึก พลาบดีวัฒน์ คุณสุพจน์ ราชคำ ที่ทุ่มเททำให้โครงการนี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกอย่างต่อเนื่อง

ขอขอบคุณฝ่ายวิจัยของสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล คุณอัลซลี นีรชานนท์ คุณณัฐติยา เดชพรหม คุณณิชา โพธิ์สัตย์ คุณสุปราณี สุขกมลสันติพร ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือด้านงานเอกสารด้วยดีเสมอมา

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	2
กิตติกรรมประกาศ	4
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
บทนำ	8
วัตถุประสงค์ของโครงการ	10
วิธีการทดลอง	11
ผลการทดลอง	15
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
ข้อเสนอแนะสำหรับวิจัยในอนาคต	28
เอกสารอ้างอิง	29

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง primer ที่ใช้ในการศึกษา full-length genome ของ DENV4	12
ตารางที่ 2 primer ที่ใช้ในการสร้างไวรัส	13
ตารางที่ 3 แสดงส่วนผสมของชิ้นส่วนไวรัสในการทำ Gibson assembly	13
ตารางที่ 4 molecular clone ของชิ้นส่วนไวรัสที่สร้างขึ้นในโครงการ	17
ตารางที่ 5 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป ของไวรัส revDENV4-194 ที่สร้างขึ้น	21
ตารางที่ 6 ผลระดับความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์ของไวรัส	25

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 คุณลักษณะของไวรัส DENV4-194	15
รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของแต่ละชิ้นส่วน (fragment) ของไวรัสที่ใช้ในการประกอบเพื่อสร้าง DENV4 ด้วยวิธี Gibson assembly	16
รูปที่ 3 PCR products แสดงแต่ละชิ้นส่วนจีโนมของไวรัสแดงที่ DENV-4 194	16
รูปที่ 4 ตัวอย่าง molecular clone ของ D4-gF1 และ D4-gF3 ซึ่งทดสอบความถูกต้องของ clone ด้วย restriction enzyme analysis	17
รูปที่ 5 แสดงการทดสอบการ assembly โดยการรวมกันของชิ้นส่วนไวรัสพร้อมกัน	18
รูปที่ 6 ผลของ Gibson assembly โดยการทำ assembly ย่อย ในส่วน Gibson 1 (Vector+ Fr1+2+3) และ Gibson 2 (Fr4+5) ก่อนนำมา assembly อีกครั้ง	19
รูปที่ 7 การตรวจสอบการสร้างไวรัส revDENV-4 194 ภายหลังจาก transfection ด้วยวิธี Gibson assembly	19
รูปที่ 8 ผลการทดสอบการสร้างไวรัส revDENV4-194 ด้วย FFA	20
รูปที่ 9 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DENV4 Envelope จาก Genbank database และ DENV4-194	22
รูปที่ 10 การสร้าง recombinant DENV4 ในโครงการ	23
รูปที่ 11 ผลการตรวจสอบการสร้างไวรัส DENV4-194/genotype 2 และ 3 ด้วยวิธี FFA	24
รูปที่ 12 การตรวจสอบปริมาณไวรัสที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิค reverse genetics	24
รูปที่ 13 กราฟค่าเฉลี่ยของ neutralizing antibody titer ในกลุ่มชิมรุ่มของคนที่ได้รับวัคซีนตั้งที่กลุ่มคนที่มีภูมิคุ้มกันของ DENV4 และค่าเฉลี่ยรวมทั้งสองกลุ่ม	25

บทนำ

โรคติดเชื้อเด็งกีเป็นโรคที่มีความสำคัญในหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศในเขตร้อนชื้น รวมทั้งประเทศไทย มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี (DENV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Flaviviridae ไวรัสกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายแบ่งออกได้เป็น 4 ซีโรทัยป์ (serotype) ได้แก่ DENV1, DENV2, DENV3, และ DENV4. (Guzman MG. et al, 2010). การติดเชื้อต่อไวรัสชนิดใดชนิดหนึ่งเชื่อว่าจะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันระยะยาวต่อไวรัสชนิดนั้นไปตลอดชีวิตแต่จะมีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสชนิดอื่นในระยะสั้น อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่าภายใน DENV แต่ละ serotype มีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก โดยแบ่งย่อยออกได้เป็นหลายจีโนทัยป์ (genotype) โดย DENV1 แบ่งออกได้เป็น 5 genotypes โดย genotype 1 พบได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศจีน และแอฟริกันตะวันออก genotype 2 พบในประเทศไทยในช่วงปี 1950 และ 1960 genotype 3 เป็นสายพันธุ์ sylvatic จากประเทศมาเลเซีย genotype 4 พบในหมู่เกาะแปซิฟิกตะวันตก และออสเตรเลีย และ genotype 5 พบในอเมริกา แอฟริกันตะวันตก และเอเชีย DENV2 แบ่งออกได้เป็น 5 genotypes หลัก ได้แก่ 1) Asian genotype 1 พบในมาเลเซียและไทย และ Asian genotype 2 พบในประเทศเวียดนาม จีน ไต้หวัน ศรีลังกาและฟิลิปปินส์ 2) Cosmopolitan genotype พบในหลายภูมิภาค เช่น ออสเตรเลีย แอฟริกันตะวันออกและตะวันตก หมู่เกาะแปซิฟิกและหมู่เกาะอินเดีย 3) American genotype พบได้ในลาตินอเมริกา และหมู่เกาะแคริบเบียน หมู่เกาะอินเดีย และหมู่เกาะแปซิฟิก 4) Southeast Asian/American genotype พบในประเทศไทยและเวียดนาม 5) Sylvatic genotype เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากยุงในป่า และในลิงในแอฟริกันตะวันตกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

DENV3 แบ่งย่อยออกเป็น 4 genotype ได้แก่ genotype 1 พบได้ในประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และหมู่เกาะแปซิฟิกตอนใต้ genotype 2 พบในประเทศไทย เวียดนามและบังกลาเทศ genotype 3 พบในประเทศศรีลังกา อินเดีย แอฟริกัน และ genotype IV พบได้ในประเทศโบเตอริโก ลาตินอเมริกา และอเมริกากลาง

สำหรับ DENV4 นั้นเป็นไวรัสแรกที่แยกออกจากกลุ่มไวรัสเด็งกี แบ่งออกได้เป็น 4 genotypes ใหญ่ๆ โดย genotype 1 พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย ฟิลิปปินส์ และประเทศเอเชียใต้ ได้แก่ อินเดีย ปากีสถาน และ ศรีลังกา genotype 2 พบในประเทศอินโดนีเซีย ไทย มาเลเซีย ประเทศในแถบมหาสมุทรแคริบเบียนและอเมริกาใต้ genotype 3 มีลำดับเบสแตกต่างจาก genotype อื่น พบในประเทศไทย (Klungthong et al., 2004) และ genotype 4 เป็นสายพันธุ์ sylvatic จากประเทศมาเลเซีย (Weaver SC et al., 2009) ซึ่งพบว่าภายใน genotype มีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน envelope อยู่ประมาณ 4% สำหรับประเทศไทยนั้นพบ DENV4 ได้ทั้ง 3 genotypes โดยปัจจุบันพบว่าไวรัสส่วนใหญ่อยู่ใน genotype 1 (Zhao R. et al, 2010). อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนว่าความแตกต่างภายในซีโรทัยป์นั้นส่งผลมากนักต่อการติดเชื้อไวรัสในครั้งต่อไป

งานวิจัยก่อนหน้านี้โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส DENV3 พบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน envelope บางตัวไม่สามารถกลบล้างฤทธิ์ครอบคลุมไวรัสทุก genotype ภายในซีโรทัยป์เดียวกันได้ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของแอนติบอดีในแต่ละ genotype ยังมีความแตกต่างกัน (Wahala, 2010) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายภายใน DENV serotype มีผลกระทบต่อความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์ของไวรัส

ก่อนหน้านี้ที่มิวจัยได้ทดสอบความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์ของซีรัมที่ภูมิคุ้มกันต่อ DENV4 หลายสายพันธุ์ ได้แก่ DENV4-1036 laboratory strain และ DENV4 หลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยใน

ประเทศไทย ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าซีรัมของคนที่มีภูมิคุ้มกันต่อ DENV4 สามารถกลบล้างฤทธิ์ได้แต่อยู่ในระดับที่แตกต่างกัน โดยระดับของความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์ของไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทย ซึ่งเป็น DENV4 genotype 1 นั้นมีความแตกต่างจากไวรัส DENV4-1036 laboratory strain ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศอินโดนีเซียจัดอยู่ใน genotype 2 จึงเป็นที่น่าสนใจว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นเกิดจากความแตกต่างทาง genotype หรือไม่

