



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุวิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การวิเคราะห์หาตำแหน่งที่สามารถเป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัสบนโปรตีน NS1 ของไวรัส
ไข้หวัดนก

Analysis of Targets for Antiviral Drug on NS1 Protein of Avian Influenza Virus

นามผู้วิจัย นายกรภพ คล้ายวงษ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิพย์ ชวงค์โกมล, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การวิเคราะห์หาตำแหน่งที่สามารถเป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัสบนโปรตีน NS1 ของไวรัส
ไข้หวัดนก

Analysis of Targets for Antiviral Drug on NS1 Protein of Avian Influenza Virus

โดย

นายกรภพ คล้ายวงษ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรภพ คล้ายวงษ์ 2554: การวิเคราะห์หาตำแหน่งที่สามารถเป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัสบนโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนก ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D.
101 หน้า

การใช้ยาต้านไวรัส (antiviral drug) ไข้หวัดนก หรือไข้หวัดใหญ่จะสร้างความกดดันให้ไวรัสหลีกเลี่ยงจากการยับยั้งด้วยยาต้านไวรัสจึงจำเป็นต้องหาเป้าหมายของยาต้านไวรัสใหม่ๆ โปรตีน non structural 1 (NS1) ของไวรัสไข้หวัดนกมีส่วน RNA binding domain (RBD) ที่จับกับ RNA สายคู่ (dsRNA) ของไวรัสเพื่อยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน เพิ่มการแสดงออกโปรตีนไวรัสในขณะที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเจ้าบ้าน RBD_NS1 จึงเหมาะสมเป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัส ในการศึกษาทำการผลิต recombinant โปรตีนจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก A/chicken/Thailand/KU14/04 H5N1 สร้างโครงสร้างสามมิติของ RBD_NS1 โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับ RBD_NS1 ของ A/crow/Kyoto/T1/2004 ซึ่งมีความเหมือน 100% ได้โครงสร้างสามมิติที่มี α -helix 3 อัน มี Lysine 41 และ Arginine 38 จับกับ dsRNA จากนั้นทำการคัดสรร (virtual screening) สารประกอบ จาก National Cancer Institute (NCI) database ด้วยโปรแกรม Auto Dock 3.0.5 ได้ lead compound 5 ชนิดที่จับภายในร่องกลาง RBD มีค่า binding energy ต่ำกว่า -16.05 Kcal/mol และพัฒนาเทคนิค RNA binding assay เพื่อทดสอบการทำงานของ RBD_NS1 ในการจับกับ dsRNA ที่สร้างจากปฏิกิริยา *In vitro* transcription ทดสอบสารประกอบ 2 ชนิด คือ Estradiol (NCI0035) และ Veratridine (NCI0082) และสารสกัดสมุนไพร 34 ชนิด พบว่าสารประกอบทั้งสองไม่ยับยั้งปฏิกิริยาการจับกับ RNA แต่พบว่ามีสมุนไพร 5 ชนิด คือ ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza*), สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*), กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis*), ไพล (*Zingiber montanum*) และ เปลือกนนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) ยับยั้งการจับกันระหว่าง dsRNA กับ RBD_NS1 ได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถพัฒนาเทคนิค RNA binding assay ในการทดสอบหาสารประกอบที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน RBD_NS1 ได้สำเร็จและโปรตีน NS1 อาจเป็นเป้าหมายใหม่ของยาต้านไวรัสไข้หวัดนกได้

Konrapob Klaywong 2011: Analysis of Targets for Antiviral Drug on NS1 Protein of Avian Influenza Virus. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Porn Tippa Lekcharoensuk, Ph.D. 101 pages.

The use of antiviral drugs will create pressure on the influenza A virus to escape from drug inhibition. Therefore, the analysis of new drug targeting protein is essential. Influenza A virus non-structural 1 (NS1) protein is a virulence protein since it antagonizes host innate immune responses and inhibits host protein synthesis but enhances viral gene expression. Thus, NS1 may be one of antiviral drug targeting candidates. Recombinant RBD-NS1 protein of an avian influenza virus H5N1, A/chicken/Thailand/KU14/04, was produced. The three dimensional structure of our RBD-NS1 protein was built based on that of A/crow/Kyoto/T1/2004. The structure positions 3 α helices in which Arginine 38 and Lysine 41 of the 2nd helix involve in dsRNA binding. A virtual screening was performed using Auto Dock 3.0.5 for high throughput screening compounds from the National Cancer Institute (NCI) database. The lead compounds with binding energy lower than -16.05 Kcal/mol were selected for further assay. An RNA binding assay technique was developed to test the RNA binding function of RBD-NS1 protein and the inhibitory effect of the selected lead compounds and 34 herbal extracts. Virtual screening demonstrated 5 lead compounds that bound within the RBD groove with binding energy less than -16.05 Kcal/mol. Two compounds with low binding energy, Estradiol (NCI0035) and Veratridine (NCI0082), were found to have no inhibitory effect on the RBD-NS1. However, the extracts from 5 herbs, *Curcuma xanthorrhiza*, *Terminalia belirica*, *Salacia chinensis*, *Zingiber montanum* and *Peltophorum pterocarpum*, could inhibit the binding between the dsRNA and RBD-NS1 protein. The results show that RNA binding assay was successfully developed to test compounds that can inhibit function of RBD-NS1 protein. NS1 protein may be a new target of antiviral drug for avian influenza virus.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณรองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิงพรทิพภา เล็กเจริญสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่แนะนำให้ข้าพเจ้าได้ทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ ยังช่วยเหลือให้คำปรึกษาต่างๆ ทั้งเรื่องการศึกษาและการทำงานวิจัย เปิดโลกในมุมมองที่ทุกอย่างสามารถเป็นไปได้ จนทำให้ข้าพเจ้าได้ทำงานวิจัยนี้จนเสร็จสิ้น ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังเป็นครูที่เอาใจใส่ลูกศิษย์เป็นอย่างมากและเป็นตัวอย่างนักวิจัยที่ดีให้กับลูกศิษย์

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิวิ ชูวงศ์โกมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัยทางด้านโปรตีนทั้งทางด้านวิชาการและการใช้ห้องปฏิบัติการชีวเคมีที่ และช่วยเหลืออำนวยความสะดวกต่างๆ ในการปฏิบัติงานวิจัยที่คณะวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณภัทร สองทวี ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับงาน โปรตีนและงานคอมพิวเตอร์ ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ สาขาพันธุวิศวกรรม ที่คอยเป็นห่วงเป็นใยกันตลอดเวลา ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำ และให้คำปรึกษาในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่คอยช่วยเหลือในการปฏิบัติงานและการดำเนินชีวิตในห้องปฏิบัติการ และแนะนำการทำงานเกี่ยวกับงานวิจัยเป็นอย่างดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ร่วมกับโครงการสหวิทยาการ สาขาวิชาพันธุวิศวกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2551 (MRG-WII515S023)

สุดท้ายขอขอบคุณมารดา และครอบครัวที่ห่วงใยคอยให้กำลังใจในการเรียน จนทำให้สามารถเรียนถึงในระดับบัณฑิตศึกษาได้

กรรภพ คล้ายวงษ์

เมษายน 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	42
อุปกรณ์	42
วิธีการ	43
ผลและวิจารณ์	58
สรุปและข้อเสนอแนะ	84
สรุป	84
ข้อเสนอแนะ	85
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	86
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การระบาคใหญ่ของใช้หัดใหญ่ในอดีต	5
2	ตัวอย่างโปรแกรมจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่มีทางเวบไซต์	37
3	สารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของโปรตีน RBD_NS1	57
4	แสดงค่าพลังงานของสารประกอบ 15 โครงสร้างที่มีค่า binding energy -15.04 ถึง -15.99 Kcal/mol	69
5	แสดงค่าพลังงานของสารประกอบ 5 โครงสร้างที่มีค่า binding energy ต่ำที่สุดจากการคัดสรร	72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ Influenza A virus	8
2	แสดงวงจรชีวิตของไวรัสไข้หวัดนก	12
3	การจับกันของโปรตีน PA PB1 PB2 เป็น polymerase complex	15
4	โครงสร้างสามมิติของโปรตีน Hemagglutinin (HA)	17
5	โครงสร้างสามมิติของโปรตีน Nucleoprotein (NP)	18
6	โครงสร้างสามมิติของโปรตีน Neuraminidase (NA)	19
7	แผนผังตำแหน่งกรดอะมิโนบนโปรตีน NS1 ที่สามารถ interaction กับโมเลกุลต่างๆ	20
8	RNA binding domain ของโปรตีน NS1 ที่สร้างพันธะจับกับ phosphodiester backbone ของ dsRNA	22
9	แสดงโครงสร้างสามมิติส่วน effector domain (ED) ของโปรตีน NS1	23
10	แสดงโครงสร้างสามมิติโปรตีน NS1 เต็มสายทั้งส่วน RBD และ ED	23
11	แสดงโครงสร้างสามมิติโปรตีน NS1 ที่เกิด oligomerize ต่อเนื่องกันเป็นสายยาว	24
12	แสดงโครงสร้างสามมิติโปรตีน NS1 ที่เกิด oligomerize แล้วภายใน tubular เกิดลักษณะเป็นอุโมงค์	25
13	แสดง diagram การทำงาน ของโปรตีน NS1 ภายในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่	26
14	แสดงขั้นตอนการส่งสัญญาณ retinoic acid-induced gene I (RIG-I) ในการกระตุ้นการสังเคราะห์ type I IFN	28
15	แสดงโครงสร้างสามมิติโปรตีน M2 ที่อยู่บริเวณ viral membrane	34
16	แสดงโครงสร้างโปรตีน neuraminidase (NA) และ sialic acid binding pocket	35
17	แสดง sialic acid binding site ที่เป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัส และ โครงสร้างสามมิติของยาต้านไวรัส Zanamivir และ Oseltamivir ที่สามารถจับกับ sialic acid binding site	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	แสดงการเกิด mutation ของ Histadine ตำแหน่งที่ 274	36
19	แสดงกระบวนการคัดสรร Virtual screening	41
20	แสดงแผนผังของพลาสมิด pGEM_T easy cloning vector และ pQE80L expression vector	44
21	แสดงปฏิกิริยา <i>In vitro</i> transcription และการผลิต RNA สายคู่	52
22	แสดงการจัดวางอุปกรณ์ Northern blot โดยใช้กระแสไฟฟ้า	55
23	แสดงผล 1% agarose gel electrophoresis การทำ PCR colony screening พลาสมิด pQE_NS1 ในเชื้อแบคทีเรีย DH5 α และแสดงพลาสมิด pQE_NS1	59
24	แสดงผล 12% SDS-PAGE หลังจากการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 เต็มสาย	60
25	แสดงผล 12% SDS-PAGE การทำโปรตีน NS1 ให้บริสุทธิ์ในสารละลาย denaturing buffer	61
26	แสดงผล 12% SDS-PAGE หลังการทำโปรตีน NS1 ให้บริสุทธิ์แล้วนำโปรตีนในแต่ละ fraction มารวมกันแล้วเพิ่มความเข้มข้น	62
27	agarose gel electrophoresis แสดงชิ้นส่วนของยีน RBD_NS1 และผล colony PCR screening พลาสมิด pQE_RBD_NS1	63
28	12% SDS-PAGE แสดงผลการแสดงออกโปรตีน RBD_NS1 ในสถานะต่างๆ	64
29	12% SDS-PAGE แสดงผลการแสดงออกโปรตีน RBD-NS1	64
30	12% SDS-PAGE แสดงผลการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีน RBD_NS ในสถานะ native	65
31	12% SDS-PAGE แสดงผลหลังการทำโปรตีน RBD_NS1 ให้บริสุทธิ์แล้วนำโปรตีนในแต่ละ fraction มารวมกันแล้วเพิ่มความเข้มข้น	66
32	แสดงผล Western blot ด้วยเทคนิค Electro blotting โดยใช้ anti-His หลังการทำโปรตีน NS1 และ RBD_NS1 ให้บริสุทธิ์	66

