บทคัดย่อ

รหัสโครงการ PDF/54/2543 T 134358

ชื่อโครงการ การศึกษาจุดผ่าเหล่าในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบ ที่มีผลต่อการจับตัวของไวรัสกับเซลล์ โดยใช้ไวรัสลูกผสมเด็งกี่และไข้สมองอักเสบ

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

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

วัตถุประสงค์: เพื่อสร้างไวรัสลูกผสมระหว่างไวรัสเด็งกี่และไวรัสไข้สมองอักเสบ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาจุดผ่าเหล่าในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบ ที่มีผลต่อการจับตัวของไวรัสกับเซลล์

การดำเนินงานวิจัยโดยทำการสร้าง DNA ที่มียีนส์โครงสร้าง prM-E ของไวรัสไข้สมองอักเสบ สายพันธุ์ Beijing-1จาก RNA ด้วยวิธี reverse transcription and polymerase chain reaction ได้ชิ้น DNA 2 ขนาดคือ 1952 และ 2021เบส ซึ่งชิ้น DNAขนาด 2021 เบสจะมี signal sequence ที่อยู่หน้า prM ยีนส์เป็นของไวรัสไข้สมองอักเสบ จากนั้นทำการclone ชิ้น DNAทั้งสองที่ได้เข้าสู่ intermediate dengue vector เพื่อทำการอ่านลำดับเบส ซึ่งก็พบว่ามีจุดผ่าเหล่า2 จุดในโปรตีนอีที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่1346 และ1371 การสร้างDNA ลูกผสมโดยการ ligation ระหว่าง intermediate clone ที่ได้กับชิ้น DNA (NS1 to 3' end non-coding region) จาก pD2-IC-P48 (ไวรัสชนิดรุนแรง)นั้นไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากพบว่าDNA ลูกผสมมีส่วนของยีนส์ NS1ขาดหายไป แต่เมื่อใช้ pD2-IC-VE50 (ไวรัสชนิดไม่รุนแรง) มาสร้างDNA ลูกผสมแทนก็สามารถสร้าง DNA ลูกผสมได้สำเร็จคือ pD2V/JE15ที่มีชิ้น DNAขนาด2021เบส และ pD2V/JE16 มีชิ้นDNAขนาด 1952เบส ประกอบอยู่ จากนั้นนำRNAที่สร้างได้จากการถ่ายแบบในหลอดทดลองนำไป 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-VE50ไวรัส ซึ่งมีลักษณะขอบชัดเจน เมื่อทำการเลี้ยงในเซลล์ VERO หรือ LLC-mk2 ไวรัสลูกผสม D2VE/JE15นี้ เจริญเติบโตได้ดีทั้งในเซลล์ VERO และ LLC-mk2 โดยมีระดับไวรัสประมาณ 10^5 pfu/ml

จากการทดลองนี้พบว่าจุดผ่าเหล่า2 จุดในโปรตีนอีเป็นการผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นในโปรตีนอีของไวรัสไข้สมองอักเสบที่นำมาใช้ในการทดลอง ไม่ได้เกิดจากการความไม่ที่ยงตรงของเอ็มไซม์ที่ใช้ในการสร้าง DNA และเราสามารถสร้างไวรัสลูกผสมระหว่างไวรัสเด็งกี่และไวรัสไข้สมองอักเสบ ที่มี signal sequence เป็นของไวรัสไข้สมองอักเสบได้สำเร็จ และการที่ไวรัสลูกผสมเติบโตได้ดีในเซลล์นั้น แสดงว่าเราสามารถนำวิธีการสร้างไวรัสแบบนี้ ไปใช้ในการศึกษาขั้นการเปลี่ยนแปลงจุดผ่าเหล่าต่อไปได้ อย่างไรก็ดีจะต้องทำการศึกษาเกี่ยวกับการจับตัวของไวรัสลูกผสมนี้กับเซลล์ก่อน เพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบ

Abstract

Project code: PDF/54/2543 TE 134358

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 form 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 sucessful, and all of the clones showed deletion in NS-1 gene. However, several recombinant clones can be sucesfully 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 indirected Immunofluoresence 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 about10^5 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.