อย่างไรก็ตามไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยนั้นเป็นไวรัส genotype 1 และไม่มีไวรัส genotype อื่น ดังนั้นเพื่อให้ได้ไวรัสสายพันธุ์ที่หลากหลายมาใช้ในการศึกษา นอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนการแยกเชื้อไวรัสจากผู้ป่วยในหลายๆ พื้นที่แล้ว ซึ่งอาจเสี่ยงต่อการไม่ได้ไวรัสที่ต่าง genotype วิธีอื่นที่สามารถดำเนินการได้คือการใช้นวัตกรรมทางด้าน reverse genetics ในการสร้างไวรัส ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้และประสบความสำเร็จในการสร้างไวรัสหลายชนิดทั้งในกลุ่ม Flavivirus, Picornavirus, และ Alphavirus เป็นต้น (Stobart CC, 2014) นอกจากนั้นการสร้างไวรัสด้วยวิธีนี้สามารถปรับเปลี่ยนตำแหน่งและลำดับเบสในไวรัสจีโนมเพื่อใช้ในการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการสร้าง DENV4 โดยใช้เทคนิค reverse genetics ด้วยวิธี Gibson assembly จากไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย และเพื่อศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจนของไวรัสภายใน DENV4 ผู้วิจัยได้สร้างรีคอมบิแนนท์ไวรัสที่ปรับเปลี่ยนโปรตีนโครงสร้างของ DENV4 genotype อื่น และนำไวรัสที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์กับซีรัมของคนที่มีภูมิคุ้มกันต่อ DENV4 เพื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ไวรัสที่สร้างขึ้นด้วยวิธีนี้เป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจนของ DENV และเป็นประโยชน์ในงานวิจัยทางด้านวัคซีนเพื่อศึกษาความครอบคลุมของภูมิคุ้มกันของวัคซีนแอนติเจนในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสร้าง DENV4 ด้วยวิธี reverse genetics จากสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และใช้วิธีนี้ในการสร้างไวรัสรีคอมบิแนนท์ที่เปลี่ยนแปลงส่วนโปรตีนโครงสร้าง สำหรับใช้ในการทดสอบความหลากหลายทางแอนติเจนของ DENV4
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของไวรัสที่ได้ เช่น ความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์ต่อชีรั่ม เป็นต้น

วิธีการทดลอง

1. ไวรัสและเซลล์

เซลล์ไตลิง (African green monkey kidney cell; Vero) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Modified Eagle's medium (MEM) ที่ผสมด้วย fetal bovine serum (FBS) และเซลล์เพาะเลี้ยงไตมนุษย์ (human embryonic kidneys; HEK-293T) ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ผสม FBS และ penicillin/streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5%CO₂ เซลล์ยุง *Aedes albopictus*, C6/36 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Leibovitz's (L-15) ที่ผสมด้วย Tryptose phosphate broth และ FBS ที่อุณหภูมิ 28°C

ไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ 194 ที่นำมาใช้ในการสร้างไวรัส นั้น เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยโรคไข้เด็งกีในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554 โดย ศ.ดร.นพ.สุธี ยุกส้าน ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ไวรัสถูกเพิ่มจำนวนในเซลล์ C6/36 และเซลล์ Vero ทำการเก็บไวรัสด้วยการปั่นแยกตามวิธีมาตรฐานเมื่อพบพยาธิสภาพของเซลล์ภายหลังการติดเชื้อประมาณ 80-90% ไวรัสที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80°C และวัดปริมาณไวรัสด้วยวิธี Focus formation assay (FFA)

2. การวัดปริมาณไวรัสด้วยวิธี FFA

ในการวัดปริมาณของไวรัสด้วยวิธี FFA นั้น ไวรัสถูกเจือจางเป็น 2 เท่า (2-fold dilution) และติดเชื้อลงในเซลล์ Vero monolayer ใน 24-well plate เป็นระยะเวลา 90 นาที เซลล์ที่ติดเชื้อถูก overlay ด้วย MEM medium ที่ประกอบด้วย 2% Carboxymethyl cellulose (CMC) และ 5% FBS ทำการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้น fix เซลล์ด้วย 80% acetone solution ในน้ำกลั่น เป็นระยะเวลา 30 นาที

เมื่อทำการล้าง plate ด้วย PBS-Tween 20 (PBST) แล้วเซลล์จะถูก permeabilize ด้วย 0.5% triton X-100/PBS-T เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติม anti-dengue serotype- specific purified IgG, 4G2 monoclonal antibody ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง plate ด้วย PBST อีกครั้งหนึ่งและเติม polyclonal goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Jackson ImmunoResearch) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำการเติม diaminobenzidine DAB หรือ (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) substrate เซลล์ที่มีการติดเชื้อจะปรากฏเป็นลักษณะ foci สีน้ำตาลดำ ทำการนับจำนวน foci ที่ปรากฏเพื่อคำนวณหาปริมาณของไวรัสตั้งต้นต่อไป

3. การศึกษาลำดับเบสของจีโนมของ DENV4

สกัด RNA ของ DENV4-194 ด้วยวิธี phenol-chloroform extraction (Trizol) และวัดปริมาณ RNA ที่ได้ด้วย nanodrop ก่อนเก็บรักษา RNA ที่อุณหภูมิ -80°C หรือดำเนินการสร้าง cDNA โดย Superscript III (Invitrogen) ซึ่งมีขั้นตอนคร่าวๆ ดังนี้ ผสม RNA ของไวรัสกับ random hexamer ที่ 65°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นสังเคราะห์ cDNA โดยเติม First-Strand Buffer, DTT, RNase OUT™ RNase Inhibitor, และ Superscript reverse transcriptase enzyme ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที, อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 60 นาที, และ 70°C เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการเพิ่มชิ้นส่วนของไวรัสด้วยวิธี PCR ด้วย primer ที่จำเพาะ (ตารางที่ 1) โดยแบ่งออกเป็น 7 ชิ้นส่วนตลอดความยาวของ viral genome ในส่วนของ 5'UTR ของ DENV4-194 ศึกษาลำดับเบสโดยใช้ 5'/3' RACE kit (Roche) ชิ้นส่วนของ PCR ที่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR gel purification kit และศึกษาลำดับเบสโดยการ sequencing

ตารางที่ 1 แสดง primer ที่ใช้ในการศึกษา full-length genome ของ DENV4

Fragment	Primers	Primers sequence (5'-3')*	Nucleotide position
D4-S1 0.8 kb	D4-1F-1	AGT TGT TAG TCT GTG TGG ACC	1-836
	D4-R646	TTG CAC CAG CAA TCA ATG TCT TCG GGT T	
	D4-1R-836	TCC TGG GTT TCT GAG TAT CCA	
D4-S2 2.9 kb	D4-2F-717	GTA GCT WTA ACA CCA CAT TC	717-3624
	D4-F1613	GAA TCA CAA AGA GAG AAT GGT	
	D4-NS1-R640	TCT CTA TCT GCC AGG TCT GGT	
	D4-2R-3642	GTA GTA AGT CCA TCC ATG TG	
D4-S3 2.4 kb	D4-NS1 F526-545	TCA GAA GTG TGT GAC CAC AG	2949-5383
	D4-F3480	GGA CAG GGT ACA TCA GAG AC	
	D4-F3992	GTT TGT GGT CAC ACT CAT T	
	D4-3R-5383	TGY GCT TCA TCC ATC ACT AT	
D4-S4 1.8 kb	D4-4F-5313	ACC TTY ACA ACA AGA CTT TT	5313-7127
	D4-F5862	ATT CCA GTG ACT CCA GCA A	
	D4-F6343	TGA AGG ATT TCA AGG AGT	
	D4-4R-7127	GTT CAC TTG RGA ATA GCA TC	
D4-S5 1.8 kb	D4-5F-6975	AGR CAC ACC ATA GAA AAC AC	6975-8768
	D4-F7414	GAC CAA TCT TGA CCT TGT	
	D4-F7815	GGA GGA TGG TCG TAC TAT ATG G	
	D4-5R-8768	TTT TGA GAT GAA YTC TTC C	
D4-S6 1.4 kb	D4-6F-8350	GAA GTG TCT CCA CYG AAA C	8350-9764
	D4-F9070	CAT GGA GTG GAG TGG AAG	
	D4-6R-9764	TTC ATC CTG GTT TCT ACA T	
D4-S7 1.2 kb	D4-7F-9485	AGA AAG AGT TGA GAA ATG G	9485-10649
	D4-F9984	GAAGATATGCTCAAAGTG	
	D4-7R-10649	AGA ACC TGT TGG ATC AAC	

* degenerate nucleotide; W= T or A, Y=C or T, R=G or A

4. การสร้างไวรัส DENV4 ด้วยวิธี reverse genetics

ในการสร้างไวรัสด้วยวิธี reverse genetics โดยเทคนิค Gibson assembly นั้น เริ่มต้นโดยออกแบบ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนและแบ่งไวรัสจีโนมของ DENV4-194 ออกเป็น 5 ชิ้นส่วนครอบคลุมไวรัสตลอดสาย โดยแต่ละชิ้นส่วนประกอบด้วยส่วนที่ซ้อนทับกัน (overlap) ประมาณ 18-20 เบส และมีความยาวดังนี้ ชิ้นส่วนที่ 1 (D4-gF1) มีความยาว 2,458 base pairs (bp) ชิ้นส่วนที่ 2 (D4-gF2) ความยาว 2,635 bp ชิ้นส่วนที่ 3 (D4-gF3) ความยาว 2,703 bp ชิ้นส่วนที่ 4 (D4-gF4) ความยาว 2,385 bp และชิ้นส่วนที่ 5 (D4-gF5) ความยาว 662 bp ชิ้นส่วนแต่ละชิ้นส่วนถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ primer ที่ออกแบบขึ้นตามตารางที่ 2 และตรวจวัดความเข้มข้นของชิ้นส่วนที่ได้ หลังจากนั้นรวมชิ้นส่วนทั้ง 5 ชิ้นส่วน เข้ากับ expression vector ที่ประกอบด้วย cytomegalovirus (CMV) promotor ด้วย Gibson enzyme mix ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2 primer ที่ใช้ในการสร้างไวรัส