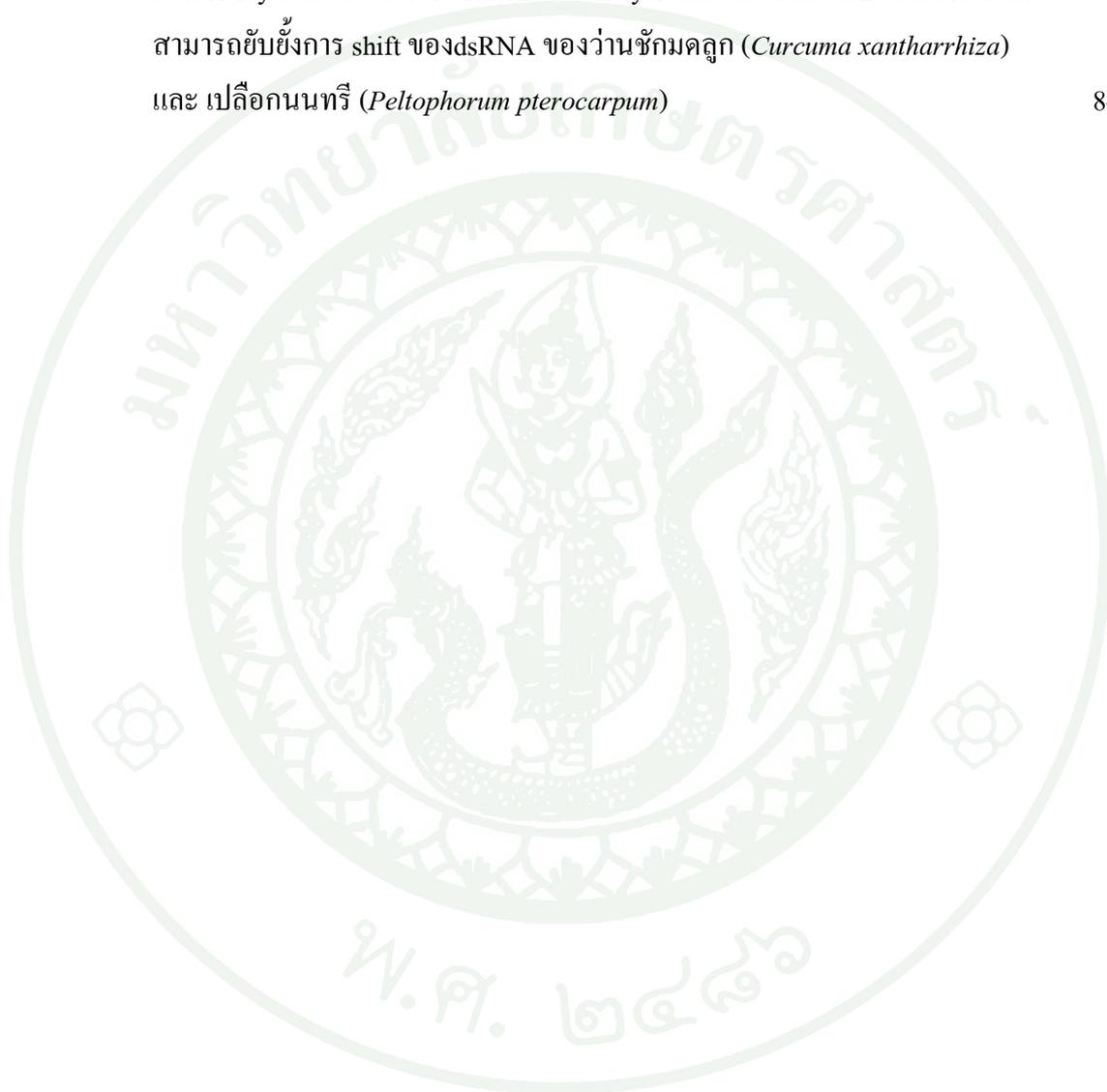
สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
33	แสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนลำดับที่ 1-72 ของโปรตีน RBD_NS1 /A/chicken/TH/KU14/04 กับ A/crow/Kyoto/T1/2004 (H5N1) รหัส 2Z0A	67
34	โครงสร้างสามมิติโปรตีน RBD_NS1 A/chicken/TH/KU14/04	67
35	โครงสร้างสามมิติโปรตีน RBD_NS1 แสดงสารประกอบ 5 โครงสร้างที่มี binding energy ต่ำที่สุดจับบริเวณ groove ซึ่งอยู่ตรงกลางของ RNA binding site	71
36	แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนใน RNA binding groove บนโปรตีน NS1 ที่สามารถเกิดพันธะ H-bond กับ compounds ที่ถูกคัดสรรจาก NCI database	73
37	แสดงผล 1.2 % agarose gel electrophoresis สาย DNA แม่แบบขนาด 345 คู่เบส ที่ได้จากเทคนิค PCR	74
38	แสดงผล 1.2 % agarose gel electrophoresis สาย DNA แม่แบบขนาด 100 คู่เบส ที่ได้จากเทคนิค PCR	75
39	ภาพ X-ray ฟิล์มที่ได้จากการทำ dot blot DIG-labeled RNA	76
40	ภาพ X-ray ฟิล์มที่ได้จาก Northern blot analysis ทดสอบความแตกต่างของการจับระหว่างโปรตีน NS1 กับ dsRNA และ ssRNA ด้วยเทคนิค EMSA	77
41	ภาพ X-ray ฟิล์มที่ได้จาก Northern blot analysis ทดสอบการจับของ dsRNA ที่ความเข้มข้น 1 μ M กับโปรตีน RBD_NS1 ที่มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 μ M	78
42	ภาพ X-ray ฟิล์มที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงผล RNA binding assay ทดสอบการจับกันระหว่าง dsRNA 1 μ M กับ RBD_NS1 ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 และ 3.5 μ M	79
43	ภาพ X-ray ฟิล์มที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงผลการจับกันระหว่าง dsRNA กับ RBD_NS1, Trypsin, α -chymotrypsin, BSA และ 6xHis-RT HIVI	80
44	ภาพ X-ray ฟิล์มที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงการทดสอบสารประกอบ Estradiol และ Veratridine ในการยับยั้ง ปฏิกริยา RNA binding assay	81
45	ภาพ X-ray ฟิล์มที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรไทย	83

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
46	ภาพ X-ray ฟิล์มที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงการทดสอบความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการ shift ของ dsRNA ของว่านชักมดลูก (<i>Curcuma xanthorrhiza</i>) และ เปลือกนนทรี (<i>Peltophorum pterocarpum</i>)

84



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

RNP	= Ribonucleoprotein
NEP	= Nuclear export protein
NES	= Nuclear export sequence
PABPII	= Poly(A)-binding protein II
NMR	= Nuclear magnetic resonance
CPSF	= Cleavage and polyadenylation specificity factor
IFN	= Interferon
ISGs	= Interferon stimulated antiviral genes
ISRE	= Interferon stimulated regulatory element
PAMPs	= Pathogen-associated molecular patterns
PRR	= Pattern recognition receptor
RIG-I	= Retinoic acid-induced gene I
eIF4	= Eukaryotic initiation factor 4
TLRs	= Toll-like receptor
NOD	= Nucleotide oligomerization domain
NLR	= (NOD) like receptor
CARD	= Caspase-recruitment domain
TRIM25	= Tripartite motif 25
Ub	= Ubiquitin
MAVS	= Mitochondrial antiviral signaling
PKR	= Protein kinase R
OAS	= Oligoadenylate synthetase
NS	= Nonstructural protein
PB	= Protein base
PA	= Protein acid
M	= Matrix protein
NP	= Nucleoprotein
NA	= Neuraminidase

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

HA	= Hemagglutinin
ED	= Effector domain
RBD	= RNA binding domain
GBP	= Glutamate-binding protein
STAT	= Signal Transducer and Activator of Transcription
AP1	= Activator protein 1
Mda-5	= Melanoma differentiation-associated gene-5
IRF	= Interferon regulatory factor
ATP	= Adenosine-5'-triphosphate
MDCK	= Madin Darby canine kidney cells
TNF	= Tumor necrosis factors

การวิเคราะห์หาตำแหน่งที่สามารถเป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัสบนโปรตีน NS1 ของ ไวรัสไข้หวัดนก

Analysis of Targets for Antiviral Drug on NS1 Protein of Avian Influenza Virus

คำนำ

ไวรัสไข้หวัดนก H5N1 เกิดการระบาดและสร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกและสามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนทำให้ผู้ที่ติดเชื้อมีอัตราการเสียชีวิตที่สูง ซึ่งในปัจจุบันไวรัสยังไม่มีพัฒนาจากไวรัสสัตว์ปีกไปเป็นไวรัสของคนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ การติดต่อข้ามสายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้ หากมีการปล่อยให้ไวรัสของสัตว์ปีกมีโอกาสทำให้คนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆติดเชื้อ เป็นการเปิดโอกาสให้ไวรัสของสัตว์ปีกมีโอกาสปรับตัวในคนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือผสมรวมกับไวรัสของคน ซึ่งเป็นการเร่งให้มีการอุบัติขึ้นใหม่ของไวรัส และเกิดการระบาดใหญ่ (pandemic) ตามมา (พรทิพภา, 2550) ยาต้านไวรัสจึงมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งไวรัสในคนภายหลังการติดเชื้อ

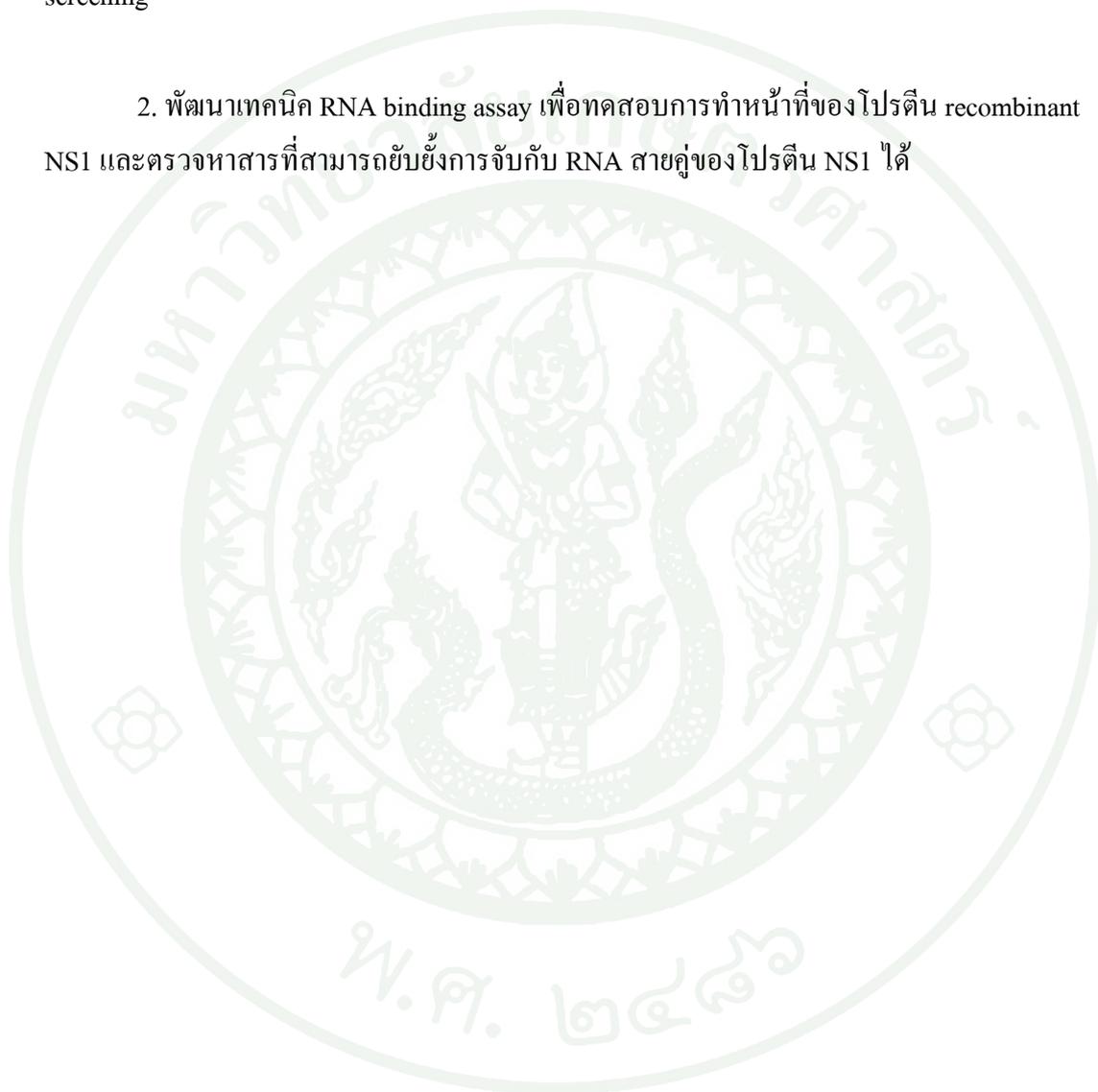
ยาต้านไวรัส (antiviral drug) ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ในปัจจุบันคือ amantadine และ oseltamivir ซึ่งเป็น antiviral drug ที่จำเพาะต่อส่วนของโปรตีน M2 และ NA ตามลำดับ ซึ่งการใช้ยาต้านไวรัสจะเป็นการสร้างความกดดันให้ไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงโปรตีนเพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งจากยาต้านไวรัสซึ่งในปัจจุบันพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่ติดต่อยา amantadine (Basu *et al.*, 2009) และ oseltamivir (Casalegon *et al.*, 2010) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการหาตำแหน่งที่สามารถเป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัสใหม่ๆ ซึ่งต้องเป็นบริเวณที่สำคัญต่อวงจรชีวิตของไวรัส นอกจาก M และ NA โปรตีนแล้ว โปรตีนที่อาจเป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัสคือ โปรตีน NS1 ซึ่งโปรตีน NS1 มีส่วนเกี่ยวข้องในการยับยั้งการแสดงออกโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน (Noah *et al.*, 2003) แต่โปรตีน NS1 จะช่วยส่งเสริมการแสดงออกชิ้นของไวรัสเอง (Burgui *et al.*, 2003) นอกจากนี้โปรตีน NS1 ยับยั้งหลายๆกลไก ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน (innate immunity) ต่อการติดเชื้อของไวรัส บริเวณ N-terminal ของโปรตีน NS1 ประกอบด้วย RNA binding domain (RBD) ซึ่งจะลดการเหนี่ยวนำ transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ IFN β (Cheng *et al.*, 2009) ทำให้ปริมาณการหลั่งของ IFN β ของเซลล์ที่มีการติดเชื้อลดลงซึ่งจะเห็นว่า NS1 มีความสำคัญต่อวงจรชีวิตของไวรัสและเป็น virulent factor อันหนึ่ง เมื่อหน้าหนึ่งของ

โปรตีน NS1 ถูกทำลายไปจากการที่เกิด mutation ของยีน NS1 จะทำให้ไวรัสไม่สามารถก่อโรคได้ ดังนั้น โปรตีน NS1 มีคุณสมบัติของโปรตีนเป้าหมายสำหรับยาต้านไวรัสตัวใหม่ (Yin *et al.*, 2007) บริเวณ กรดอะมิโน Arginine ตำแหน่ง 38 บริเวณ RNA binding domain ของโปรตีน NS1 เป็นส่วนที่มีความอนุรักษ์สูง และมีหน้าที่สำคัญต่อไวรัสซึ่งบริเวณดังกล่าว และร่องที่อยู่ตรงกลางของ RNA binding site (central groove) อาจจะเป็นเป้าหมายที่ดีของยาต้านไวรัสตัวใหม่สำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่

ในการหาดำแหน่งของเป้าหมายของยาต้านไวรัสบนโปรตีน NS1 นั้น จะทำการคัดสรรสารประกอบ (lead compound) จากฐานข้อมูล National Cancer Institute (NCI) ซึ่งสามารถจับกับบริเวณ RNA binding site และร่องที่อยู่ตรงกลาง โดยใช้ virtual screening จากนั้นทำการทดสอบการทำหน้าที่ของโปรตีน NS1 ในการจับกับ RNA สายคู่ (dsRNA) ด้วย ปฏิกริยา RNA binding assay ซึ่งสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกริยา RNA binding assay ได้ นั่นอาจเป็นสารประกอบที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้านไวรัสได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. หาคำแหน่งของยาต้านไวรัสบนโปรตีน NS1 และตรวจคัดกรองสารประกอบตั้งต้น (lead compound) ที่สามารถจับกับบริเวณ RNA binding domain ของโปรตีน NS1 ด้วยวิธี Virtual screening
2. พัฒนาเทคนิค RNA binding assay เพื่อทดสอบการทำหน้าที่ของโปรตีน recombinant NS1 และตรวจหาสารที่สามารถยับยั้งการจับกับ RNA สายคู่ของโปรตีน NS1 ได้



