



246167



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาหาถิ่นและตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไข้หวัดนกที่มีผลต่อการ
เพิ่มจำนวนของไวรัสที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส

โดย ดร. อรปรียา ทรัพย์ทวีวัฒน์และคณะ

30 กันยายน 2553

b00251693

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาหายีนและตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไข้หวัดนกที่มีผลต่อการ
เพิ่มจำนวนของไวรัสที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส

โดย ดร. อรปรียา ทรัพย์ทวีวัฒน์และคณะ



30 กันยายน 2553

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาหายีนและตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไข้หวัดนกที่มีผลต่อการ
เพิ่มจำนวนของไวรัสที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ดร. อรปรียา ทรัพย์ทวีวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

ศ.นพ. ประเสริฐ เอื้อวรากุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
(นักวิจัยที่ปรึกษา)

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้ความสนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัยครั้งนี้
ขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลซึ่งให้ความอนุเคราะห์
สถานที่ในการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไขหวัดนกสำหรับ
การศึกษาวิจัย ขอขอบคุณนางสาวณัฐมน ศิบุญนันท์ นักศึกษาปริญญาโทผู้มีส่วนช่วยในการทำวิจัยครั้งนี้ และ
ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ เอื้อวรากุล ที่ให้คำปรึกษาที่ตลอดการวิจัย

ในการศึกษาที่ผู้วิจัยได้ทำการสร้างไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ที่มีคุณสมบัติเป็น temperature sensitive mutant (ts) โดยวิธี classical adaptation ในเซลล์เพาะเลี้ยง จากการทดลองพบว่าไวรัส H5N1 แสดง phenotype เป็น ts เมื่อเพาะเลี้ยงไวรัสไว้ที่อุณหภูมิต่ำเป็นจำนวน 20 passages เมื่อนำเทคนิค reverse genetic มาสร้างไวรัส reassortant ระหว่างยีนจากไวรัส H5N1 ts แต่ละยีน (PB2, PB1, PA และ NP) ร่วมกับอีก 7 ยีนของไวรัส PR8 (H1N1) (7+1) แล้วนำไวรัสดังกล่าวไปศึกษา ts phenotype พบว่ายีนที่มีคุณสมบัติทำให้ไวรัส H5N1 เป็น ts phenotype คือ ยีน nucleoprotein (NP) นั้นเอง นอกจากนี้ยังพบว่า ในยีน NP ของไวรัส H5N1 ts นี้มี mutation ที่ตำแหน่ง 314 ซึ่งเปลี่ยนจาก serine (S) เป็น asparagine (N) เมื่อเทียบกับไวรัส H5N1 ดั้งเดิม ไวรัส H5N1 ts นี้มีลักษณะเป็น temperature sensitive ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสใน mammalian cell เท่านั้น ไม่พบว่าไวรัสแสดง phenotype ดังกล่าวใน avian cell นอกจากนี้ยังพบว่า mutant NP protein ของไวรัส H5N1 ts นั้นมีความบกพร่องในการขนส่งเข้าสู่ nucleus ของเซลล์ติดเชื้อ ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดแสดงว่า NP S314N ของไวรัส H5N1 ts mutant น่าจะเป็นยีนที่ส่งผลต่อไวรัสทำให้มีลักษณะเป็น temperature sensitive ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการที่ไวรัสดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ณ อุณหภูมินี้ นั้นอาจเป็นผลมาจากความบกพร่องของโปรตีน NP ที่ไม่สามารถจับกับโปรตีนของเซลล์ที่ใช้ในการขนส่งโปรตีน NP ของไวรัสเข้าสู่ nucleus นั้นเอง

A temperature-sensitive (ts) H5N1 avian influenza virus with a ts mutation in NP gene

We have generated a ts mutant from a human isolate of H5N1 avian influenza virus by classical adaptation in cell culture. After 20 passages in low temperature, the virus showed ts phenotype. Using reverse genetics, we generated reassortants 7+1 carrying individual genomic segment (PB2, PB1, PA and NP) of the mutant with PR8 (H1N1) genes, and found that the nucleoprotein (NP) gene could confer the ts phenotype. This mutant NP contains single mutation at position 314 (S314N). The ts mutant virus showed temperature sensitive phenotype at 40°C only in mammalian cells but not in avian cell. Furthermore, the mutant NP protein showed a defect in nuclear localization at high temperature (40°C) in mammalian cells. These results suggested that NP S314N in ts mutant virus was responsible for temperature sensitive phenotype, and the lack of ability to replicate at high temperature might involved a defect in interaction with cellular factor for its importation into the nucleus of infected cells.

Keywords: avian influenza virus, H5N1, temperature sensitive (ts), nucleoprotein