Fragment	Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
D4-gF1	gFP1	CTG GCT AGC AGT TGT TAG TCT GTG TG	2458
	R_NS1	CTC CAT GAC ACC ACA CAA CCC	
D4-gF2	F_NS1	GGG TTG TGT GGT GTC ATG GAG	2635
	R_NS3	CCT CAT CCA CTT CAT AGT CTG GC	
D4-gF3	F_NS3	GCC AGA CTA TGA AGT GGA TGA GG	2703
	gRP3	CTT GCT GGT ACC TCT GGA CAC TGC GTA C	
D4-gF4	gFP3	CC AGA GGT ACC AGC AAG ATT AGA TGG ATT G	2385
	gRP4	CAATCAA GGA TCC ACA CCA CAA ATC CTC TC	
D4-gF5	gFP4	CCA GAG GTA CCA GCA AGA TTA GAT GGA TTG	662
	R-HDR/SV40PA	CCA TTA TAA GCT GCA ATA AAC AAC GAG TCC CAT TCG	
		CCA TTA CCG AGG GGA CGG TCC CCT CGG AAT GTT	
		GCC CAG CCG GCG CCA GCG AGG AGG CTG GGA CCA	
		TGC CGG CCA GAA CCT G	
Dengue specific primer*	D1	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	511
	D2	TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC	

* primer ที่จำเพาะต่อไวรัส dengue (Lanciotti RS et al, 1992)

ตารางที่ 3 แสดงส่วนผสมของชิ้นส่วนไวรัสในการทำ Gibson assembly

FRAGMENT	SIZE (BASE PAIR)	AMOUNT
D4-gF1	2,458	0.048-0.134 pMol
D4-gF2	2,635	
D4-gF3	2,703	
D4-gF4	2,385	
D4-gF5	662	0.072-0.201 pMol
Vector	3,203	0.027-0.067 pMol
Total		0.288-0.804 pMol

ส่วนผสม (Gibson reaction mixture) ที่ได้ถูกนำไป transfect ใน co-cultured Vero/HEK293T cells ที่มีความหนาแน่นประมาณ 70% โดยใช้ lipofectamine 2000 เป็นเวลา 7-12 วัน หลังจากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์และเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ Vero จำนวน 3-4 รอบ และตรวจสอบการสร้างไวรัสด้วย FFA หรือ plaque assay

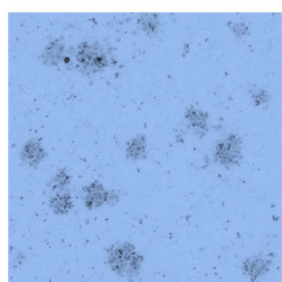
5. การทดสอบความสามารถในการลดล้างฤทธิ์ (focus reduction neutralization assay; FRNT)

นำไวรัสที่สร้างขึ้นมาทดสอบระดับความสามารถในการถูกลดล้างฤทธิ์ (neutralization activity) ต่อซีรัมของคนที่ภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเด็งกี ซึ่งซีรัมที่ใช้ในโครงการนี้ประกอบด้วย ซีรัมจากผู้ที่สุขภาพสมบูรณ์ดีที่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเด็งกี (dengue immune sera) และผู้ที่ได้รับวัคซีนเด็งกี (dengue vaccine sera) ชนิด monotypic คือมีภูมิคุ้มกันต่อ DENV4 เพียงชนิดเดียวเมื่อทดสอบความสามารถในการลดล้างฤทธิ์กับ DENV laboratory strains (DENV1 strain 16007, DENV2 strain 16681, DENV3 strain 16562 และ DENV4 strain 1036) โดยซีรัมที่นำมาใช้ถูก inactivate ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาทีและเจือจางใน MEM ลงทีละสองเท่า ก่อนนำไปผสมกับไวรัสในอัตราส่วนที่เท่ากันปริมาณไวรัส 50 pfu/well บ่มส่วนผสมของไวรัสและซีรัมที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาทีก่อนเติมลงในเซลล์ Vero monolayer ใน 24-well plate เป็นระยะเวลา 90 นาที และเติม overlay medium (MEM medium, 2% CMC, และ 5% FBS) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้น fix ไวรัสด้วย 80% acetone solution และทดสอบการติดเชื้อด้วยวิธี FFA ความสามารถในการลดล้างฤทธิ์ของไวรัสคำนวณจาก dilution ของซีรัมที่ทำให้ปริมาณไวรัสลดลง 50% หรือ focus reduction neutralization test 50 (FRNT50) ด้วยวิธี probit analysis โดยแสดงระดับความสามารถในการลดล้างฤทธิ์เป็นค่า geometric mean titer (GMT)

ผลการทดลอง

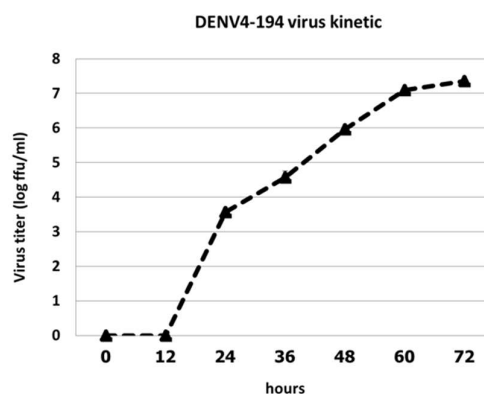
โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการสร้าง DENV4 ด้วยวิธี reverse genetics เพื่อใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางแอนติเจนภายในซีโรทัยป์ โดยไวรัส DENV4 สายพันธุ์ 194 (DENV4-194) ที่ใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคไข้เด็งกี่ในปี 2554 ในประเทศไทย โดยความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. นพ. สุธี ยกส้าน ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ไวรัสที่ได้ถูกเพิ่มจำนวนในเซลล์ C6/36 และเซลล์ไคลิง Vero ทำการเก็บไวรัสเมื่อพบพยาธิสภาพของเซลล์ภายหลังการติดเชื้อประมาณ 80-90% และตรวจวัดปริมาณไวรัสด้วยวิธี FFA ผลการทดลองพบว่า DENV4-194 สามารถเพิ่มจำนวนไวรัสได้ดี โดยมีค่าไวรัสไตเตอร์ประมาณ 2×10^7 ffu/ml ภายหลังจากการติดเชื้อ 3 วัน (รูปที่ 1)

A.



DENV4-194

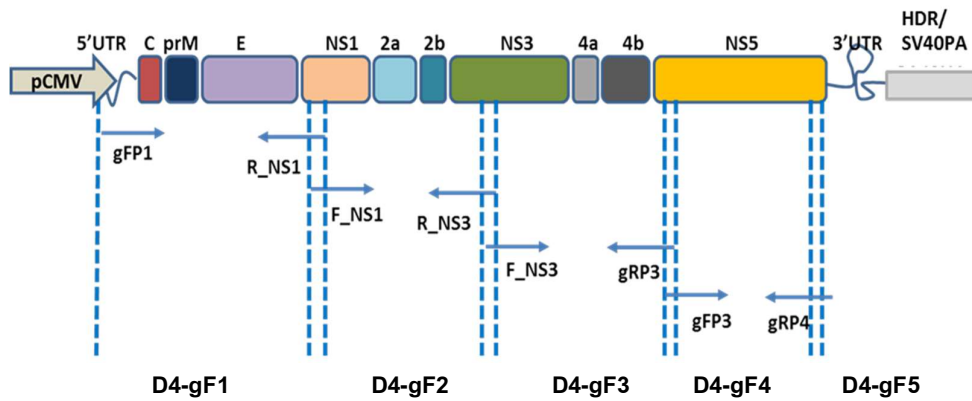
B.



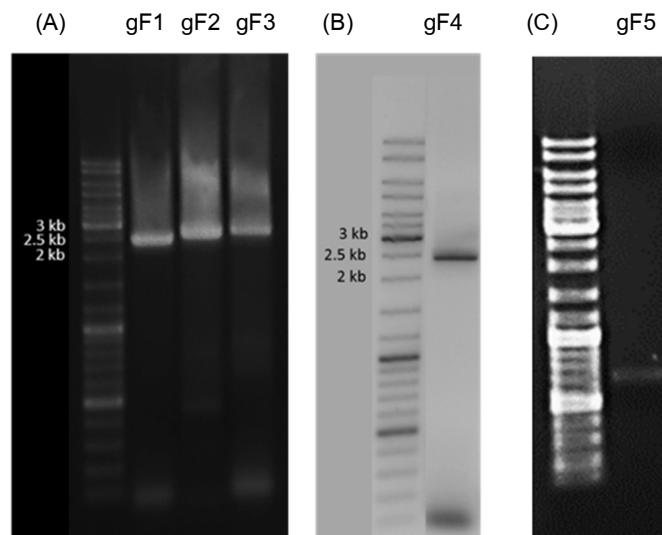
รูปที่ 1. คุณลักษณะของไวรัส DENV4-194 (A) ลักษณะของ focus formation เมื่อทำการย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ flavivirus 4G2 (HB-112) (B) ปริมาณของไวรัสภายหลังการติดเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ

ในการสร้าง DENV4 ด้วยวิธี reverse genetics นั้น ผู้วิจัยเริ่มต้นศึกษาลำดับเบสของไวรัส full-length DENV4-194 genome โดยทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะ (ตารางที่ 1) และศึกษาลำดับเบสโดยการ sequencing โดย DENV4-194 นั้นมีความยาวประมาณ 10.6 kDa หลังจากนั้นจึงนำผลของลำดับเบสมาใช้ในการออกแบบ primer และแบ่งไวรัส DENV4-194 ออกเป็น 5 ชิ้นส่วนครอบคลุมตลอดความยาวของไวรัส genome ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนมีส่วนที่ซ้อนทับกันประมาณ 18-20 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย ชิ้นส่วนที่ 1 (D4-gF1) ครอบคลุมส่วน 5' UTR จนถึง DENV4-NS1 มีความยาว 2,458 bp ชิ้นส่วนที่ 2 (D4-gF2) ครอบคลุมช่วง NS1-NS3 ความยาว 2,635 bp ชิ้นส่วนที่ 3 (D4-gF3) ครอบคลุม NS3-NS5 ความยาว 2,703 bp ชิ้นส่วนที่ 4 (D4-gF4) ครอบคลุม NS5 ความยาว 2,385 bp และชิ้นส่วนที่ 5 (D4-gF5) ประกอบไปด้วยส่วน 3'UTR-Hepatitis delta virus ribozyme (HDR) และ simian virus 40 polyadenylation signal (SV40pA) ความยาว 662 bp (รูปที่ 2)

ชิ้นส่วนแต่ละชิ้นส่วนถูกนำมาเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดย primer จำเพาะในตารางที่ 2 และตรวจสอบขนาดของแต่ละชิ้นส่วนด้วย agarose gel electrophoresis (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของแต่ละชิ้นส่วน (fragment) ของไวรัสที่ใช้ในการประกอบเพื่อสร้าง DENV4 ด้วยวิธี Gibson assembly

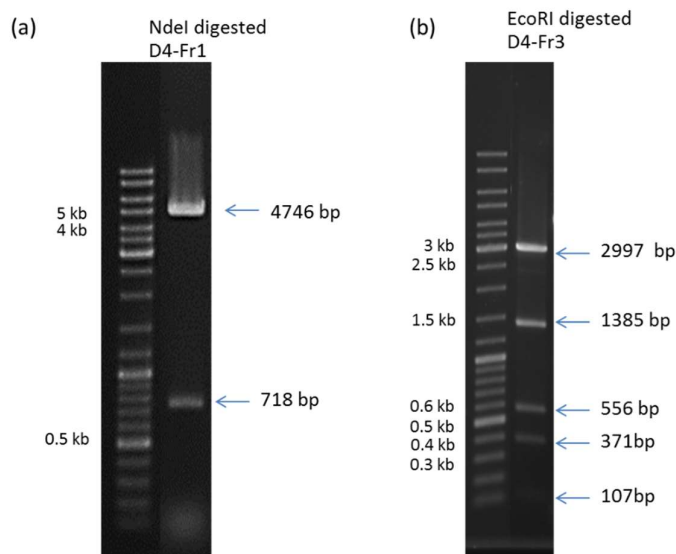


รูปที่ 3 PCR products แสดงแต่ละชิ้นส่วนจีโนมของไวรัสแดงที่ DENV-4 194 รูป (A) แสดงชิ้นส่วน D4-gF1, D4-gF2, D4-gF3 ที่ความยาว 2,458 bp, 2,635 bp และ 2,703 bp ตามลำดับ รูป (B) แสดง PCR product ของส่วน D4-gF4 ความยาว 2,385 bp รูป (C) แสดง PCR product ของส่วน D4-gF5 ความยาว 662 bp

การสร้าง molecular clone ของชิ้นส่วนไวรัส

เมื่อได้ชิ้นส่วน PCR แล้ว DENV4 แต่ละชิ้นส่วนจะถูกทำให้บริสุทธิ์ และนำไปใช้ในการสร้างไวรัส ด้วยวิธี Gibson assembly ในขณะเดียวกัน PCR fragment ต่างๆ จะถูก clone เข้า vector เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการสร้างไวรัส โดยนำ PCR product แต่ละชิ้นส่วนของไวรัส clone เข้า pGEM-T หรือ TOPO Zero Blunt vectors และ transform ลงใน *E.coli* (TOP10) หลังจากนั้นคัดเลือก clone ที่มีชิ้นส่วนแต่ละชิ้นส่วน โดยใช้ restriction enzyme ที่จำเพาะ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสของแต่ละชิ้นส่วนด้วยวิธี sequencing ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการสร้าง molecular clone ทั้ง 5 ชิ้นส่วนเพื่อใช้เป็น template ในการทำ PCR สำหรับสร้างไวรัสด้วย Gibson assembly (ตารางที่ 4) โดยได้แสดงตัวอย่างการ

คัดเลือก clone DENV4 Fragment 1 และ 3 และทดสอบความถูกต้องของ clone ที่ได้ ด้วย restriction enzyme NdeI และ EcoRI ตามลำดับ ซึ่งภายหลังการตัดด้วย enzyme ดังกล่าวแล้วผลที่ได้พบว่ามีขนาดของแถบ DNA ที่ถูกต้อง (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ตัวอย่าง molecular clone ของ D4-gF1 และ D4-gF3 ซึ่งทดสอบความถูกต้องของ clone ด้วย restriction enzyme analysis (a) ผลของ D4-gF1 clone เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ NdeI จะเกิด band จำเพาะที่ขนาด 4,746 และ 718 bp (b) ผลของ D4-gF3 clone เมื่อถูกตัดด้วย EcoRI เกิด band จำเพาะที่ขนาด 2,997, 1,385, 556, 371, และ 107 bp

ตารางที่ 4 molecular clone ของชิ้นส่วนไวรัสที่สร้างขึ้นในโครงการ

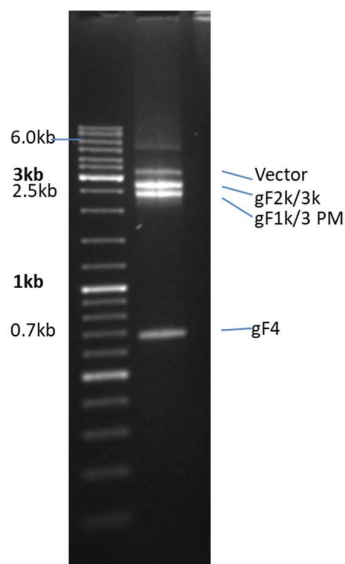
Molecular plasmid	Insert size (bp)	Region	Vector
pF1	2,458	5'UTR-NS1	pGEM-T
pF2	2,635	NS1-NS3	TOPO blunt
pF3	2,703	NS3-NS5	pGEM-T
pF4	2,385	NS5	pGEM-T
pF5	662	NS5-3'UTR	pCMV-HDR-SV40PA

การผลิตไวรัสจาก molecular clone

การทดสอบการเชื่อมต่อกันของชิ้นส่วนไวรัส

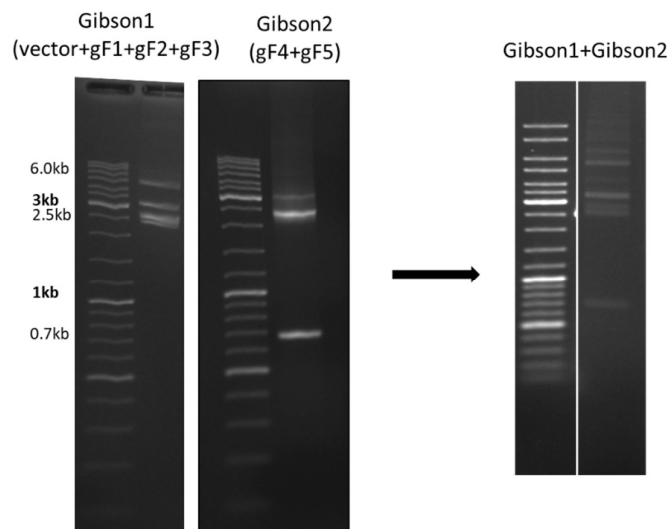
ชิ้นส่วน PCR ของจีโนมไวรัส DENV4-194 (D4-gF1-gF5) ถูกเพิ่มจำนวนจาก clone ที่สร้างขึ้นโดยใช้ primer จำเพาะ หลังจากนั้นทำ PCR purification และรวมชิ้นส่วนเข้ากับ vector ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ pcDNA3.1 HisC ที่ตัดด้วย restriction enzyme NheI และ PstI และนำไปเชื่อมต่อกันด้วยวิธี Gibson enzyme assembly

โดยได้เริ่มต้นทดลองนำชิ้นส่วนแต่ละชิ้นส่วน (gF1-gF5) และ vector ที่ตัดด้วย enzyme ดังกล่าว ผสมเข้าพร้อมกัน และนำไปตรวจสอบการเชื่อมต่อกันด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งหากชิ้นส่วนทั้ง 5 ชิ้นส่วนและ vector มีการเชื่อมต่อกันจะทำให้ได้แถบ DNA ที่ขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดประมาณ 13 kb อย่างไรก็ตามผลการทดสอบพบว่าเมื่อรวมแต่ละชิ้นส่วนเข้าพร้อมกันนั้น ไม่พบแถบ DNA ที่มีขนาดใหญ่ที่เป็นผลจากการเชื่อมต่อกัน แสดงว่าโอกาสที่จะเกิดไวรัสด้วยวิธีนี้เป็นไปได้น้อยและเมื่อลองนำชิ้นส่วนที่ผสมแล้วไปเพิ่มจำนวนในเซลล์ไม่พบว่ามีการสร้างไวรัสขึ้น