การตรวจเอกสาร

การระบาดของไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์ได้เกิดขึ้นทุกๆ 10-50 ปีในหลายศตวรรษที่ผ่านมา โดยทำให้เกิดความเจ็บป่วยและการตายซึ่งมีผลกระทบทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง ในช่วงศตวรรษที่ 20 จากการระบาดของไข้หวัดใหญ่ที่เกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1918, 1957 และ 1968 ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส H1N1, H2N2, และไวรัส H3N2 ตามลำดับ (Pappaioanou, 2009) จากนั้นในปีพ.ศ. 2546 ถึงปัจจุบันไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่ระบาดอยู่ในแถบเอเชียหลายประเทศนั้นก่อให้เกิดความเจ็บป่วยจนถึงแก่ชีวิตในคน โดยมีอัตราการตายสูง เมื่อโรคนี้พัฒนาไปเป็นโรคประจำถิ่น ในขณะที่ยังคงมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมตลอดเวลาอาจเพิ่มความสามารถในการแพร่เชื้อจากคนสู่คนได้ นอกจากนั้นการติดเชื้อในสัตว์ปีกทำให้ปริมาณไวรัสในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้น องค์การอนามัยโลกคาดการณ์ว่าถ้าเกิดการระบาดใหญ่จะทำให้มีผู้เสียชีวิตหลายล้านคนทั่วโลก ประเทศที่เกิดการระบาดจะได้รับความเสียหายรุนแรงมีคนเสียชีวิตเป็นจำนวนมาก เศรษฐกิจของประเทศจะเสียหายอย่างมาก

ความรุนแรงและผลกระทบของไข้หวัดนกชนิดรุนแรงสายพันธุ์ H5N1

ประเทศไทยมีการรายงานการระบาดของเชื้อไวรัส H5N1 ในปี 2547 เกิดจากนกป่าเป็นพาหะถ่ายทอดไวรัสมายังสัตว์ปีกที่เลี้ยงไว้ และสามารถติดต่อสู่คนผ่านทางสัมผัสสารคัดหลั่งหรือมูลของสัตว์ปีกที่ติดเชื้อ ซึ่งคนที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ และได้รับการติดเชื้อไข้หวัดนกอาจทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างไวรัสทั้งสอง ส่งผลทำให้เกิดไวรัสชนิดใหม่ซึ่งอาจมีความรุนแรงเช่นเดียวกับไข้หวัดนก และแพร่จากคนสู่คนได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็วเช่นเดียวกับไข้หวัดใหญ่ของคน ซึ่งอาจก่อให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ (Pandemic) ได้ ในศตวรรษที่แล้วเคยเกิดการระบาดของไข้หวัดใหญ่ในคนมาแล้ว 3 ครั้ง (พริททิภา และคณะ, 2549) ตามตารางที่ 1 แต่ละครั้งจะเกิดการระบาดทั่วโลกภายใน 1 ปีหลังจากที่ตรวจพบในครั้งแรก นอกจากก่อให้เกิดความเจ็บป่วยและการเสียชีวิตแล้วยังก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจและสังคมเป็นอย่างมาก การแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนก H5N1 เริ่มมีการระบาดในเอเชียตั้งแต่ปลายปี 2546 ส่วนในประเทศไทยมีการรายงานการระบาดครั้งแรกเมื่อวันที่ 23 มกราคม 2547 ทำให้มีการทำลายไก่ภายในพื้นที่ที่มีการระบาดมากกว่า 30 ล้านตัว ก่อให้เกิดความเสียหายโดยตรงต่อเศรษฐกิจอย่างมากในส่วนของอุตสาหกรรมสัตว์ปีก อีกทั้งมีคนที่ติดเชื้อไข้หวัดนก H5N1 แล้วเสียชีวิต 14 รายซึ่งสร้างความตื่นกลัวให้กับประชาชนอย่างมาก

ตารางที่ 1 การระบาดใหญ่ของไข้หวัดใหญ่ในอดีต

ปีที่เกิดการระบาด (พ.ศ.)	สายพันธุ์ของ ไวรัสที่เกิดการ ระบาด	ประมาณการผู้เสียชีวิต จากการระบาด	สมมติฐานจุดกำเนิดของการ ระบาด
2461-2462 (Spanish Flu)	H1N1	20-50 ล้านคนทั่วโลก	ยังไม่ทราบต้นกำเนิดที่ แน่นอนแต่อาจเกิดจากการ ผสมรวมกันของไวรัส ไข้หวัดใหญ่ในคนดั้งเดิมและ ไวรัสสัตว์ปีกผ่านตัวกลาง (Intermediate host) ก่อนที่จะ มีวิวัฒนาการในคน
2500 (Asian Flu)	H2N2	1-4 ล้านคนทั่วโลก	การผสมรวมกันของเชื้อ ไวรัส H1N1 จากคนและ ไวรัส H2N2 จากนกป่าใน แถบยูเรเชีย
2511-2512 (Hong Kong Flu)	H3N2	1-4 ล้านคนทั่วโลก	การผสมกันของเชื้อไวรัส H2N2 และไวรัส H3Nx ใน สัตว์ปีกแถบยูเรเชีย

ที่มา: พรทิพภา และคณะ (2549)

มีการคำนวณจากผู้เชี่ยวชาญด้านระบาดวิทยา หากเกิดการระบาดใหญ่ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ในครั้งต่อไปแล้วเกิดการระบาดจากคนสู่คน จะมีผู้เสียชีวิตทั่วโลกมากกว่า 30 ล้านคน และอาจมีการระบาดหนักติดต่อกันนานถึง 6 เดือน ซึ่งการระบาดดังกล่าวมีแนวโน้มที่เกิดขึ้นจากประเทศที่มีความเสี่ยงสูงสุดซึ่งประกอบด้วย จีน เวียดนาม กัมพูชา ไทย อินโดนีเซีย ตุรกี และอิรัก หากเกิดการระบาดใหญ่ในประเทศไทยประเมินได้ว่าจะมีผู้ติดเชื้อขึ้นต่ำประมาณ 6,500,000 คน (ร้อยละ 10 จากประชากรทั้งหมด) และอาจมีผู้เสียชีวิตประมาณ 65,000 คน (ร้อยละ 1) (พรทิพภา และคณะ, 2549) สถานการณ์ของประเทศไทยในช่วงปี 2004-2006 จัดอยู่ในระยะก่อนการระบาด

ใหญ่ (inter-pandemic) ระดับ 3 ซึ่งเป็นสถานะที่มีความเสี่ยงต่อการพัฒนาไปสู่ระยะการระบาดใหญ่ (Pandemic) ซึ่งหากพัฒนาไปถึงระยะนั้นจะเกิดผลกระทบอย่างรุนแรงต่อระบบเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ การศึกษาก่อนหน้านี้เชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 จะติดในสัตว์ปีกเท่านั้นแต่ในปัจจุบันสามารถติดต่อมาสู่คนได้ จึงสร้างความวิตกให้กับทั่วโลกและได้ศึกษาอย่างจริงจังถึงวิวัฒนาการของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงทำให้ผู้ที่ติดเชื้อป่วยและมีอัตราการตายที่สูงมากกว่า 60% การระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้จะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและคนที่ติดเชื้อไวรัสมีอัตราเจ็บป่วยและการตายที่สูง

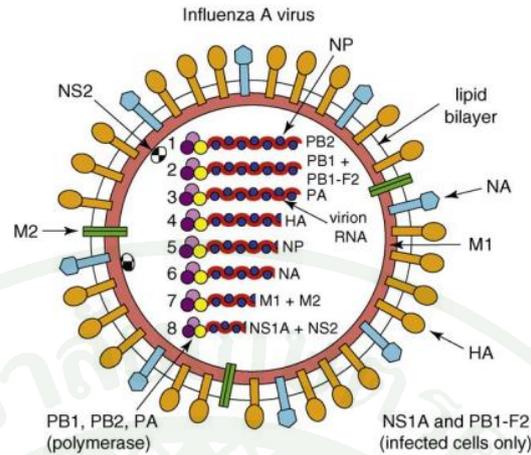
ทางด้านเศรษฐกิจการส่งออกเนื้อไก่ของประเทศไทยก่อนการระบาดของไข้หวัดนกส่วนใหญ่เป็นเนื้อไก่สดแช่แข็ง โดยประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกเนื้อไก่สดแช่แข็งคิดเป็นมูลค่ากว่าปีละ 20,000 ล้านบาท เมื่อมีการรายงานการระบาดของไข้หวัดนกเมื่อต้นปี พ.ศ. 2547 ประเทศญี่ปุ่นและสหภาพยุโรปได้ประกาศยกเลิกการนำเข้าเนื้อไก่สดแช่แข็งจากประเทศไทย ส่งผลให้ปริมาณการส่งออกเนื้อไก่สดแช่แข็งของไทยลดลงถึงร้อยละ 93 จาก 388,913 ตันในปี 2546 เหลือเพียง 26,137 ตันในปี 2547 ประเทศญี่ปุ่นที่เคยนำเข้าเนื้อไก่สดแช่แข็งจากไทยถึงร้อยละ 37 ของปริมาณการนำเข้าทั้งหมด ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 3 ในขณะที่ไทยเสียตลาดการนำเข้าเนื้อไก่สดแช่แข็งของสหภาพยุโรปจากร้อยละ 45 เหลือเพียงร้อยละ 4 ถึงแม้ว่าประเทศไทยได้เพิ่มส่วนแบ่งทางการตลาดในการส่งออกเนื้อไก่แปรรูปเพียงเล็กน้อยในปี 2547 คือจากร้อยละ 40 เพิ่มขึ้นร้อยละ 44 ของปริมาณการนำเข้าของญี่ปุ่น และคงอยู่ที่ร้อยละ 52 ในสหภาพยุโรป โดยรวมประเทศไทยเสียสัดส่วนตลาดในการส่งออกเนื้อไก่ไปประมาณครึ่งหนึ่ง เนื่องจากวิกฤตการระบาดของโรคไข้หวัดนกในปี 2547 ผลกระทบของโรคไข้หวัดนกต่อการส่งออกสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก ทำให้อัตราการขยายตัวทางเศรษฐกิจในปี 2547 ลดลง 0.22% ต่อปี คิดเป็นมูลค่าลดลง 2.29 หมื่นล้านบาทหรือมีการขยายตัวของการส่งออกลดลง 0.7% ต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการคลัง, 2548)

ถึงแม้ในปัจจุบันไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ยังไม่ได้กลับมาระบาดใหม่อีกครั้ง แต่ไวรัสเองก็จะมีวิวัฒนาการเกิดการเปลี่ยนแปลง และมีการระบาดเกิดการติดเชื้อในคนอย่างต่อเนื่อง (Pappaioanou, 2009) จึงไม่สามารถทำนายได้ว่าต่อไปในอนาคตไวรัสจะมีความรุนแรงมากเท่าใด และสามารถติดต่อจากคนสู่คนได้หรือไม่ จากการประกาศนโยบายของ The World Organization for Animal Health (OIE) ให้ประเทศที่เคยมีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 และประเทศที่เป็นกลุ่มเสี่ยงเฝ้าระวังการกลับมาระบาดของใหม่อีกครั้ง จนถึงการระบาดที่เกิดจากการติดเชื้อจากคนสู่คนที่ต้องมีการรับส่งข่าวสารข้อมูลในการระบาดของเชื้อไวรัสในแต่ละประเทศเพื่อป้องกันและเตรียมความพร้อมในการรับมือกับการกลับมาระบาดของครั้งใหม่ของเชื้อไวรัส H5N1 ซึ่งรวมถึงการ

วางแผนตรวจสอบคลังยาด้านไวรัสเพื่อวางแผนใช้ในการรักษาโรคให้เพียงพอต่อประชากรที่สามารถเกิดการติดเชื้อต่อไป (Glass *et al.*, 2006)

รูปร่างลักษณะโครงสร้างไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A

ไวรัสไข้หวัดใหญ่จัดเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (Influenza A virus) สายพันธุ์ H5N1 ซึ่งอยู่ในวงศ์ *Orthomyxoviridae* ไวรัสในวงศ์นี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 สกุล (genera) ได้แก่ *Influenza virus A*, *Influenza virus B* และ *Influenza virus C* ซึ่งแบ่งตามความแตกต่างของโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 2 ชนิด คือ matrix protein (M) และ nucleoprotein (NP) (Girard *et al.*, 2005) influenza virus เป็นไวรัสที่มีเยื่อหุ้ม (enveloped) เป็น lipid bilayer รูปร่างของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้แสดงไว้ในภาพที่ 1 ประกอบด้วยชุดจีโนมซึ่งเป็น RNA สายเดี่ยวชนิดลบ (negative single-stranded RNA) จำนวน 8 ท่อน เนื่องจาก RNA ของไวรัสเป็น RNA สายลบจึงต้องใช้เอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ในการ transcription เพื่อที่จะสร้าง RNA สายบวก (plus-strand viral mRNA) ในการเริ่มต้นการเพิ่มจำนวนไวรัสต่อไป ท่อนยีนที่มีขนาดใหญ่ที่สุด 3 ท่อนบรรจุรหัสของเอนไซม์ polymerase 3 ชนิด ได้แก่ PB1, PB2 และ PA ในส่วนของยีน PB1 ยังมีรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน PB1-F2 ที่เป็น nonstructural protein ขนาดเล็กที่มีส่วนกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์เจ้าบ้าน ท่อนยีนที่มีขนาดกลางของไวรัสจะบรรจุรหัสของโปรตีน hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA) และ nucleocapsid (NP) HA เป็นโปรตีนหลักบนผิวอนุภาคไวรัสที่จับกับ sialic acid receptor บนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน และทำหน้าที่กระตุ้น neutralizing antibody ของเซลล์เจ้าบ้าน ส่วนโปรตีน NA เป็นโปรตีนบนผิวอนุภาคไวรัสเช่นเดียวกันแต่ทำหน้าที่กำจัด sialic acid ออกจาก glycoprotein HA ในขณะที่ไวรัสทำการ budding ออกจากผิวเซลล์ โปรตีน NP ทำหน้าที่ในการจับกับสายพันธุกรรมของไวรัสในแต่ละท่อนเพื่อช่วยในการ replication และรวมตัวเป็น ribonucleoprotein (vRVPs)



ภาพที่ 1 โครงสร้างอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ Influenza A virus

ที่มา: Krug and Aramini (2009)

ชั้นตอนที่ 7 มีรหัสของ matrix protein 1 (M1) และ 2 (M2) โดยโปรตีน M1 นั้นอยู่บริเวณภายใต้เยื่อหุ้ม (lipid bilayer) ในอนุภาคไวรัสซึ่งจับกับ ribonucleoprotein (vRNPs) complex และจับกับส่วนปลาย COOH ของโปรตีน HA และ NA ที่ยื่นอยู่ในอนุภาคไวรัส โปรตีน M2 ทำหน้าที่เป็น ion channel protein ที่มีส่วนสำคัญในการถอดเปลือกหุ้มไวรัส (uncoating) RNA ตอนที่ 8 เป็นตอนที่ มีขนาดเล็กที่สุดมีรหัสของโปรตีน 2 ชนิดคือ nonstructural protein 1 (NS1) และ 2 (NS2) โปรตีน NS2 ทำหน้าที่เป็น nuclear export protein (NEP) สำหรับส่ง vRNPs ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ออกจากนิวเคลียสไปยังไซโทพลาซึม ส่วนโปรตีน NS1 ไม่สามารถพบได้ในอนุภาคไวรัสแต่จะมีการสร้างขึ้นระหว่างที่ไวรัสเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน โดยมีหน้าที่หลายรูปแบบ (multifunctional) ในการยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดการทำงานของโปรตีน NS1 ต่อไป

