บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออกและโรคอื่นที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและประเทศอื่นๆในเขตร้อน เนื่องจากขณะนี้เรายังไม่มียารักษาโรคและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ การศึกษาวิจัยเพื่อหาความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับขบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อ, การก่อโรค และการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคจึงยังคงต้องกระทำไปอย่างต่อเนื่อง ในระยะ 8 ปีที่ผ่านมานี้ การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ก้าวหน้าไปมาก เพราะได้มีการพัฒนา full-length cDNA clone ที่สามารถใช้เป็นแม่แบบของการสร้าง infectious RNA transcript ขึ้นในหลอดทดลองเพื่อนำเข้าสู่เซลล์และเป็นจุดเริ่มต้นการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเด็งกี่ในเซลล์ แต่ full-length cDNA clone เท่าที่มีผู้รายงานไว้ยังคงมีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น การใช้ low copy number plasmid vector และการเพิ่มจำนวนใน host cell ที่หาได้ยาก เพื่อช่วยลดข้อจำกัดเหล่านี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ 16681 ใน high copy number plasmid, pBluescript II KS, จนได้ full-length cDNA clone ที่มีความคงตัวสูงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในเซลล์แบคทีเรียที่หาได้ง่าย 2 ชนิด สามารถใช้ full-length cDNA clone ที่สร้างขึ้นเป็นแม่แบบของการสร้าง RNA transcript ที่เริ่มต้นการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในเซลล์ BHK-21 ได้ภายในเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากนำ RNA transcript เข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ ยังสามารถนำ full-length cDNA sequence ถ่ายทอดให้แก่ high copy number plasmid, pGem 3Z, และสามารถสร้าง full-length cDNA clone ที่มีการกลายพันธุ์ที่ prM-M cleavage site ได้โดยไม่ยากนัก การสร้าง full-length cDNA clone ใน pBluescript II KS มีข้อดีหลายประการ เช่น การที่ pBluescript II KS ขาด restriction enzyme recognition site สำหรับหลายๆเอนไซม์ที่ตัดในสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสเด็งกี่ช่วยให้การ clone และการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมมีความคล่องตัวสูงขึ้น นอกจากนั้น การที่มี T7 and T3 RNA polymerase promoters จะช่วยให้สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ promoter ที่ใช้เติมเข้ากับปลาย 5' ของสารพันธุกรรมได้ด้วย

ABSTRACT

Dengue hemorrhagic fever and other related diseases caused by dengue virus infection remain a major health problem in Thailand and many countries in the tropical region. The lack of specific anti-viral treatment and effective vaccine neccessitate continuing research into viral replication strategy and mechanism, pathogenesis and vaccine development. These researches have been greatly augmented by the availability of full-length cDNA clones which can be used as template for generating in vitro infectious RNA transcripts capable of initiating viral replication cycle in susceptible host cells. Although several full-length cDNA clones were described since 1991, they suffered from the need to be propagated in low copy number plasmid vectors and, in some cases, specific E. coli strains. To facilitate the manipulation of dengue viral genome, we herein described a strategy for the construction of a full-length cDNA clone for a dengue type 2 strain 16681 in a high copy number plasmid, pBluescript II KS. Following the transformation into two commercially available E. coli strains, the full-length clone can be stably propagated at room temperature. Capped in vitro transcripts derived from the clone by using SP6 RNA polymerase were infectious upon transfection into BHK-21 cells as evidenced by positive staining for viral antigen by a 4-step peroxidase-anti-peroxidase method only 48 hours after transfection, and also by propagating viruses in mosquito cells. The full-length cDNA sequence was successfully transferred to another high copy number plasmid, pGem 3Z. In addition, several in vitro-generated mutant subclones bearing mutations at the preM-M cleavage sites were successfully introduced into the full-length clone through the rapid cloning strategy. Cloning of the full-length cDNA clone in this high copy number plasmid offers several advantages, such as the lack of several enzyme recognition sites in the vector sequence which allows greater flexibility during the cloning and modification steps. The presence of T7 and T3 RNA polymerase promoters in the vector also allows the comparison of promoter strength.