รูปที่ 5 แสดงการทดสอบการ assembly โดยการรวมกันของชิ้นส่วนไวรัสพร้อมกัน

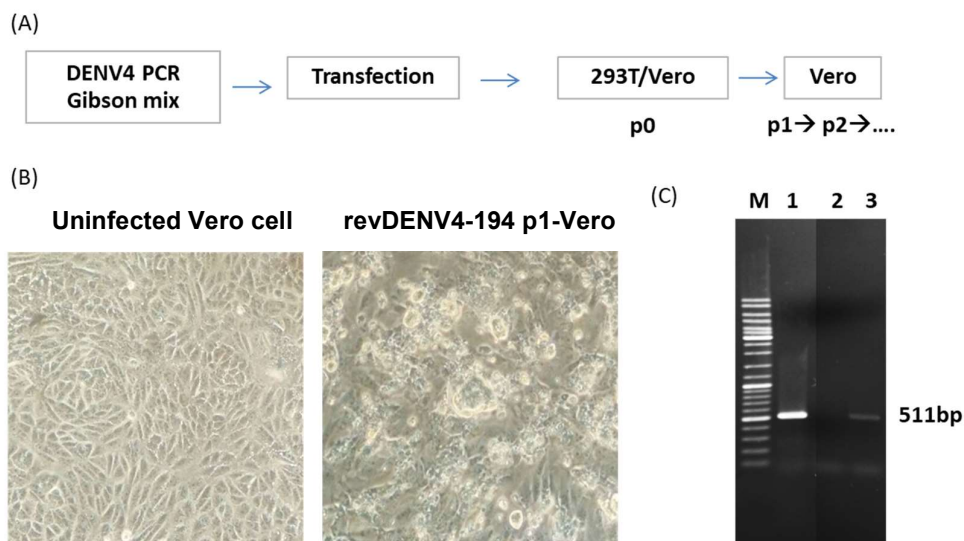
ด้วยเหตุนี้ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับเปลี่ยนวิธีการในการเชื่อมต่อกัน โดยทำการรวมชิ้นส่วนไวรัสย่อยๆ เข้าด้วยกันก่อนนำมารวมกันจนเกิดเป็นไวรัสเต็มสาย โดยได้แบ่งการรวมกันออกเป็นกลุ่มย่อย กลุ่มละ 2-4 fragments ได้แก่ Gibson 1 (Vector+ gF1+gF2+gF3) และ Gibson 2 (gF4+gF5) และนำมาผนวกเข้าด้วยกันด้วย Gibson enzyme อีกครั้ง (Gibson 1+2) ผลการทดลองพบว่าเมื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อกันด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วพบว่ามีความถี่ของชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่มากขึ้น (รูปที่ 6) อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะไม่พบว่ามีแถบ DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงกับไวรัสเต็มสายที่ชัดเจน แต่จากวิธีนี้แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนมีโอกาสในการเชื่อมต่อกันได้ดีกว่าการใส่ทุกชิ้นส่วนพร้อมกัน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยได้ใช้วิธีดังกล่าวในการเชื่อมต่อชิ้นส่วนไวรัสเพื่อสร้างไวรัสต่อไป



รูปที่ 6 ผลของ Gibson assembly โดยการทำ assembly ย่อย ในส่วน Gibson 1 (Vector+ Fr1+2+3) และ Gibson 2 (Fr4+5) (รูปซ้าย) ก่อนนำมา assembly อีกครั้ง (รูปขวา)

การสร้างไวรัสโดยวิธี transfection

นำชิ้นส่วนไวรัสที่ผสมด้วย Gibson assembly ตามวิธีข้างต้นมา transfect ในเซลล์ co-cultured HEK293T/Vero ก่อนนำไปเพิ่มจำนวนในเซลล์ Vero ประมาณ 3-4 รอบ ไวรัสที่ได้จะถูกนำไปทดสอบการสร้างไวรัสด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ specific primer ต่อไวรัส DENV และ FFA (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 การตรวจสอบการสร้างไวรัส revDENV-4 194 ภายหลังจาก transfection ด้วยวิธี Gibson assembly รูป (A) ขั้นตอนการสร้าง DENV4-194 ด้วยวิธี reverse genetics (B) พยาธิสภาพของเซลล์ (CPE) ภายหลังจากติดเชื้อใน revDENV4-194 passage 1 (p1) รูป (C) ตัวอย่างผลทดสอบการสร้างไวรัส

revDENV4-194 ด้วย PCR โดยใช้ DENV4 specific primers (lane1: DENV4-194 positive control, lane2: supernatant ของ revDENV4-194 p1 และ lane 3: cell pellet ของ D4-194 p1)

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการทำ assembly หลายครั้ง และได้ปรับเปลี่ยนสภาวะที่ใช้ในการสร้างไวรัส เช่น reagent ที่ใช้ในการ transfection ปริมาณของชิ้นส่วนไวรัสเริ่มต้น เป็นต้น ซึ่งผลการทดสอบพบว่าเมื่อทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนไวรัส โดยใช้ปริมาณของชิ้นส่วนไวรัสรวม 0.8 pmol และ transfect โดยใช้ lipofectamine 2000 ในเซลล์ co-cultured HEK293T/Vero เป็นระยะเวลา 15 วัน และเพิ่มจำนวนไวรัสบนเซลล์ Vero พบว่าสามารถผลิตไวรัสได้ โดยให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบการสร้างไวรัสด้วยวิธี FFA (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ผลการทดสอบการสร้างไวรัส revDENV4-194 ด้วย FFA

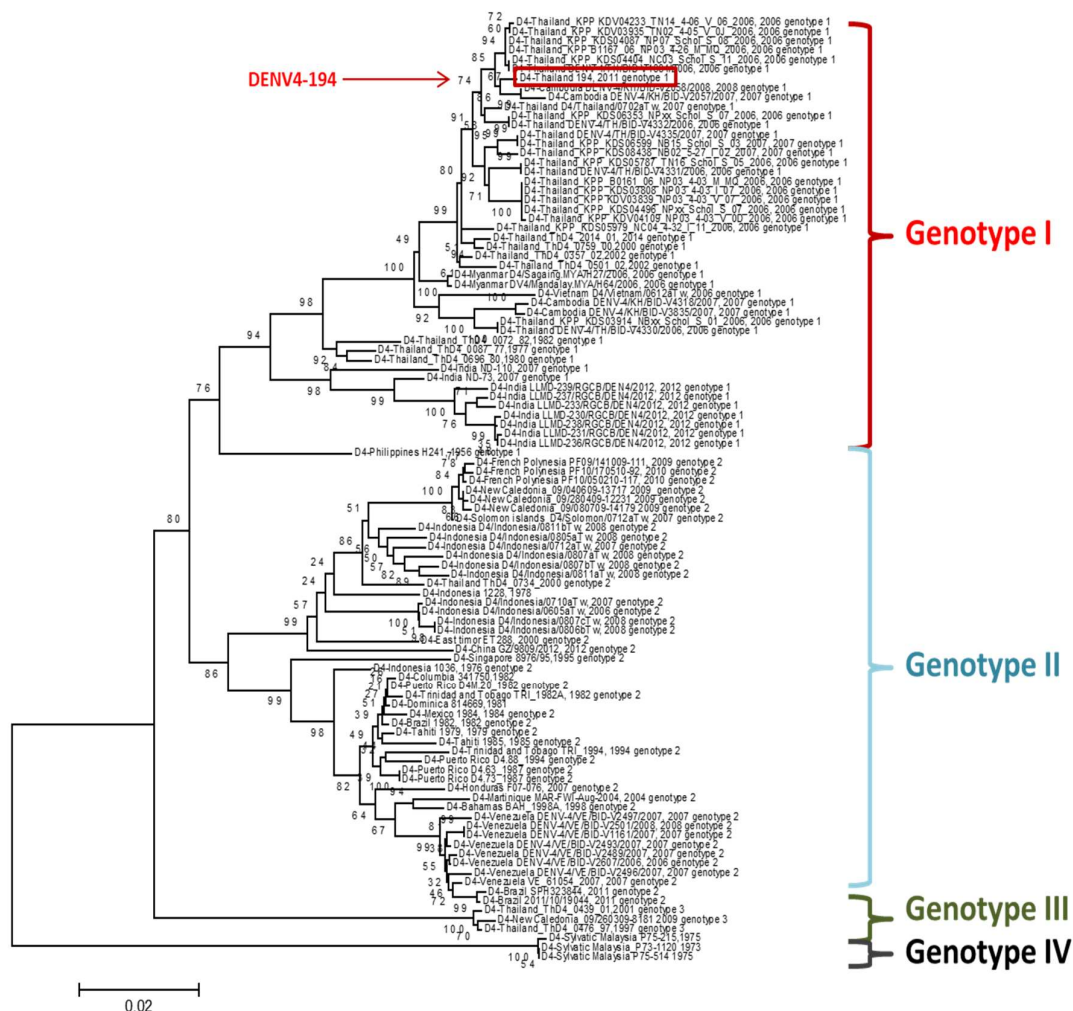
หลังจากนั้นนำไวรัสที่เพิ่มจำนวนได้ revDENV4-194 (passage 4) ที่เพิ่มจำนวนได้ ไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป 6 ตำแหน่ง ซึ่งเป็น synonymous mutation 3 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 1562, 1607, และ 9575 โดยตำแหน่งดังกล่าวอยู่บน DENV envelope และ nonsynonymous mutation 2 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 7129 และ 7895 ซึ่งอยู่บน NS4B และ NS5 นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงที่ 3'UTR ที่ตำแหน่ง 10639 และ 10640 ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป ของไวรัส revDENV4-194 ที่สร้างขึ้น

Nucleotide position	Gene	Mutation	Amino acid	Chromatogram
1562	Envelope	G→A	Synonymous (V)	
1607	Envelope	A→G	Synonymous (G)	
7129	NS4B	C→T	P→L	
7895	NS5	T→G	D→E	
9575	NS5	A→G	Synonymous (L)	
10639-10640	3UTR	AT→TC	-	