วิวัฒนาการของไวรัสไข้หวัดนก H5N1

ในปี 1997 ได้เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ใน Hong Kong เมื่อทำการวิเคราะห์สายพันธุกรรมทั้ง 8 ท่อนพบว่าเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคคือเชื้อไวรัสไข้หวัดนก subtype H5N1 ที่มีความรุนแรง (virulence) มียีน HA และ NA มาจากไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากห่านป่าในมณฑล กวางตุ้งของประเทศจีน (A/goose/Guangdong/1/96; Gs/Gd/96) และสายพันธุกรรมอีก 6 ท่อนที่เหลือได้จากไวรัสแหล่งอื่นโดยการผสมรวมกัน (reassortment) หลายครั้ง (Li *et al.*, 2004; Lipatov *et al.*, 2004)

หลังจากที่เกิดการระบาดมีการจำกัดการระบาดของโรคโดยการทำลายไก่ แต่ไวรัสต้นกำเนิดนั้น (Gs/Gd/96) ยังคงหมุนเวียนอยู่ในประชากรห่านทางตอนใต้ของประเทศไทยและเกิดการแลกเปลี่ยนสายพันธุกรรมกับไวรัสไข้หวัดนกอื่นๆ ที่หมุนเวียนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันเกิดเป็นจีโนไทป์ (genotype) ต่างๆ (V W X X₂ X₃ Z และ Z+) ซึ่งตั้งแต่ปี 1997-2001 HA ของจีโนไทป์ต่างๆ มีคุณสมบัติที่เป็นแอนติเจนคงเดิม จนกระทั่งปี 2002 HA มีคุณสมบัติทางแอนติเจนเปลี่ยนไป (antigenic drift) และสามารถก่อโรคในเป็ดและนกกินน้ำได้ ช่วงต้นปี 2003 มีรายงานเด็กผู้หญิงและบิดาชาวฮ่องกงเสียชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 เมื่อวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าใกล้เคียงกับไข้หวัดนก H5N1 ในปี 2002 (Lekcharoensuk, 2008)

ต่อมาในปี 2004 ได้เกิดการระบาดครั้งใหญ่หลายประเทศในแถบเอเชีย เช่น ประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ ไทย เวียดนาม อินโดนีเซีย กัมพูชา และลาว (Lekcharoensuk, 2008) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของสายพันธุกรรมทั้ง 8 ท่อนพบว่าไวรัสจัดอยู่ในจีโนไทป์ Z ซึ่งมี HA และ NA ใกล้เคียงกับไวรัสต้นกำเนิด (Gs/Gd/96) แต่มีการขาดหายไปของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 49-68 ของโปรตีน NA และ 80-84 ของโปรตีน NS1 เมื่อทำการวิเคราะห์เฉพาะสายพันธุกรรม HA สามารถแบ่งไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ออกเป็น 3 clade ซึ่งกระจายอยู่ตามภูมิภาคต่างๆ ของทวีปเอเชีย ไวรัสจากประเทศไทย เวียดนาม ลาว กัมพูชา และมาเลเซีย มีความสัมพันธ์กันอยู่ใน clade 1 ไวรัสจากประเทศจีน อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ จัดอยู่ใน clade 2 และไวรัสที่ก่อโรคในนกและคนในฮ่องกงในปี 1997 และ 2003 ถูกจัดอยู่ใน clade 3 และ 1' ตามลำดับ (The world health organization global influenza program surveillance network, 2005) นอกจากนี้ไวรัสที่แยกได้เวียดนามในปี 2005 จำนวน 1 isolates ถูกจัดอยู่ใน genotype G ซึ่งเป็น genotype ใหม่

ในปี ค.ศ. 2005 มีการระบาดของไข้หวัดนก H5N1 ในนกป่าอพยพที่ทะเลสาบซึ่งให้ทางตะวันตกของประเทศไทยทำให้เกิดการตายของนกชนิดต่างๆ มากกว่า 6,184 ตัว การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทำให้ทราบว่า ไวรัสไข้หวัดนกซึ่งให้มีสายพันธุกรรมยีน M NS PA PB1 และ PB2 เหมือนกับไวรัส genotype Z แต่มีสายพันธุกรรม HA NA และ NP คล้ายกับไวรัสที่แยกได้จากไก่ในมณฑลเจียงซี ซึ่งเป็นไวรัสใน genotype V เมื่อการวิเคราะห์จากยีน HA ไวรัสถูกจัดอยู่ใน clade 2.2 ซึ่งเป็นสายวิวัฒนาการจากเชื้อไวรัส A/goose/Guang dong/1/96 (GD/GD/1/96) H5N1 ที่พบในการระบาดครั้งแรกในจีน เมื่อปี 1996 ซึ่งในขณะนี้สามารถแบ่งสายวิวัฒนาการของไวรัสได้ตั้งแต่ clade 0 ถึง 9 (WHO, 2007) ไวรัส H5N1 ที่มีการระบาดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทย เมื่อมีการวิเคราะห์จากยีน HA ถูกจัดอยู่ใน clade 1 ไวรัสที่แยกได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นไวรัสใน clade 2.2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PB2 PB1 PB HA NP NA M และ NS เหมือนกัน

98.2 -100% โดยไวรัสใน clade 2.2 นั้นยังคงวนเวียนอยู่ในสิ่งแวดล้อม และแพร่กระจายอยู่ในกลุ่มของสัตว์ปีกได้ (Kang *et al.*, 2011) ต่อมาในปี ค.ศ. 2006 ไวรัสที่มีการระบาดในประเทศไทย เมื่อวิเคราะห์จากยีน HA ในการวิวัฒนาการไวรัสจัดอยู่ใน clade 2.3.4 (Chutinimitkul *et al.*, 2007) ในช่วงปี 2006-2007 ไวรัสที่แยกได้จากฝูงนกป่าในเกาหลีใต้และญี่ปุ่น เป็นไวรัส genotype C ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับไวรัสที่แยกได้จากนกป่าที่มีการระบาดในมองโกเลีย และรัสเซีย ในปี 2005

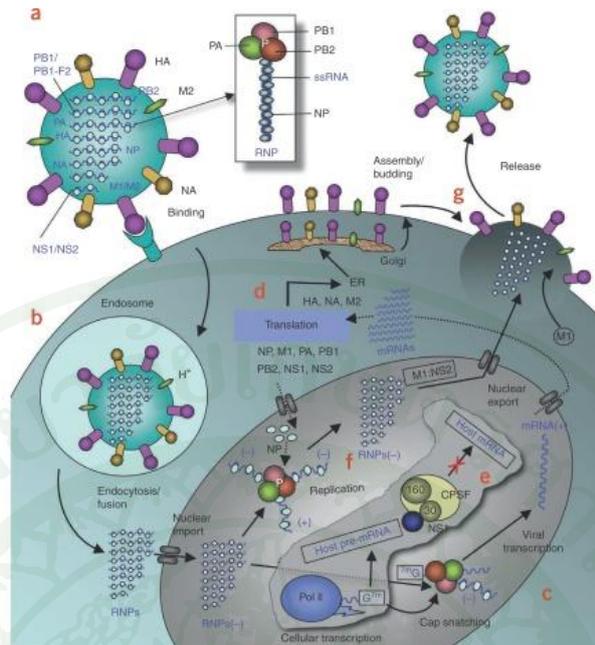
การแยกเชื้อไวรัส H5N1 ที่อยู่ใน clade 2.3.2 มีอยู่ 3 sublineages คือ 1) จีนตอนใต้ และเวียดนาม ในปี 2005-2006, 2) ฮองกง ญี่ปุ่น รัสเซีย และเกาหลีใต้ ในปี 2008-2009 3) มองโกเลีย รัสเซีย ในปี 2009 ไวรัสใน clade 2.3.2 มีลำดับกรดอะมิโนบริเวณ Cleavage site ของ HA คือ PQRERRRKRK ส่วน clade 2.2 มีลำดับกรดอะมิโนคือ PQRERRKKG (Hu *et al.*, 2011) ในปี 2007 มีรายงานพบไวรัสไข้หวัดนกที่มียีน HA และ NP ของไวรัสใน clade 2.3.2 และยีน NA กับยีนอื่นๆ ของไวรัส ใน clade 2.3.4 ในประเทศฮ่องกง เกาหลีใต้ รัสเซีย และญี่ปุ่น (Kim *et al.*, 2010) ส่วนในประเทศไทยมีการระบาดของไวรัสใน clade 2.3.4 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีเชื้อไวรัส H5N1 4 isolate ที่แยกได้คือ Ck/NIAH1137 18/06, A/Ck/THA/NP-172/06, Ck/NIAH400802/07 และ Dk/THA/KU-56/07 และในปี 2008 มีรายงานพบเชื้อไวรัสที่แยกได้ 6 isolate คือ Ck/THA/NS-339/08, Ck/THA/NS-341/08, Ck/THA/NS-342/08, Ck/THA/PC-340/08, Ck/THA/NIAH 115067/08 และ Ck/THA/NIAH114843/08 จากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่แยกได้ในช่วง ค.ศ. 2004-2008 พบว่าเกิดการหายไป (deletion) ของลำดับกรดอะมิโน 20 ตัว ในยีน NA ตำแหน่งที่ 44 ถึง 68 และในยีน NS ตำแหน่งที่ 79 ถึง 83 ซึ่งเป็นไวรัสใน clade 2.3.4 และพบว่าการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน Serine ตำแหน่งที่ 31 ในยีน M2 โดยคล้ายกับการเปลี่ยนแปลงที่พบในไวรัส clade 1 ที่เกิดการคือต่อยา amatadine ได้ (Suwannakarn *et al.*, 2009)

วงจรชีวิตของไวรัสไข้หวัดนก

ภายในอนุภาคไวรัสสายพันธุ์กรรมแต่ละท่อนประกอบด้วย RNA โปรตีน NP และ เอนไซม์ polymerase 3 ชนิด (PB1, PB2 และ PA) ซึ่ง polymerase ทั้งสามจะเกาะรวมกันในลักษณะ heterotrimer ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวจะเรียกรวมกันว่า viral ribonucleoprotein complex (vRNP) vRNP จะจับกับโปรตีน M1 ซึ่งด้านนอกของโปรตีน M1 จะเชื่อมกับเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัส วงจรชีวิตของไวรัสไข้หวัดนกได้แสดงไว้ในภาพที่ 2 (Das *et al.*, 2010) การติดเชื้อเริ่มจากไวรัสเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งโปรตีน HA จะจับกับ silic acid receptor บนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้อนุภาคไวรัสถูกดึงเข้าสู่เซลล์โดยการเกิดถุง endosome vesicle ภายในถุง endosome ระยะเวลาสุดท้ายมีค่า pH ที่ต่ำซึ่ง

เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของโปรตีน HA ทำให้เกิดการเชื่อมติด (fusion) ระหว่าง membrane ของไวรัสกับ membrane endosome และ pH ที่ต่ำลงทำให้เกิดการชนถ่ายโปรตอน (H^+) เข้าไปภายในอนุภาคไวรัสผ่านทางโปรตีน M2 ion channel ทำให้สาย vRNPs หลุดออกจากโปรตีน M1 และออกไปสู่ไซโทพลาซึมแล้วอาศัย nuclear localization sequences (NLSs) บนโปรตีน NP เป็นสัญญาณในการส่ง vRNPs ผ่านเข้าไปยังนิวเคลียส (Das *et al.*, 2010) จากนั้นเอนไซม์ polymerase ของไวรัสจะเริ่มทำการสังเคราะห์ mRNA โดย PB2 จะจับกับ pre-mRNA ของเซลล์เจ้าบ้านทางด้าน 5' cap และ endonuclease domain ของโปรตีน PB1 จะตัดสาย pre-mRNA ทาง downstream จาก 5' cap ประมาณ 10-13 นิวคลีโอไทด์ จากนั้น mRNA ของไวรัสเริ่มการ transcription ต่อจากทางด้าน 3' end ของท่อน capped RNA ซึ่ง mRNA ของไวรัสจะถูกส่งออกไปยังไซโทพลาซึมเพื่อใช้เป็นแม่แบบในการแปลรหัส (translation) เพื่อสังเคราะห์เป็นโปรตีนของไวรัสต่อไป โปรตีน HA, NA และ M2 จะถูกส่งไปยัง endoplasmic reticulum (ER) เพื่อเติมโมเลกุลต่างๆ เช่น กระบวนการ glycosylation เป็นการเติมหมู่น้ำตาลให้กับโปรตีนภายใน Golgi apparatus กลายเป็น glycoprotein และจะถูกส่งไปยัง membrane ของ host เซลล์ ในระหว่างที่ไวรัสเกิดการ replication โปรตีน NS1 ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์จะทำการยับยั้งการสร้างโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านรวมทั้ง interferon β (IFN β) โดยการยับยั้งการเติม poly A tail ทางด้าน 3' end ของ mRNA ทำให้กระบวนการสร้าง mRNA ของเซลล์เจ้าบ้านไม่สมบูรณ์จึงไม่สามารถเกิดการสังเคราะห์โปรตีน (Lin *et al.*, 2007) ในทางตรงกันข้าม mRNA ของไวรัสนั้นไม่ต้องการกระบวนการ processing ทางด้าน 3' end ดังนั้น mRNA ของไวรัส จึงสามารถถูกส่งออกไปสังเคราะห์โปรตีนในไซโทพลาซึมได้ขณะที่การสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านจะถูกยับยั้ง (Das *et al.*, 2010) ในกระบวนการเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรมของไวรัสเพื่อสร้างอนุภาคใหม่เอนไซม์ polymerase จะทำการสังเคราะห์สาย RNA ของไวรัสโดยไม่อาศัย capped RNA-primer โดยในขั้นตอนนี้ต้องการโปรตีน NP ในการต่อสาย RNA (elongation) จากนั้นสาย vRNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่จะรวมตัวเป็น nucleocapsids เพื่อบรรจุเข้าเป็นอนุภาคไวรัสใหม่

เมื่อได้ชุดของสายพันธุกรรมครบทั้งหมดโปรตีน M1 และ NS2 จะเข้ามาจับกับสายพันธุกรรมของไวรัส (vRNA) จากนั้นอาศัยการนำพาของโปรตีน NS2 ที่สามารถจับกับโปรตีน human CRM1 เป็นตัวนำพาออกไปยังไซโทพลาซึมเพื่อประกอบเป็นอนุภาคไวรัส (assembly) ตรงบริเวณผิวเซลล์ซึ่งมีโปรตีน HA, M2 และ NA เกาะอยู่ จากนั้นอนุภาคไวรัสจะทำการ budding โดยโปรตีน NA จะทำการตัดบริเวณ sialic acid residues เพื่อลดการเกาะกลุ่มของไวรัสแล้วปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกมาจากเซลล์เจ้าบ้าน



ภาพที่ 2 แสดงวงจรชีวิตของไวรัสไข้หวัดนก

ที่มา: Das *et al.* (2010)

สายพันธุกรรมและโปรตีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A

1. สายพันธุกรรมและโปรตีน Polymerase

เอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase complex ประกอบด้วยโปรตีน Protein base (PB) 2, 1 และ Protein acid (PA) ถูกแปลรหัสมาจากสายพันธุกรรมของไวรัสตอนที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยกระบวนการถอดรหัส (transcription) เป็น mRNA และการจำลองสายพันธุกรรม (replication) เป็นสาย vRNA ของ influenza A virus จะต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase complex ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 unit นี้ไม่มีคุณสมบัติในการตรวจสอบความถูกต้อง (proof reading) ดังนั้นขั้นตอนในการจำลองสายพันธุกรรมอาจเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) มีการประมาณว่าอัตราการกลายพันธุ์ประมาณ 10^{-4} เบสต่อการจำลองสายพันธุกรรมหนึ่งรอบหรือเกิดการผิดพลาดทุกๆ 10,000 เบส (Lewis, 2006) จากการใช้เทคนิค isoelectric focusing gel พบว่า polymerase complex มีโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นต่าง 2 ชนิด คือ PB1 และ PB2 และโปรตีนที่มี

คุณสมบัติเป็นกรด คือ PA สายพันธุกรรมตอนที่ 1 (PB2) และ 2 (PB1) มีความยาว 2,341 นิวคลีโอไทด์แปลรหัสได้โปรตีนยาว 757 กรดอะมิโน และ 759 กรดอะมิโนตามลำดับ ส่วน RNA ตอนที่ 3 (PA) มีความยาว 2,233 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้โปรตีนขนาด 716 กรดอะมิโนโดยที่โปรตีน PB2 มีหน้าที่จดจำโครงสร้าง cap บน pre-mRNA ของเซลล์เจ้าบ้าน cap - binding site ของโปรตีน PB2 มีกรดอะมิโนประจวบวทที่เป็นลักษณะ sandwiched ที่ประกบกันระหว่าง aromatic residue Histidine 357 และ phenylalanine 404 กับส่วนที่จำเพาะต่อ guanine base และ Glutamine 361 และ Lysine 376 ที่จับกับ m7GMP ของสาย mRNA (Ruigrok *et al.*, 2010) นอกจากหน้าที่ในการ transcription แล้วโปรตีน PB2 ยังเกี่ยวข้องกับการ replication เพราะว่าการ mutation ในโปรตีน PB2 มีผลกระทบต่อ การ replication (Ruigrok *et al.*, 2010)

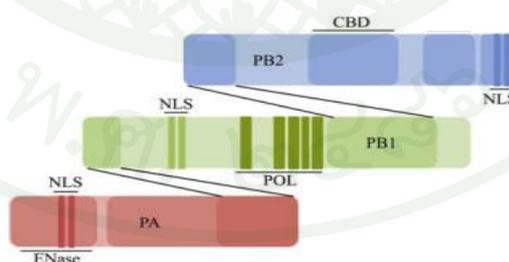
โปรตีน PB1 มีหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์มาต่อให้เป็นสายยาว (polymerization) ในขั้น elongation ซึ่งโปรตีน PB1 จะต้องจับกับปลายทั้งสองข้างของสาย RNA ที่บรรจุในอนุภาคไวรัส และ สาย RNA ที่ complementary กับจีโนม (cRNA) เพื่อเริ่มการ transcription และ replication ระหว่างการจับปลาย 3' ของ vRNA จะกระตุ้น endonuclease activity ของโปรตีน PB1 ในขั้นตอน การสร้าง capped primer ในกระบวนการสังเคราะห์ mRNA โดย catalytic domain ของ endonuclease มีตำแหน่งอยู่บริเวณกรดอะมิโนที่ 508-522 ซึ่งมีกรดอะมิโนที่สำคัญคือ E508, E519 และ D522

ส่วนโปรตีน PA ที่ถูกตัดออกบางส่วนแบ่งออกเป็น 2 domain คือส่วน N-terminal ที่มีขนาด 25 kDa และ ส่วน C-terminal ขนาด 50 kDa ทั้งสอง domain นั้นถูกแยกออกจากกันด้วย linker ที่เป็น peptide สายยาว (Liu *et al.*, 2009) ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอนแต่การเกิด mutation จะส่งผลกระทบต่อทั้งกระบวนการ transcription และ replication นอกจากนั้นยังพบว่าโปรตีน PA มี proteolytic activity โดยมีกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องคือ S624 และ T157 (Palese and Show, 2007) ส่วน N-terminal domain ของโปรตีน PA มีบริเวณที่มีโครงสร้างคล้ายเอนไซม์ nuclease 2 กลุ่มคือ type II restriction endonuclease และ PD-CD/E/XK family ของ nuclease (Dias *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009)

นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของ RNA-dependent RNA polymerase ของไวรัสอาจทำให้เกิดการติดเชื้อมสายพันธุ์ ซึ่งได้มีการทดลองโดยใช้ไวรัส A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) ซึ่งเป็น highly pathogenic avian influenza virus และมี multibasic cleavage site ในยีน HA ที่เลี้ยงผ่านไข่ไก่อย่างต่อเนื่อง จากนั้นผ่านไวรัสในปอดของหนู พบว่าไวรัสดังกล่าวกลายเป็นไวรัสก่อโรคในหนู ซึ่งพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนใน PB2

สองตำแหน่ง คือ D701N และ S714R ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ มีความเกี่ยวเนื่องกับการเพิ่มขึ้นของ polymerase activity ใน mammalian cells (Gabriel *et al.*, 2005) และมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของลำดับกรดอะมิโนใน PA และ PB2 โดยการเปลี่ยนแปลงบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ (conserve amino acid) บริเวณปลายคาร์บอกซีตำแหน่งที่สามของ PA จาก influenza A/WSN/33 แสดงให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูงที่สุดทั้งใน influenza A, B และ C โดยการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่ง H510A มีผลทำให้เกิดการยับยั้ง endonuclease cleavage ของ capped RNA การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง K539A จะทำให้ลดการจำลองตัวเองของไวรัส (downregulate replication) และการเปลี่ยนแปลงที่ R638A ทำให้การสังเคราะห์ RNA ผิดปกติและส่งผลให้การเจริญของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงช้าลง จากการศึกษาทดลองแสดงให้เห็นว่า PA มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการ transcription และ translation นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ตัดสาย RNA (endonuclease cleavage) และอาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ elongation ระหว่างการสังเคราะห์ RNA ของไวรัส (Fodor *et al.*, 2004) และการ assembly ของไวรัส (Regan *et al.*, 2006) อีกทั้งโปรตีน PA มีส่วนทำให้เกิดการสลายของ RNA polymerase 2 complex ภายในเซลล์เจ้าบ้าน โดยมี Serine ตำแหน่งที่ 624 อยู่ในบริเวณ active site (Hara *et al.*, 2001) ที่ทำให้เกิด proteolytic activity อีกทั้งยังมีการรายงานของ Huarte และคณะ (2003) โดยทำการ mutation โปรตีน PA ที่ตำแหน่ง T157A พบว่าโปรตีนสูญเสีย proteolytic activity และทำให้ polymerase สังเคราะห์ cRNA ได้น้อยลง

ลักษณะการจับของ polymerase complex ส่วน C-terminal ของโปรตีน PA จับกับส่วน N-terminal PB1 และส่วน C-terminal PB1 จับกับส่วน N-terminal ของโปรตีน PB2 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การจับกันของโปรตีน PA PB1 PB2 เป็น polymerase complex ซึ่งมีโครงสร้างเป็น heterotrimer แสดงส่วนที่มีหน้าที่ต่างๆ เช่น nuclear localization signal (NLS), polymerase motifs (POL) endonuclease (ENase), cap-binding domain (CBD)

ที่มา: Liu *et al.*, (2009)

จากการศึกษาโครงสร้าง N-terminal ของโปรตีน PA จากเชื้อไวรัสที่แยกได้ในช่วงต้นปี ค.ศ. 2009 เป็นส่วนที่ประกอบด้วย endonuclease และ protease activity ก่อนหน้านี้มีการรายงานว่า พบคุณสมบัติ endonuclease activity ในโปรตีน PB1 ตรงตำแหน่ง E508, E509 และ D522 นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าพบ endonuclease activity ในโปรตีน PB2 อีกด้วย (Liu *et al.*, 2009) การจับกันของโปรตีน PA และ PB1 ทำให้เกิดเป็น complex สามารถจับบริเวณ promoter ของไวรัส ซึ่งจากการศึกษา Crystal structure ของ He และคณะ (2008) บริเวณ C-terminal ของโปรตีน PA ของไวรัส A/goose/Guang dong/1/96 H5N1 บริเวณกรดอะมิโนที่ 257 ถึง 716 จับกับ PB1 ที่ ตำแหน่ง 2 ถึง 25 อีกทั้งการศึกษาของ Obayashi และคณะ (2008) ที่ศึกษาโครงสร้างโปรตีน PA จากเชื้อไวรัส A/Puerto Rico/8/1934 H5N1 พบมีตำแหน่ง 239 ถึง 716 ของโปรตีน PA กับโปรตีน PB1 ตำแหน่ง 1 ถึง 81 ส่วน N-terminal ของโปรตีน PB1 สามารถยับยั้งการ replication ของไวรัส ด้วยการขัดขวางการเกิดโครงสร้าง polymerase heterotrimer บริเวณ N-terminal ของโปรตีน PB1 และ C-terminal ของโปรตีน PA ในไวรัสไข้หวัดใหญ่ ทั้งชนิด A B และ C นั้นมีความอนุรักษ์สูง (Liu *et al.*, 2009) ในการศึกษาของ Kuo และ Krug (2009) พบว่า polymerase subunit และโปรตีน NP นั้นสามารถเกิดเป็น complex ซึ่งช่วยให้ NS1-CPSF30 complex มีความเสถียรมากขึ้นด้วย

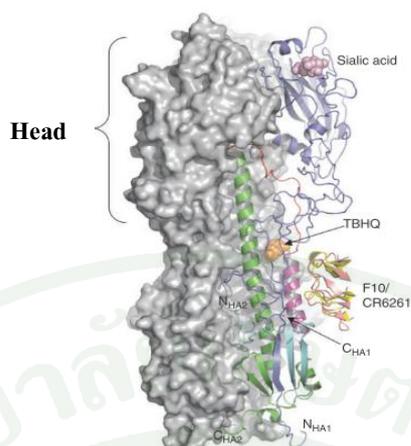
2. สายพันธุกรรมและโปรตีน Hemagglutinin

โปรตีน HA ถูกแปลรหัสจากสายพันธุกรรม ตอนที่ 4 มีความยาว 1,742-1,778 นิวคลีโอไทด์แปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่มีความยาว 562-566 กรดอะมิโน โครงสร้างของโปรตีน HA แสดงในภาพที่ 4 มีลักษณะเป็น homotrimer ที่ยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัสประมาณ 130 \AA แต่ละ monomer ประกอบด้วย HA1 ที่เป็นทรงกลม (globular) มีขนาด 319-326 กรดอะมิโน ซึ่งมีหน้าที่จับกับ receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน (receptor binding subunit) โดยส่วน globular ของโปรตีน HA ประกอบด้วยกรดอะมิโนของ HA1 ในบริเวณกรดอะมิโน 116-261 ซึ่งมีการพับของสายโพลีเปปไทด์เป็น β sheet 8 สายจัดวางตัวแบบ antiparallel แล้วม้วนพับลักษณะ jelly roll motif เป็น receptor binding site ซึ่งบริเวณนี้เป็นส่วนที่มีความอนุรักษ์สูง (highly conserve) (Isin *et al.*, 2002) ในส่วน HA2 มีความยาว 221-222 กรดอะมิโน มีลักษณะเป็นแท่งมีกรดอะมิโนลำดับที่ 1-20 บน HA2 เป็นบริเวณ hydrophobic ทำหน้าที่เป็น fusion peptide

สาย polypeptide ของโปรตีน HA ถูกสร้างใน endoplasmic reticulum (ER) ในรูป polypeptide สายเดี่ยวเรียกว่า HA0 จากนั้นโปรตีน HA จะถูกตัดให้เป็นสองส่วนคือ HA1 และ HA2 โดยทั้งสองส่วนนี้จะถูกเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ การตัด HA0 จะเกิดขึ้นที่ผิวเซลล์หรือ

เกิดขึ้นภายหลังจากที่อนุภาคไวรัสถูกสร้างและออกมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อ HA0 ของชนิดย่อย H1, H2, และ H3 สามารถถูกตัดด้วย serine protease และ tryptase Clara ที่สร้างโดย Clara cells ของ bronchiolar epithelium ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะจดจำลำดับกรดอะมิโน Q/E-X-R บริเวณ cleavage site ของ HA0 ส่วน HA ของชนิดย่อย H5 และ H7 นั้น HA1 และ HA2 จะถูกกันด้วย polybasic sequence ซึ่งในกรณีนี้การตัด HA0 จะเกิดขึ้นในเซลล์โดย subtilisin-like enzyme เช่น furin หรือ p6 และพบว่า R-X-R/K-R ที่เป็นจุดจดจำของเอนไซม์ furin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบมากในหลายๆ เซลล์ แทรกอยู่บริเวณ cleavage site เป็นผลให้ไวรัสสามารถติดเชื้อในเซลล์ได้หลายๆชนิดมากขึ้น หลังจาก HA0 ถูกตัด จะเกิดโครงสร้าง HA1 และ HA2 ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ที่พร้อมสำหรับการติดเชื้อครั้งต่อไป (Subbaro and Joseph, 2007) แต่ละ monomer ของ HA จะฝังตัวอยู่ที่เยื่อหุ้มอนุภาคของไวรัสโดย helical transmembrane peptide บริเวณ 27 กรดอะมิโนใกล้ปลายคาร์บอกซีของ HA2 (Isin *et al.*, 2002)