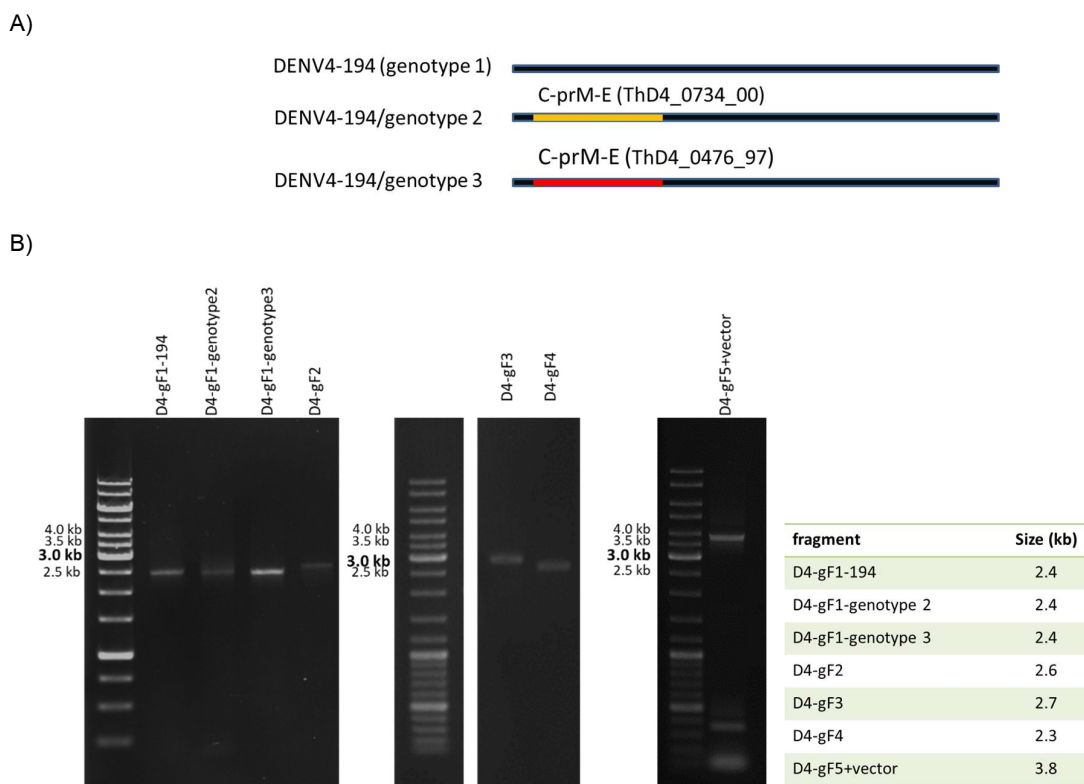
การสร้าง recombinant virus เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจนของ DENV4

โดยทั่วไปแล้ว DENV4 แบ่งออกได้เป็น 4 genotype หลักๆ ซึ่งเมื่อนำลำดับเบสของไวรัส DENV4 ไปวิเคราะห์ความหลากหลายทาง phylogenetic analysis โดยใช้ลำดับเบสของ envelope ผลการวิเคราะห์พบว่าไวรัส DENV4-194 นี้อยู่ใน genotype 1 ซึ่งเป็น genotype หลักที่พบระบาดในประเทศไทย (รูปที่ 9) อย่างไรก็ตามนอกเหนือจาก genotype 1 แล้ว ประเทศไทยยังมีการระบาดของ genotype 2 และ 3 อีกด้วย ด้วยเหตุนี้เพื่อให้ได้ DENV ที่มีความหลากหลายของไวรัสหรือแตกต่างทาง genotype นั้น นอกเหนือจากการแยกเชื้อจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี ซึ่งโอกาสในการได้ genotype ที่แตกต่างกันจะเกิดขึ้นได้ยาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิค reverse genetics มาใช้สร้าง recombinant DENV4 โดยไวรัสที่สร้างขึ้นนี้จะประกอบไปด้วยส่วนโปรตีนโครงสร้างของ DENV4 genotype อื่น ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกไวรัส DENV4 ThD4_0734_00 (genotype 2) ซึ่งเป็นไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยในปี 2000 และ ThD4_0476_97 (genotype 3) ซึ่งเป็นไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยในปี 1997 มาเป็นตัวแทนในการสร้างไวรัสในโครงการนี้



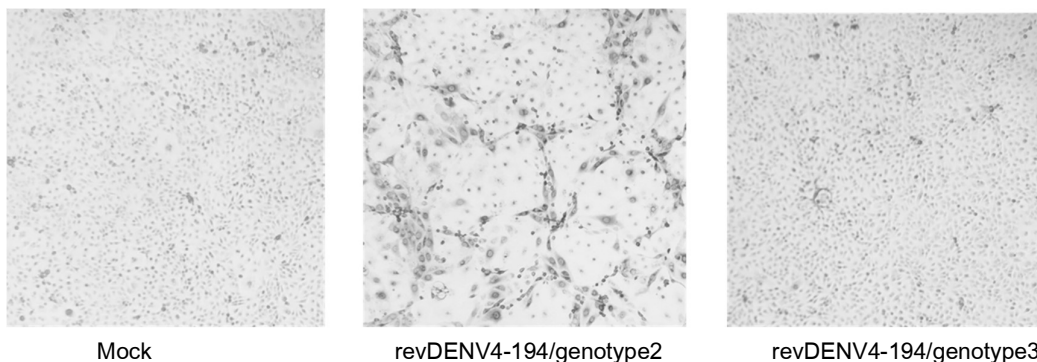
รูปที่ 9 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DENV4 Envelope จาก Genbank database และ DENV4-194 (กล่อง) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining และทดสอบความเชื่อมั่นด้วย bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ โดยโปรแกรม MEGA5.1 (Tamura K. et al., 2011) ข้อมูลของไวรัสแสดงโดย DENV4/ประเทศ/สายพันธุ์/ปีที่แยกได้

ในการทำ reverse genetics ของ DENV4 genotype 2 และ 3 นี้ ผู้วิจัยได้สังเคราะห์ plasmid ที่ประกอบด้วย gF1-genotype 2 และ gF1-genotype 3 ที่ประกอบด้วยส่วนโปรตีนโครงสร้าง (capsid-prM-envelope) ของ DENV4 ThD4_0734_00 (genotype 2) และ ThD4_0476_97 (genotype 3) ตามลำดับ หลังจากนั้นเพิ่มจำนวนโดยใช้ primer (gFP1 และ R_NS1) ที่จำเพาะต่อ D4-gF1 ผลของ PCR ของชิ้นส่วนไวรัสแต่ละชิ้นส่วนแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 การสร้าง recombinant DENV4 ในโครงการ A) รูปแบบของ recombinant DENV4 ของ genotype 1, 2 และ 3 B) ผล PCR ของแต่ละชิ้นส่วนของไวรัสและขนาดของแต่ละชิ้นส่วน

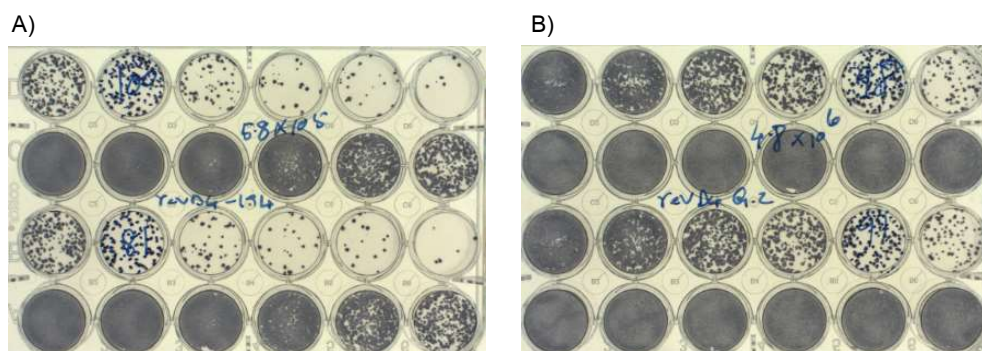
หลังจากนั้นทำการเชื่อมต่อของไวรัสชิ้นส่วนต่างๆ (D4-gF1-gF5) เข้าด้วยกันด้วยวิธี Gibson assembly ตามที่ได้กล่าวข้างต้น และ transfect ลงในเซลล์ cocultured HEK293T/vero และเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ vero ประมาณ 3-4 รอบ ซึ่งในการศึกษานี้ ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างไวรัส revDENV4-194/genotype 2 ด้วยวิธี reverse genetics โดยให้ผลบวกเมื่อทดสอบการสร้างไวรัสด้วยวิธี FFA อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่สามารถสร้าง revDENV4-194/genotype 3 ได้ แม้ว่าจะมีการปรับสภาวะในการสร้างไวรัสหลายวิธีแล้วก็ตาม (รูปที่ 11) หลังจากนั้นนำไวรัส revDENV4-194/genotype 2 (passage 4) ที่เพิ่มจำนวนได้ไปตรวจสอบลำดับเบสในช่องโปรตีนโครงสร้าง และเมื่อนำไปวิเคราะห์ผลของลำดับเบสที่ได้ด้วยวิธี BLAST พบว่าให้ผลที่ถูกต้องโดยมีลำดับเบสตรงกับ DENV4 สายพันธุ์ ThD4_0734_00 (genotype 2)



รูปที่ 11 ผลการตรวจสอบการสร้างไวรัส DENV4-194/genotype 2 และ 3 ด้วยวิธี FFA

ความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์ของซีรัมคนที่ภูมิคุ้มกันต่อไวรัสไข้เลือดออกต่อ DENV4