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของไกลโคโปรตีนของไวรัสจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะแอนติเจนและความรุนแรงของไวรัส ไกลโคโปรตีนที่เกี่ยวข้องคือ Hemagglutinin ถูกแปลรหัสจากสายพันธุกรรมตอนที่ 4 มีหน้าที่หลัก คือจับกับ sialic acid บนผิวเซลล์ทำให้เกิดการเกาะติด (attachment) แล้วช่วยให้อนุภาคไวรัสผ่านเข้าไปในไซโทพลาซึมของเซลล์ผ่านการเชื่อมของเยื่อหุ้มอนุภาคของไวรัสกับผนังเอนโดโซม และเกิดการปล่อย nucleocapsids ไซโทพลาซึม อีกทั้งโปรตีน HA ยังเป็นแอนติเจนหลักในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของโปรตีน HA จะทำให้ไวรัสหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน และอาจก่อให้เกิดการระบาดของโรคได้



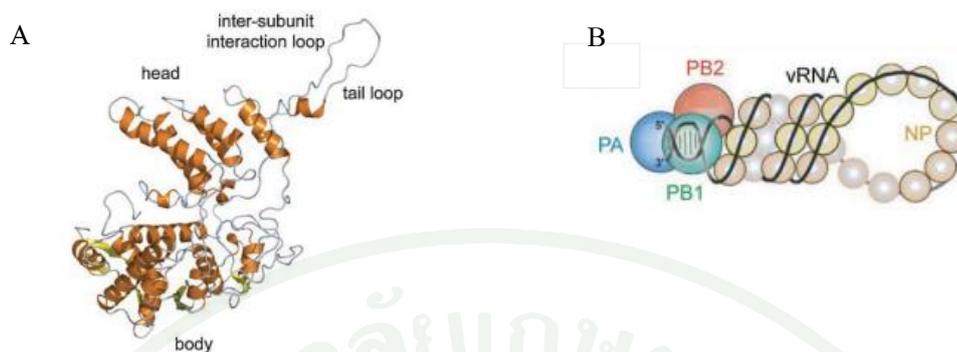
ภาพที่ 4 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน Hemagglutinin (HA)

ที่มา: Das *et al.*, (2010)

3. สายพันธุกรรมและโปรตีน Nucleoprotein

ในกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัสและการถอดรหัสเป็นโปรตีนสำหรับ influenza A virus มีโปรตีนที่สำคัญนอกจาก polymerase complex คือโปรตีน Nucleoprotein (NP) ซึ่งถูกแปลรหัสมาจากสายพันธุกรรมเส้นที่ 5 ที่มีความยาว 1,565 นิวคลีโอไทด์แปลรหัสได้โปรตีนที่มีความยาว 498 กรดอะมิโน เมื่อโปรตีน NP ถูกสังเคราะห์ในไซโทพลาซึมจะถูกส่งกลับเขามาขั้วนิวเคลียสเพื่อรวมกับสาย RNA กลายเป็น Ribonucleoprotein (RNP) Complex (ภาพที่ 5) พบว่าทั้งสาย vRNA ที่เป็นสายลบ และสายแม่แบบสายบวก (cRNA) ของไวรัสจะจับกับโปรตีน NP ซึ่งโปรตีน NP เป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส โดยจะเกี่ยวข้องกับกลไกการเปลี่ยนจากกระบวนการสังเคราะห์ RNA (transcription) ไปเป็นการจำลองตัวเอง (replication) และพบว่าการจำลองตัวเองของไวรัสจะไม่เกิดขึ้นถ้าขาดโปรตีน NP (Biswas *et al.*, 1998; Porrela and Digard, 2002) โปรตีน NP ยังมีส่วนของ nuclear localization signal (NLS) ซึ่งอยู่บริเวณกรดอะมิโนที่ 327-345 และ RNA binding domain ซึ่งโปรตีน NP จะผ่านเข้าไปในนิวเคลียสโดยอาศัย NLS แล้ว

หลังจากการ translation โปรตีน NP จะรวมตัวกับสาย RNA และเอนไซม์ polymerase complex (PA, PB1 และ PB2) กลายเป็น RNP-complex จากนั้นจะจับกับ matrix protein (M1) และถูกส่งออกไปยังไซโทพลาซึม ใน influenza virus หลายๆสายพันธุ์อื่น NP มีความอนุรักษ์สูง และไม่ค่อยพบการ mutation



ภาพที่ 5 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน Nucleoprotein (NP) (A) และ Schematic diagram ของ Ribonucleoprotein (RNP) Complex (B)

ที่มา: Ruigrok *et al.*, (2010)

สายพันธุกรรมและโปรตีน Neuraminidase

Neuraminidase (NA) เป็นไกลโคโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่อยู่บนอนุภาคไวรัสถูกสังเคราะห์มาจากสายพันธุกรรมเส้นที่ 6 มีความยาว 1,413 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้โปรตีนมีความยาว 454 กรดอะมิโน โปรตีน NA มีรูปร่างคล้ายเห็ด (mushroom-shaped) เป็น tetrameric protein ในส่วนปลายของแต่ละ monomer มีรูปร่างคล้ายใบพัด 6 อัน (ภาพที่ 6) ซึ่งส่วนปลายดังกล่าวจะเชื่อมกับส่วนก้านที่ประกอบด้วย membrane-spanning domain โปรตีน NA มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้างอนุภาคไวรัสใหม่ โดยมีหน้าที่ตัด sialic acid ออกจาก โปรตีน HA ในขั้นตอนการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์และป้องกันการเกาะติดระหว่างโปรตีน HA ของอนุภาคไวรัสใหม่กับ sialic acid ของเซลล์เดิม ซึ่งถ้าหาก โปรตีน NA ทำงานอย่างไม่มีประสิทธิภาพจะเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคไวรัสใหม่บริเวณผิวเซลล์ พบว่ามีกรดอะมิโน 8 ตัวที่เป็น catalytic residue ที่เกี่ยวข้องกับการจับกับ substrate โดยตรง ได้แก่ R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371, และ Y406 และมีกรดอะมิโน 11 ตัว ที่เกี่ยวข้องกับการเสถียรภาพโครงสร้างของ active site ได้แก่ E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, E277, N294 และ E425 (Ferraris and Lina, 2008; Richard *et al.*, 2008)



ภาพที่ 6 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน Neuraminidase (NA) (pdb: 2HTR)

ที่มา: Protein data bank (2006)

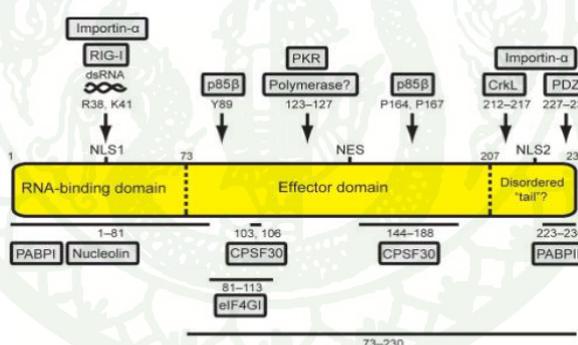
สายพันธุกรรมและโปรตีน Matrix และ M2

โปรตีน Matrix (M) ถูกแปลรหัสจากสาย vRNA ท่อนที่ 7 โดยโปรตีน M1 จะถูกถอดรหัสเป็น mRNA ทั้งสาย ส่วนโปรตีน M2 เกิดจากการ spliced ของ mRNA โดยโปรตีน M1 จะอยู่ด้านในของผิวเชื้อหุ้มไวรัสและสั่มผัส RNP ซึ่งอยู่ด้านในโปรตีน M1 มีส่วนเกี่ยวข้องในหลายขั้นตอนระหว่างการ replication ของไวรัส ในช่วงแรกของการติดเชื้อไวรัสจะต้องเกิดการแยกออกจากกันระหว่าง M1 และ RNP เพื่อให้ RNP สามารถออกไปสู่ไซโทพลาซึมได้ กลไกที่ทำให้โปรตีน M1 และ RNP หลุดออกจากกันจะถูกควบคุมโดยความเป็นกรดในอนุภาคไวรัส โดยการทำงานของโปรตีน M2 ที่นำไฮโดรเจนไอออนเข้าไปในอนุภาค โปรตีน M1 ถูกสร้างในไซโทพลาซึมและจะเข้ามาจับนิวเคลียสเพื่อรวมตัวกับ RNP มีการศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีน M1 และ RNP พบว่ามี 2 domain บนโปรตีน M1 ที่มีความเกี่ยวข้องกับการจับ RNP กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 148-162 เป็น domain แรกประกอบด้วย Zinc-finger motif อีก domain อยู่ในตำแหน่ง 101-105 (Liu and Ye, 2004) ในการศึกษาของ Ye และคณะ (1999) ได้ทำการ mutation ทั้งสองบริเวณนี้และใช้เทคนิค reverse genetics สร้างไวรัสที่มีสายพันธุกรรม mutation ในสายพันธุกรรมโปรตีน M1 และ M2 พบว่าไม่เกิดการสร้างไวรัสถ้ามี deletion 5 หรือ 10 กรดอะมิโน ที่บริเวณปลายคาร์บอกซีของโปรตีน M2 แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งทั้งสองมีความสำคัญมาก ซึ่งยังไม่ทราบเหตุผลที่แน่ชัดว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส แต่เหตุผลที่น่าเป็นไปได้ คือ การเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้ specific signal ของการจับโปรตีน M2 และโปรตีนอื่นๆ ถูกทำลายไป (จุฑารัตน์, 2551) การจับกันระหว่างโปรตีน M1 และ RNP เกิดจากแรงของพันธะ ionic และ

hydrophobic ทำให้มีการสันนิษฐานว่าการรวมตัวกันระหว่างโปรตีน M1 และ RNP เกิดจาก interaction 2 แบบ คือ protein-protein interaction และ RNA-protein interaction

สายพันธุกรรมและโปรตีน Nonstructural

โปรตีน nonstructural 1 (NS1) ของไวรัสไข้หวัดนกถูกสังเคราะห์จากสายพันธุกรรมตอนที่ 8 ที่มีขนาด 890 คู่เบส ซึ่งยีน NS มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน 2 ชนิดคือ โปรตีน NS1 และ NS2 (NEP) โดยขบวนการ alternative splicing และมีความยาวของกรดอะมิโน 230 และ 121 กรดอะมิโนตามลำดับ ภาพที่ 7 แสดงแผนผังตำแหน่งกรดอะมิโนบนโปรตีน NS1 ที่สามารถเกิด interaction กับโมเลกุลต่างๆ โดยมีบริเวณ nuclear localization sequences 2 ตำแหน่ง (NLS1 และ NLS2) และ nuclear export sequence (NES) 1 ตำแหน่ง มีตำแหน่งที่จับกับ dsRNA คือ Arginine 38 และ Lysine 41 ที่ยับยั้งการทำงานของ OAS/RNaseL, PKR และ RIG-I อีกทั้งยังมีตำแหน่งที่จับกับ poly(A)-binding protein II (PABPII), heterodimeric lipid kinase (p85 β), importin- α , eIF4GI, PKR, CPSF30, PDZ domain และ viral polymerase



ภาพที่ 7 แผนผังตำแหน่งกรดอะมิโนบนโปรตีน NS1 ที่เกิดปฏิกิริยากับ โมเลกุลต่างๆ

ที่มา: Hale *et al.*, (2008)

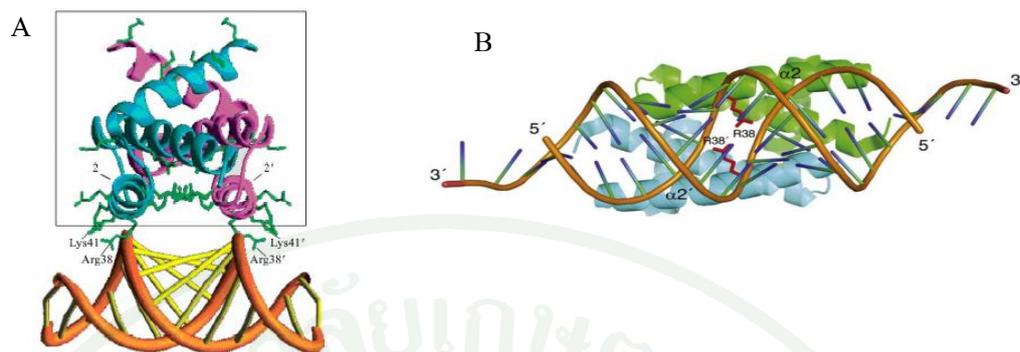
โปรตีน NS1

โครงสร้างสามมิติของโปรตีน NS1

โปรตีน NS1 มีความยาว 230 กรดอะมิโน และมีขนาด 26 kDa โปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนกมีโครงสร้างเป็น dimer (ภาพที่ 8) และมีหลายหน้าที่ในการยับยั้งการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านไวรัสของเซลล์เจ้าบ้าน โปรตีน NS1 ประกอบด้วย 2 domain คือส่วนของ N-terminal เป็นส่วนของ RNA binding domain (RBD) (กรดอะมิโน 1-73) จับกับ RNA สายคู่ (dsRNA) ที่ไม่จำเพาะรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ และ C-terminal ที่เป็นส่วน effector domain (ED) (กรดอะมิโน 74-230/237) จับกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ transcription และ translation ของเซลล์เจ้าบ้าน (Bornholdt and Prasad, 2006)

มีการศึกษาโครงสร้าง N-terminal (ตำแหน่ง 1-73) ของโปรตีน NS1 ของ influenza virus A/Udorn/307/72 ด้วยเทคนิค X-ray crystallography (Liu *et al*, 1997) และ Nuclear magnetic resonance (NMR) (Chien *et al.*, 2004) พบว่ามีโครงสร้างสายเปปไทด์สองสายจับกันเป็น dimer (symmetric homodimer) มีทั้งหมด 6 α -helix ในแต่ละสายประกอบด้วย 3 helix ตำแหน่ง Asparagine 4 ถึง Aspartate 24 เป็น α -helix ที่ 1, Proline 31 ถึง Leucine 50 เป็น α -helix ที่ 2 และ Isoleucine 54 ถึง Lysine 70 เป็น helix ที่ 3 โดยลักษณะการจัดวางตัวของ helix ที่ 2 ทั้งสองสาย ($\alpha 2$ และ $\alpha 2'$) มีทิศทางที่สวนทางกัน (antiparallel) ซึ่งจากการทดลองของ Wang และคณะ (1999) แสดงว่ามีกรดอะมิโน Arginine 38 และ Lysine 41 บน helix ที่ 2 นั้นเกิดพันธะ H-bond กับ phosphodiester backbone ของ dsRNA และได้มีการทดลองของ Min และ Krug (2006) ที่ทำการ mutant โปรตีน NS1 ที่ตำแหน่ง Arginine 38 เปลี่ยนเป็น Alanine จะทำให้ไวรัสอ่อนแอลง (attenuated)

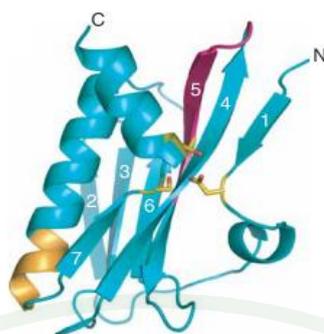
การทดลองในการจับระหว่าง RBD_NS1 กับ dsRNA ด้วยเทคนิค gel filtration พบว่า RBD_NS1 จะจับกับสาย dsRNA ที่มีความยาว 16 คู่เบสในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งรูปแบบของ dsRNA ที่จับกับ RBD_NS1 มีลักษณะโครงสร้างเป็น A-form มีการจัดวางส่วน major groove บริเวณผิวที่เป็น hydrophilic บนส่วน RBD_NS1 (Yin *et al.*, 2007) แสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งบริเวณที่เกิดการ interaction จะมีร่อง (groove) ตรงกลางโปรตีน RBD_NS1 ที่อาจจะเป็นเป้าหมายของสารประกอบ (chemical compound) ในการออกแบบยาต้านไวรัสเพื่อยับยั้งการจับกับ dsRNA (Krug and Aramini, 2009)



ภาพที่ 8 RNA binding domain ของโปรตีน NS1 ที่สร้างพันธะจับกับ phosphodiester backbone ของ dsRNA (A) กรดอะมิโน Arginine 38 และ Lysine 41 บนส่วน RBD_NS1 จับกับ dsRNA (B) การวางตัวของ dsRNA ที่เกิด interaction บริเวณรอบร่อง (groove) บนโปรตีน RBD_NS1

ที่มา: Chien *et al.*, (2004)

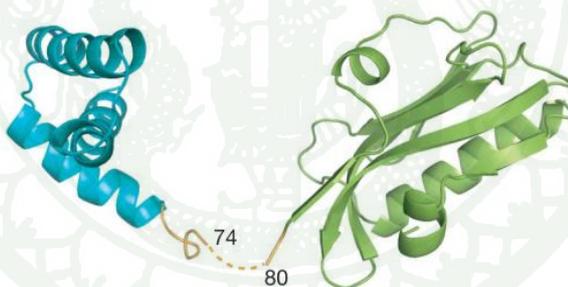
ในส่วน C-terminal ที่เป็น effector domain (ED) Bornholdt and Prasad (2006) ได้รายงานโครงสร้างสามมิติ (X-ray crystal structure) ของ ED_NS1 ภายในสายมี 7 β -sheet และ 3 α -helix แสดงดังภาพที่ 9 มีตำแหน่งที่สามารถจับกับ cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) อยู่บริเวณ Gly-Leu-Glu-Trp-Asn บนสาย α -helix สายหลัก โดยกรดอะมิโน tryptophan 187 จะอยู่บริเวณ hydrophobic pocket ที่เกิดพันธะระหว่าง dimer ซึ่งสามารถจับกับ CPSF ด้วยแรง hydrophobic interaction ED_NS1 dimer นั้นสามารถจับกับ CPSF 2 subunit นอกจากนั้น โปรตีน ED-NS1 ยังมีบริเวณที่จับกับ eIF4 บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 81-113 และ PABPII ตำแหน่งที่ 223-230 (Hale *et al.*, 2008)



ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างสามมิติส่วน effector domain (ED) ของโปรตีน NS1

ที่มา: Bornholdt and Prasad (2006)

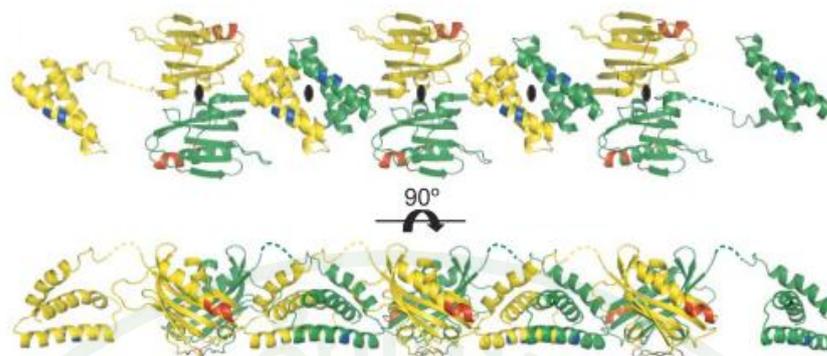
ต่อมา Barnholdt and Prasad (2008) ได้รายงาน X-ray crystal structure โปรตีน NS1 เต็มสายของไวรัสไข้หวัดนก A/Vietnam/1203/2004 H5N1 แสดงดังภาพที่ 10 ที่แสดงส่วนของ RBD และ ED ที่ต่อเชื่อมกันโดยมีตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 75-79 เป็นส่วนเชื่อม (linker) ระหว่างสอง domain



ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างสามมิติโปรตีน NS1 เต็มสายทั้งส่วน RBD และ ED

ที่มา: Bornholdt and Prasad (2008)

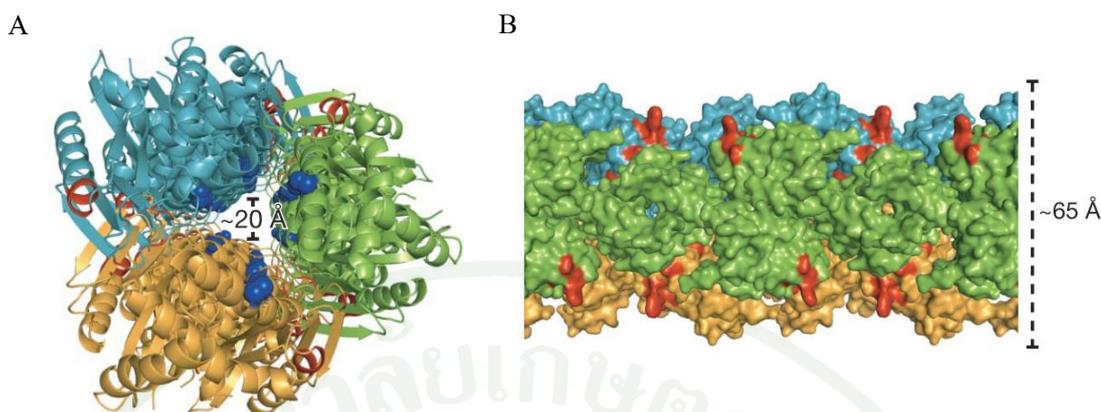
จากโครงสร้าง crystal structure ของโปรตีน NS1 เต็มสายจากไวรัสไข้หวัดนก A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) มีการจับกันเป็น dimer ต่อกันเป็นสายยาว (Bornholdt and Prasad, 2008) ระหว่างสายของโปรตีน โดย RBD ของโปรตีน NS1 จะเกิด dimer กับ RBD ของ NS1 อีกสายหนึ่ง ส่วน ED ก็จะเกิด dimer ต่อกับ NS1 อีกสายหนึ่ง แสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างสามมิติโปรตีน NS1 ที่เกิด oligomerize ต่อเนื่องกันเป็นสายยาว

ที่มา: Bornholdt and Prasad (2008)

จากภาพสายของโปรตีนที่เป็นสี่เหลี่ยมตรงส่วน RBD จะเกิด dimer กับ RBD ของอีกสายหนึ่งที่เป็นสี่เหลี่ยม และเกิดลักษณะ Oligomerize ต่อเนื่องกันเป็นสายยาว ภายในจะแสดงแถบสีบริเวณที่โปรตีนเกิด interaction กับ โมเลกุลอื่น ในส่วน RBD แถบสีน้ำเงิน แสดงส่วนที่เกิดการจับกับ dsRNA คือ ตำแหน่งที่ 38 และ 41 สำหรับ ED แถบสีแดง เป็นตำแหน่งที่จับกับ CPSF30 คือ ตำแหน่งที่ 183-187 ในการเกิด dimer ระหว่าง ED ของสายโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 เกิดจากแรง electrostatic ที่มีพันธะต่างๆดังนี้ คือ เกิด Salt bridge ระหว่าง K131 และ E97, พันธะ hydrogen-bond ที่เกิดจาก T91 กับ B193, E196 กับ R200 และ E152 กับ amide group ของ L95 และ back bone hydrogen bond ระหว่าง amide group ของ E96 กับ carbonyl group ของ E152 ซึ่งแตกต่างจากการเกิด dimer ระหว่าง ED บนโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 ที่เกิดจากแรง hydrophobic โดยมีตำแหน่ง กรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง คือ V90, V136 และ L141 ที่อยู่ภายในสาย β -sheet ที่จัดเรียงในทิศตรงกันข้ามกันภายใน ED ของโปรตีน NS1 จากไวรัส H1N1 (Bornholdt and Prasad, 2006) ผลจากการวิเคราะห์โครงสร้าง crystal structure ที่จัดเรียงกันเป็น unit cell ดังภาพที่ 12 เป็นลักษณะท่อสายยาว (tubular) ที่เกิดจากการจับกันระหว่างโปรตีน NS1 3 สายที่จัดเรียงตัวโดยหันส่วน RBD ที่จับกับ dsRNA เข้าทางด้านใน (แถบสีน้ำเงิน) ภายใน tubular มีลักษณะเป็นอุโมงค์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 Å ส่วน ED ที่จับกับ CPSF30 (แถบสีแดง) จะหันออกด้านนอก



ภาพที่ 12 แสดงโครงสร้างสามมิติโปรตีน NS1 ที่เกิด oligomerize แล้วภายใน tubular เกิดลักษณะเป็นอูโมงค์ (A) ภายในอูโมงค์ที่มีส่วน RBD (สีน้ำเงิน) ที่จับกับ dsRNA และ ส่วน ED ที่จับกับ CPSF30 (สีแดง) (B) แสดงบริเวณผิวด้านนอกของ tubular

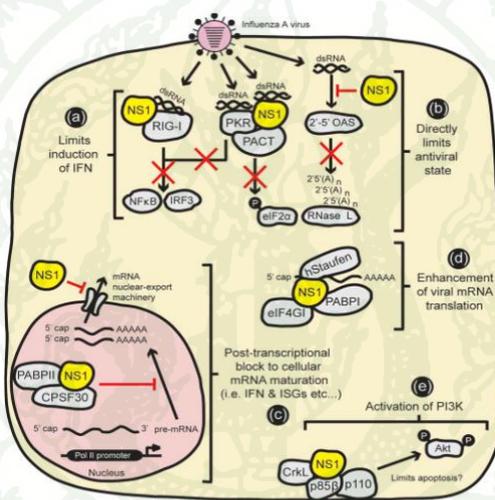
ที่มา: Bornholdt and Prasad (2008)

โครงสร้างของโปรตีน NS1 ที่เรียงต่อกันเป็นท่อลักษณะ oligomer ทำให้ NS1 สามารถจับกับ dsRNA ที่มีขนาดต่าง ๆ กันได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยระหว่างการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์จะเกิด dsRNA ที่มีขนาดน้อยกว่า 30 คู่เบส ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ (Wang and Carmichael, 2004) อีกทั้งส่วนเชื่อมต่อ (linker) ระหว่างส่วน RBD และ ED ที่มีความยืดหยุ่น (flexibility) ทำให้โครงสร้าง oligomer ของโปรตีน NS1 สามารถจับกับ dsRNA ที่มีโครงสร้างเป็นเกลียว helix ในสภาวะต่าง ๆ ได้ดีขึ้น (Bornholdt and Prasad, 2008) โปรตีน NS1 เต็มสายที่จับกันเป็น dimer เมื่อทำการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค size exclusion chromatography พบว่ามีขนาด 50 kDa

บทบาทและหน้าที่ของโปรตีน NS1

โปรตีน NS1 นั้นเป็น nonstructural protein ที่พบเป็นจำนวนมากในเซลล์ที่ติดเชื้อ โปรตีน NS1 มีหน้าที่หลากหลาย (multifunctional) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง protein และ protein และ RNA และ protein ในการยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของ host ในภาพที่ 13 ได้แสดง diagram การทำงานของโปรตีน NS1 ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยกำเนิด (innate immune response) เป็นระบบที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อจากไวรัส ซึ่งเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะมีการหลั่งสารที่เรียกว่า type I interferon (IFN) ได้แก่ IFN- α หรือ IFN- β ที่จะถูกสังเคราะห์จากเซลล์ที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสโดยมีกลุ่มยีน (gene) ที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่เรียกว่า IFN-stimulated antiviral genes (ISGs) อยู่มากกว่า 300 ยีน (Rundall และ Goodbourn, 2008) เมื่อไวรัสทำให้เซลล์ติดเชื้อจะกระตุ้นให้ transcription factor สามารถจับกับ IFN β promoter ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการ transcription ของยีน IFN β และผลิต IFN β ออกมา การเกาะจับระหว่าง IFN β กับ IFN receptor ทำให้เกิดการ ทำงานของ Jak protein kinase ซึ่ง protein kinase จะกระตุ้นให้ STAT transcription เกิดการจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับ promoter ที่ประกอบด้วย IFN-stimulated regulatory element (ISRE) ซึ่งผลที่เกิดขึ้นคือ จะมีการผลิต IFN inducible protein จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN β



ภาพที่ 13 แสดง diagram การทำงาน ของ โปรตีน NS1 ภายในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

ที่มา: Hale *et al* (2008)

จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน NS1 ในการต่อต้านการทำงานของ IFN (IFN antagonist) นั้นต่างกันตามชนิดของสายพันธุ์ไวรัส โปรตีน NS1 อาจยับยั้งการทำงานของ IFN ในขั้นตอนก่อนการ transcription (pre-transcription) ที่เกิดในนิวเคลียสหรือหลังการ transcription (post-transcriptional) ที่เกิดในไซโทพลาซึม ซึ่งมีรายงานว่าโปรตีน NS1 ของไวรัสสายพันธุ์ A/Puerto Rico/8/34 (PR8) มีคุณสมบัติ anti-IFN ในขั้นตอน pre-transcription ส่วนโปรตีน NS1 ของไวรัสชนิดอื่นมีคุณสมบัติยับยั้งในขั้นตอน post-transcription (Kochs *et al.*, 2007)