ไวรัสที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้ ถูกเพิ่มจำนวนในเซลล์ Vero และทดสอบปริมาณของไวรัสด้วยวิธี FFA ผลการทดสอบพบว่าไวรัสที่ได้สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีโดยมีปริมาณไวรัสไตเตอร์ของ revDENV4-194 และ revDENV4-194/genotype2 เท่ากับ 5.8×10^5 ffu/ml และ 4.8×10^6 ffu/ml ตามลำดับ (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 การตรวจสอบปริมาณไวรัสที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิค reverse genetics A) revDENV4-194 และ B) revDENV4-194/genotype 2

ในการทดสอบระดับความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์ของไวรัสที่สร้างขึ้นนั้น ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์ของซีรัมคนที่ภูมิคุ้มกันต่อ DENV4 จำนวน 7 ตัวอย่างโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มของคนที่ได้รับวัคซีน DENV4 (dengue vaccine sera) และกลุ่มคนที่ภูมิคุ้มกันต่อ DENV4 (dengue immune sera) ต่อ DENV4 จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ DENV4-1036/1976 laboratory strain (genotype 2) DENV4-194/2011 (genotype 1), และไวรัสที่สร้างขึ้นในโครงการด้วยเทคนิค reverse genetics ได้แก่ revDENV4-194 และ revDENV4-194/genotype2 ผลการทดลองพบว่าซีรัมจากกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมีความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์ DENV4 แต่ละสายพันธุ์ได้ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อดูค่าเฉลี่ยรวมของระดับ neutralizing antibody titer (NT) พบว่าซีรัมสามารถกลบล้างฤทธิ์ต่อ DENV4-1036 ได้ดีกว่า DENV4-194/2011 เล็กน้อยโดยมีค่าเฉลี่ยรวมสูงกว่า 1.5 เท่า

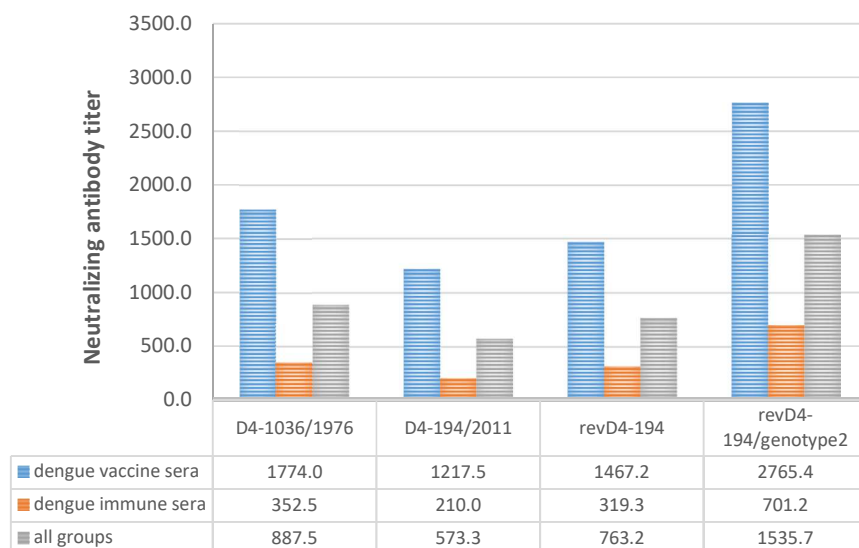
เมื่อพิจารณาไวรัสที่สร้างขึ้นในโครงการ revD4-194 เทียบกับไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย DENV4-194 พบว่าให้ผล NT ใกล้เคียงกับไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย DENV4-194/2011 โดยมีค่าเฉลี่ย Geometric mean

titer (GMT) 573.3 และ 763.2 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าไวรัสที่สร้างได้มีความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์ไม่แตกต่างจากเดิม

อย่างไรก็ตามเมื่อสร้าง recombinant DENV4 ที่เปลี่ยนแปลงตำแหน่งของโปรตีนโครงสร้างใน genotype 2 (revDENV4-194/genotype2) ผลการทดลองพบวาระดับของ GMT ของ revDENV4-194/genotype2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1535.7 ซึ่งเพิ่มขึ้นจาก revDENV4-194 และ DENV4-194 ประมาณ 2-2.5 เท่า ซึ่งการเพิ่มสูงขึ้นของ neutralizing antibody titer พบทั้งในกลุ่ม dengue vaccine และ dengue immune sera แสดงให้เห็นว่าลักษณะของแอนติเจนที่เปลี่ยนแปลงในส่วนของโปรตีนโครงสร้างไวรัส โดยเฉพาะเมื่อมีการเปลี่ยน genotype ภายในไวรัส DENV4 นั้นมีผลกระทบต่อระดับความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์โดยซีรัมของคนที่ภูมิคุ้มกันต่อ DENV4 (ตารางที่ 6 และรูปที่ 13)

ตารางที่ 6 แสดงผลระดับความสามารถในการกลบล้างฤทธิ์ของไวรัส

Virus	Genotype	dengue vaccine sera					dengue immune sera				Mean of all groups
		07/330	07/331	08/94	08/106	Mean	06/105	06/302	07/333	Mean	
D4-1036/1976	2	2316	1861	5270	436	1774.0	175	615	407	352.5	887.5
D4-194/2011	1	692	1697	5922	316	1217.5	87	253	421	210.0	573.3
revDENV4-194	1	816	1460	7137	545	1467.2	198	315	522	319.3	763.2
revDENV4-194/genotype2	2	2535	2456	10233	918	2765.4	391	618	1427	701.2	1535.7



รูปที่ 13 กราฟค่าเฉลี่ยของ neutralizing antibody titer ในกลุ่มซีรัมของคนที่ได้รับวัคซีนเด็งกี กลุ่มคนที่ภูมิคุ้มกันของ DENV4 และค่าเฉลี่ยรวมทั้งสองกลุ่ม

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

DENV เป็นไวรัสที่มีความหลากหลายโดยเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสและกรดอะมิโนของจีโนมพบว่าสามารถแบ่งแยกย่อยออกได้หลาย genotype ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส DENV3 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ของ DENV3 ได้แตกต่างกัน (Wahala WMPB, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยการสร้าง recombinant DENV3 infectious clone ที่มีความแตกต่างของส่วนโปรตีน envelope ใน genotype ต่างๆ พบว่าไวรัสที่สร้างขึ้นนั้นให้ผลของระดับความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ที่แตกต่างกันมาก (Messer WB, 2012) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างทางแอนติเจนภายใน serotype ของไวรัสนั้นมีผลต่อระดับความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ของซีรัม อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจนที่แน่ชัดใน DENV4 ด้วยเหตุนี้ โครงการนี้มีวัตถุประสงค์ในการสร้างไวรัส DENV4 เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจนของ DENV4 ด้วยวิธี reverse genetics ซึ่งวิธีนี้ถูกใช้ในการสร้างไวรัสหลายชนิด โดยมีรายงานการสร้าง full-length cDNA infectious clone ของ DENV4 ตั้งแต่ปี ค.ศ.1991 (Lai CJ, 1991) อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้วการสร้าง infectious full-length cDNA clone ของ DENV นั้นมักพบปัญหาความเป็นพิษและความไม่เสถียรของไวรัสจีโนมในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Ruggli, N, 1999) ซึ่งในเวลาต่อมาได้พัฒนาวิธีในการสร้าง full-length cDNA clone เพื่อแก้ปัญหาความเป็นพิษและความไม่เสถียรทางพันธุกรรม เช่น ระบบ two-fragment plasmids โดยแยกส่วนของไวรัสจีโนมที่มีความเป็นพิษออกจากกัน ใน DENV2 (Kapoor M, 1995, Santos JJ da S, 2015) DENV3 (Santos JJ da S, 2014), JEV (Sumiyoshi H, 1992), Zika virus (Weger-Lucarelli J, 2017), West Nile virus (Vandergaast R, 2014) หรือการใช้ medium หรือ low-copy-number plasmids ในการสร้าง full-length cDNAs clones ใน *E.coli* (Kinney RM, 1997) อย่างไรก็ตามเพื่อป้องกันปัญหาในเรื่องความไม่เสถียรทางพันธุกรรมและความเป็นพิษที่อาจพบได้ในการสร้างไวรัสใน *E.coli* ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้สร้างไวรัสโดยไม่สร้าง full-length clone ในเซลล์แบคทีเรีย แต่สร้างไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยตรงภายใต้ CMV promotor ซึ่งเทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างไวรัสหลายชนิด เช่น DENV (Siridechadilok B, 2013), Zika virus (Konstantin A., 2016), Enterovirus 71 (Tan CW, 2016), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Suhardiman M, 2014)

ซึ่งในการสร้างไวรัสด้วยวิธีดังกล่าวชิ้นส่วน DNA ของไวรัส 5 ชิ้นส่วนที่ครอบคลุมไวรัสตลอดสายที่มีส่วนที่ซ้อนเหลื่อมกัน ถูกรวมเข้ากับ expression vector ด้วย Gibson assembly enzyme และเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ ผลการทดลองพบว่าผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างไวรัส DENV4 ซึ่งไวรัสที่สร้างขึ้นสามารถเพิ่มจำนวนได้ดีและมีค่าไวรัสไตเตอร์ประมาณ 10^5 และ 10^6 ffu/ml โดยขั้นตอนที่สำคัญในการสร้างไวรัสด้วยวิธีข้างต้นคือสภาวะในการเชื่อมต่อกัน ในโครงการนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการ assembly เข้าด้วยกัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อรวมชิ้นส่วนไวรัสเป็น 2 กลุ่มย่อยก่อนนำมารวมเข้าด้วยกันจนได้ไวรัสสายเต็ม ชิ้นส่วนไวรัสเชื่อมมีโอกาสเชื่อมต่อกันได้ดีขึ้น โดยพบแนวโน้มการเกิดแถบ DNA ขนาดใหญ่สูงขึ้นกว่าการรวมชิ้นส่วนทั้งหมดพร้อมกัน

สายพันธุ์ที่นำมาใช้เป็นต้นแบบในการสร้างไวรัสคือ DENV4-194 จัดเป็นสายพันธุ์อยู่ใน genotype 1 ซึ่งเป็น genotype หลักที่พบการระบาดในประเทศไทย สำหรับ genotype 2 นั้นส่วนใหญ่พบว่ามีการระบาดในประเทศในกลุ่มประเทศเอเชีย เช่น ประเทศอินโดนีเซีย สิงคโปร์ จีน ญี่ปุ่น และหลายประเทศในอเมริกาใต้ เช่น ประเทศเวเนซุเอลา บราซิล เป็นต้น ซึ่งในประเทศไทยนั้นพบได้น้อยมาก โดยมีรายงาน genotype 2 ในช่วงปี ค.ศ. 1994-2006 และ genotype 3 ที่พบในประเทศไทยในช่วงปี ค.ศ. 1997-2001 (Klungthong C, 2004) ดังนั้นการแยกเชื้อไวรัสจากผู้ติดเชื้อ DENV4 เพื่อใช้ในการศึกษานั้นเป็นไปได้ยาก ด้วยเหตุนี้การสร้างไวรัส

ด้วยวิธี reverse genetics จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาความหลากหลายภายในซีโรทัยป์ของ DENV4

เมื่อนำไวรัสที่สร้างขึ้นมาทดสอบความหลากหลายทางแอนติเจนโดยวิธี neutralization test ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไวรัสที่สร้างขึ้นด้วยวิธี reverse genetics (revDENV4-194) เทียบกับไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย DENV4-194 ให้ผล neutralization antibody titer ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าไวรัสที่สร้างขึ้นไม่มีความแตกต่างทางด้านความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อแทนที่ส่วนโปรตีนโครงสร้างด้วย DENV4 genotype 2 ใน DENV1-194 พบว่าระดับของ neutralization antibody titer เพิ่มขึ้นถึง 2-2.5 เท่า แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของโปรตีนที่เป็นส่วนโครงสร้างของไวรัสมีผลต่อระดับความสามารถในการหลบเลี่ยงฤทธิ์โดยซีรัม

โดยทั่วไปแล้ว envelope เป็นโปรตีนที่อยู่ด้านนอกสุดของไวรัสและมีความสัมพันธ์กับการเกิดปฏิกิริยาการหลบเลี่ยงฤทธิ์ (Gregory D. 2008, Chih-Yun Lai, 2008) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนในส่วนโปรตีน envelope เปรียบเทียบระหว่าง DENV4-194 (genotype1) และ DENV4-194/genotype 2 พบว่ามีความแตกต่างประมาณ 3.23% อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดว่าตำแหน่งใดที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ neutralizing antibody titer หรือความแตกต่างของระดับภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นนั้นมีผลต่อการติดเชื้อในภายหลังหรือไม่ จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

จากผลการทดลองข้างต้นผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างไวรัส DENV4 ด้วยวิธี reverse genetics ซึ่งไวรัสที่สร้างขึ้นด้วยวิธีนี้เป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจนของ DENV เนื่องจาก DENV จัดอยู่ในกลุ่มไวรัส RNA ซึ่งเชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ง่ายกว่าไวรัสในกลุ่มอื่น การนำเทคนิคนี้มาใช้ในการสร้างไวรัสจึงเป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของไวรัสในอนาคต และเป็นประโยชน์ในงานวิจัยด้านวัคซีนเพื่อศึกษาความครอบคลุมทางภูมิคุ้มกันของวัคซีนตัวเลือกในการพัฒนาวัคซีน Dengue ในอนาคต

ข้อเสนอแนะสำหรับวิจัยในอนาคต

แม้ว่าโครงการนี้ได้ทดสอบความสามารถในการกลบฝังฤทธิ์ของซีรัมคนที่ภูมิคุ้มกัน DENV4 ต่อไวรัส DENV4 ที่สร้างขึ้นจำนวนหนึ่ง แต่อาจจะไม่เพียงพอในการศึกษาความหลากหลายทางแอนติเจน ซึ่งจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนไวรัสที่มีความหลากหลายทางจีโนมัยปีในการศึกษาถึงผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงกับความสามารถในการกลบฝังฤทธิ์โดยซีรัมในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Chih-Yun Lai, Wen-Yang Tsai, Su-Ru Lin, Chuan-Liang Kao, Hsien-Ping Hu, Chwan-Chuen King, Han-Chung Wu, Gwong-Jen Chang, Wei-Kung Wang. Antibodies to Envelope Glycoprotein of Dengue Virus during the Natural Course of Infection Are Predominantly Cross-Reactive and Recognize Epitopes Containing Highly Conserved Residues at the Fusion Loop of Domain II. *Journal of Virology* Jun 2008, 82 (13) 6631-6643;

Gregory D. Gromowski, Nicholas D. Barrett, Alan D. T. Barrett. Characterization of Dengue Virus Complex-Specific Neutralizing Epitopes on Envelope Protein Domain III of Dengue 2 Virus. *Journal of Virology* Aug 2008, 82 (17) 8828-8837

Kapoor M, Zhang L, Mohan PM, Padmanabhan R. Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene*. 1995 Sep 11;162(2):175-80.

Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, Gubler DJ. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology*. 1997 Apr 14;230(2):300-8.

Klungthong C, Zhang C, Mammen MP Jr, Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*. 2004 Nov 10;329(1):168-79.

Konstantin A. Tsetsarkin, Heather Kenney, Rubing Chen, Guangping Liu, Hasmik Manukyan, Stephen S. Whitehead, Majid Laassri, Konstantin Chumakov, Alexander G. Pletnev, A Full-Length Infectious cDNA Clone of Zika Virus from the 2015 Epidemic in Brazil as a Genetic Platform for Studies of Virus-Host Interactions and Vaccine Development. *mBio* Aug 2016, 7 (4) e01114-16

Lai CJ, Zhao BT, Hori H, Bray M (1991) Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5139–5143.

Messer WB, Yount B, Hacker KE, Donaldson EF, Huynh JP, et al. (2012) Development and Characterization of a Reverse Genetic System for Studying Dengue Virus Serotype 3 Strain Variation and Neutralization. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6(2): e1486

Ruggli, N.; Rice, C.M. Functional cDNA Clones of the Flaviviridae: Strategies and Applications. In *Advances in Virus Research*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1999; Volume 53, pp. 183–207.

Santos JJ da S, Cordeiro MT, Bertani GR, Marques ETA, Gil LHV. A two-plasmid strategy for engineering a dengue virus type 3 infectious clone from primary Brazilian isolate. *An. Acad. Bras. Ciênc. [Internet]*. 2014 Dec ; 86(4): 1749-1759.

Santos JJ da S, Magalhães T, Silva JVJ, da Silva ANMR, Cordeiro MT, Gil LHV. Full-length infectious clone of a low passage dengue virus serotype 2 from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(5):677-683. doi:10.1590/0074-02760150053.

Siridechadilok B, Gomutsukhavadee M, Sawaengpol T, et al. A Simplified Positive-Sense-RNA Virus Construction Approach That Enhances Analysis Throughput. *Journal of Virology*. 2013;87(23):12667-12674. doi:10.1128/JVI.02261-13.

Stobart CC, Moore ML. RNA virus reverse genetics and vaccine design. *Viruses*. 2014 Jun 25;6(7):2531-50

Suhardiman M, Kramyu J, Narkpuk J, Jongkaewwattana A, Wanasen N. Generation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by in vitro assembly of viral genomic cDNA fragments. *Virus Res*. 2015 Jan 2;195:1-8.

Sumiyoshi H, Hoke CH, Trent DW. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J Virol*. 1992 Sep;66(9):5425-31.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011;28(10):2731-2739.

Tan CW, Tee HK, Lee MHP, Sam IC, Chan YF (2016) Enterovirus A71 DNA-Launched Infectious Clone as a Robust Reverse Genetic Tool. *PLOS ONE* 11(9): e0162771.

Vandergaast R, Hoover LI, Zheng K, Fredericksen BL. Generation of West Nile virus infectious clones containing amino acid insertions between capsid and capsid anchor. *Viruses*. 2014 Apr 9;6(4):1637-53.

Wahala WMPB, Donaldson EF, de Alwis R, Accavitti-Loper MA, Baric RS, de Silva AM. Natural Strain Variation and Antibody Neutralization of Dengue Serotype 3 Viruses. Früh K, ed. *PLoS Pathogens*. 2010;6(3):e1000821.

Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 2009 Jul;9(4):523-40.

Weger-Lucarelli J, Duggal NK, Bullard-Feibelman K, Veselinovic M, Romo H et al. Development and characterization of recombinant virus generated from a New World Zika virus infectious clone. *J Virol* 2017;91:e01765-16

Zhao R, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Zhang C, Putnak R. Evidence for inter- and intra-genotypic variations in dengue serotype 4 viruses representing predominant and non-predominant genotypes co-circulating in Thailand from 1977 to 2001. *Virus Genes*. 2010 Aug;41(1):5-13

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
 - ยังอยู่ระหว่างการจัดทำผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการนานาชาติ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)