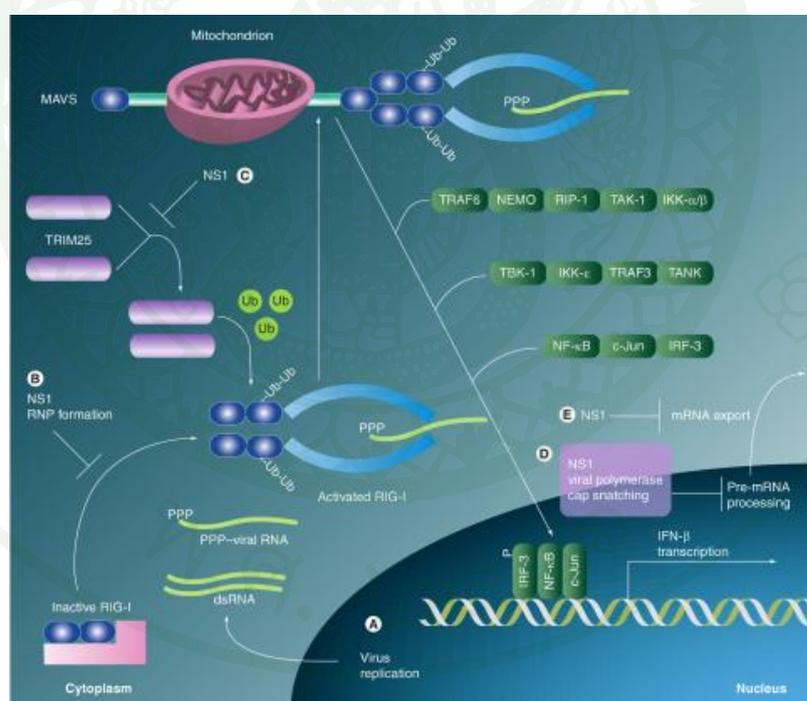
การยับยั้งการสร้าง IFN- β ในขั้นตอน pre-transcription โปรตีน NS1 สามารถจับกับ RNA สายคู่ (dsRNA) ป้องกันไม่ให้ dsRNA ไปกระตุ้น transcription factor ต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง IFN- β โดยโปรตีน NS1 จะมีกรดอะมิโน Arginine ตำแหน่งที่ 38 และ Lysine ตำแหน่งที่ 41 ที่อยู่ในส่วน RNA binding domain (RBD) เป็นส่วนที่จับกับ dsRNA ดังที่กล่าวข้างต้นเพื่อไม่ให้ dsRNA ถูกตรวจจับจากโมเลกุลที่ทำหน้าที่ตรวจจับ pathogen ในไซโทพลาซึม เช่น retinoic acid-induced gene I (RIG-I) ซึ่งโปรตีน NS1 นี้ยังสามารถจับกับ RIG-I และ dsRNA เป็น complex ขนาดใหญ่ (Guo *et al.*, 2007) จึงทำให้ RIG-I ไม่สามารถกระตุ้นสัญญาณต่อไปในระบบภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งหน้าที่ของ NS1 ในการรบกวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสามารถสรุปได้ดังนี้

1. การยับยั้งการส่งสัญญาณกระตุ้นการผลิต type I IFN

การตรวจจับ pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) หรือผลผลิตอนุภาคของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ภายในเซลล์ เช่น nucleic acid, ส่วนประกอบ cell wall ของแบคทีเรียหรือ extracellular ATP จะถูกตรวจจับโดย pattern recognition receptor (PRRs) ที่ถูกสังเคราะห์จาก germ line (Schmike and Garcia-Sastre, 2010) โดย PRR ที่ถูกสร้างมีลักษณะแตกต่างกันหลายชนิด (families) สามารถตอบสนองและมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อภายในเซลล์ทำให้เกิดกระบวนการต่างๆ ได้แก่การหลั่ง cytokine ประเภท type I และ III IFN และ chemokine เพื่อกระตุ้น effector cell เช่น antigen-presenting cell (APC) และยังเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย PRRs มีหลาย families ที่มีการรายงานได้แก่ Toll-like receptor (TLRs), nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) และ RIG-I-like receptor (RLRs) (Mogensen, 2009)

TLR ที่สังเคราะห์ขึ้นจะอยู่ทั้งบริเวณผิวเซลล์ตรง plasma membrane และภายในถุง endosome โดย TLR ที่อยู่บริเวณ plasma membrane ได้แก่ TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 และ 11 ส่วนที่อยู่ภายในถุง endosome ได้แก่ TLR3, 7, 8 และ 9 ซึ่ง TLR สามารถจับกับอนุภาคไวรัสและ ชิ้นส่วนของเซลล์แบคทีเรียได้หลายชนิดสำหรับการติดเชื้อไวรัสนั้น TLR3 มีบทบาทในการจดจำไวรัสที่มีสายพันธุกรรมแบบ RNA สายคู่ ส่วน TLR7 และ TLR8 มีการจดจำต่อ RNA สายเดี่ยว โดยที่ TLR3 จะเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้น transcription factor ในการสังเคราะห์โปรตีน IFN regulatory factor (IRF) 3, activator protein 1 (AP1) และ p50/p65 (NF κ B) ส่วน TLR7 ส่งสัญญาณกระตุ้น AP1, NF κ B, และ IRF7 โปรตีน RIG-I และ melanoma differentiation associated protein 5 (Mda-5) เป็น

โปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่มของ PRR โดย RIG-I จะถูกกระตุ้นโดย cytoplasmic single strand 5'-triphosphate RNA ในขณะที่โปรตีน Mda-5 จะจับกับ RNA สายคู่ที่มีขนาดยาว (Hornung *et al.*, 2006) ในภาพที่ 14 แสดงขั้นตอนการกระตุ้น RIG-I ในการส่งสัญญาณเพื่อสังเคราะห์ type I IFN โดย RIG-I ประกอบด้วยส่วน repressor domain (RD) 1 domain และ caspase-recruitment domain (CARD) 2 domain ในสภาวะ inactive ส่วน RD ของ RIG-I จะจัดวางเป็นแบบโครงสร้างปิดชิดกับส่วน CARD 2 domain เมื่อส่วน RD จับกับ RNA ของไวรัสจะเกิดการคลายตัวของโครงสร้าง RIG-I ทำให้เกิดการจับกันระหว่าง CARD ของ RIG-I 2 โมเลกุล (CARD-CARD interaction) ซึ่ง RIG-I 2 โมเลกุล (RIG-I complex) จะถูก Tripartite motif 25 (TRIM25) ทำการเติม Ubiquitin (Ub) ให้กับ RIG-I complex จากนั้น RIG-I complex จะเข้าไปจับกับ mitochondrial antiviral signaling adaptor (MAVS) ของ mitochondria เป็นสัญญาณกระตุ้น IRF3, IRF7 และ NF κ B ที่เป็น transcription factor ทำให้เกิดการแสดงออกของ type I IFN และ inflammatory cytokines ต่อไป (Seo *et al.*, 2002)



ภาพที่ 14 แสดงขั้นตอนการส่งสัญญาณ retinoic acid-induced gene I (RIG-I) ในการกระตุ้นการสังเคราะห์ type I IFN

ที่มา: Hale *et al.*, (2010)

เมื่อเกิดการหลั่ง type I IFN จากเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสสามารถจับกับ type I IFN receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสเช่นเดียวกันหรือเซลล์ข้างเคียง เมื่อเกิดการจับกันระหว่าง IFN กับ IFN receptor จะเกิด type I IFN signaling กระตุ้น IRF7 ที่สามารถจับกับ promoter ของ type I IFN เพื่อเพิ่มปริมาณการสร้าง IFN ต่อได้อีกด้วย อีกทั้ง IFN receptor จะส่งสัญญาณกระตุ้นบริเวณ IFN-stimulated regulatory element (ISRE) ที่เป็นบริเวณ promoter ของกลุ่มยีนที่เรียกว่า IFN-stimulated genes (ISG) แต่มีกลุ่มยีน RIG-I, Mda5, IRF7, TLR3/7 และ STAT1 ที่สำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของ type I IFN นอกจากนี้ ISG ยังรวมถึง โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ transcription และ translation ยีนของระบบภูมิคุ้มกันในเซลล์เจ้าบ้านควบคุมการเกิด apoptosis และ ตรวจจับโมเลกุลที่เป็น PAMP อีกด้วย บทบาทของโปรตีน NS1 ในการยับยั้งการกระตุ้น PRRs ให้ส่งสัญญาณในระบบ innate immune โดยโปรตีน NS1 สามารถจับกับ RIG-I และ dsRNA ทำให้ RIG-I ไม่สามารถจับกับ RNA ของไวรัส นอกจากนั้น NS1 ยังสามารถจับกับ TRIM25 จึงทำให้ TRIM25 ไม่สามารถเติม Ub ให้กับ RIG-I ได้ เมื่อ RIG-I และ TRIM25 ถูกยับยั้งไม่สามารถทำงานได้ วงจรการกระตุ้นโปรตีน IFN regulatory factor ต่างๆ จึงไม่เกิดขึ้น

2. การยับยั้งและลดการแสดงออกโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน

บทบาทของโปรตีน NS1 ที่ลดการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านโดยการรบกวนกระบวนการ splicing ของ pre-mRNA ซึ่งตามปกติในกระบวนการ splicing ของเซลล์นั้นจะมีโมเลกุลเชิงซ้อน (complex) ที่เรียกว่า spliceosome มีส่วนสำคัญในการเริ่มต้นการ splicing ซึ่งภายใน spliceosome มีองค์ประกอบของสายนิวคลีโอไทด์ที่เรียกว่า spliceosomal small nuclear (sn) RNA ซึ่งมี U6 snRNA เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาภายใน spliceosome โดย U6 snRNA มีส่วน stem bulge เป็นลักษณะ RNA สายคู่ที่สามารถจับกับส่วน RBD ของโปรตีน NS1 ทำให้เกิดการยับยั้ง spliceosome ในการ splicing ได้ (Wang and Krug, 1998) กระบวนการ maturation ของสาย IFN β mRNA ของเซลล์จะมีโปรตีน poly (A) binding protein II (PABP II) และส่วนของ 30 kDa subunit ของ cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF30) ที่ทำหน้าที่ในการ processing 3'-end โดยการเติมหมู่ poly (A) (polyadenylation) ให้กับสาย mRNA ของเซลล์ เป็นสาย mRNA ที่สมบูรณ์และสามารถขนส่งออกจากนิวเคลียสแล้วสังเคราะห์เป็นโปรตีนที่ไซโทพลาซึมได้ ซึ่งส่วนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 144 และ 184-188 ของ effector domain (ED) ของโปรตีน NS1 นั้นเป็น motif ที่มีคุณสมบัติ Zinc finger (F2F3) สามารถจับกับโปรตีน CPSF30 ได้ จึงสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CPSF30 ในการ processing บริเวณ 3'-end ของสาย pre-mRNA IFN ของเซลล์ (Twu *et al.*, 2006) มีรายงานการศึกษาการทำงานของโปรตีน NS1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สาย

พันธุ์ A/Texas/36/91 ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ของ IFN- β ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการติดเชื้อมาก่อน โดยป้องกันไม่ให้มีการ process สาย mRNA ของ IFN- β ในขั้นตอน post-transcription ที่เกิดภายในนิวเคลียสได้อย่างสมบูรณ์ (Twu *et al.*, 2007) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าในกระบวนการขนถ่าย mRNA จากนิวเคลียสออกไปยังไซโทพลาซึม (nucleo-cytoplasmic transport) mRNA ที่มีส่วนของ 3' poly (A) tail สามารถจับกับโปรตีน NS1 ได้ (Qiu and Krug, 1994) กรดอะมิโนในตำแหน่ง 215-237 ในส่วน ED ของโปรตีน NS1 ยังสามารถจับกับโปรตีน PABP II ที่มีหน้าที่เติม (elongation) หมู่ poly-A ทางด้าน 3'-end ให้กับสาย pre-mRNA ดังนั้นโปรตีน NS1 จะยับยั้งการทำงานของโปรตีน PABP II สาย pre-mRNA ของเซลล์จึงไม่สามารถถูกขนส่งออกจากนิวเคลียสได้ (Chen *et al.*, 1999) สำหรับบทบาทของโปรตีน NS1 ในการส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัสเองนั้นในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 81-113 ของโปรตีน NS1 เป็นบริเวณที่สามารถจับกับ eukaryotic initiation factor 4 GI (eIF4GI) ซึ่งเป็น subunit หนึ่งของ eIF4F cap-binding complex ที่ทำหน้าที่ในการเริ่มต้นกระบวนการ translation สร้างโปรตีนในไซโทพลาซึมของเซลล์ เมื่อโปรตีน NS1 จับกับ eIF4GI และ poly (A) binding protein I (PABP I) เกิดเป็น heterotrimeric NS1-PABP I-eIF4GI complex (Aragon *et al.*, 2000; Burgui *et al.*, 2003) ส่งเสริมการ transcription โปรตีนของไวรัส และทำให้กระบวนการ translation โปรตีนของเซลล์เข้าบ้านลดลงด้วย

3. การยับยั้งโปรตีนที่มีหน้าที่ต่อต้านไวรัสภายในเซลล์เจ้าบ้าน

เมื่อมีการสร้าง type I IFN แล้วจะทำให้เกิดวงจรในการกระตุ้นโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้อีก คือ dsRNA-dependent serine/threonine protein kinase R (PKR) และ 2', 5'-oligoadenylate synthetase (OAS) โดยโปรตีน OAS จะถูกกระตุ้นด้วย dsRNA ที่เกิดจากการจำลองสายพันธุกรรมของไวรัสระหว่างเซลล์ติดเชื้อมาก่อน โดยอาศัย ATP ซึ่งทำให้สาย 2', 5'-oligoadenylate chain เกิดการ dimerization แล้วกระตุ้นให้ RNaseL ทำการย่อยสาย RNA ของไวรัสยับยั้งไม่ให้ไวรัสเพิ่มจำนวนได้ (Silverman, 2007) เมื่อเกิดการติดเชื้อมาก่อนของ RNA binding domain (RBD) ของโปรตีน NS1 จะจับกับสาย dsRNA จึงทำให้ OAS ไม่สามารถจับกับ dsRNA แล้วกระตุ้นกระบวนการที่ยับยั้งการจำลองตัวของไวรัส นอกจากนั้น dsRNA ยังสามารถจับและกระตุ้น PKR ให้เกิดปฏิกิริยา phosphorylation กับ α -subunit ของ translation initiation factor 2 (eIF2) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตโปรตีนของเซลล์และไวรัสที่มีการติดเชื้อมาก่อน

โปรตีน PKR จะทำการเติมหมู่ phosphate (phosphorylation) ให้กับโปรตีน eIF2 ให้อยู่ในสถานะ active ที่สามารถทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ การทดลองระดับ *In vitro* แสดงให้เห็นว่าโปรตีน NS1 จะแข่งกับ PKR ในการจับ dsRNA เมื่อโปรตีน NS1 จับกับ dsRNA นั้น จะขัดขวางให้การจับระหว่าง dsRNA และ PKR เกิดขึ้นน้อยลง นอกจากนั้นโปรตีน NS1 สามารถจับกับโมเลกุลของ PKR ได้โดยตรง ซึ่งส่วนของโปรตีน NS1 บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 123-127 สามารถจับกับ PKR จึงทำให้ PKR ไม่สามารถจับกับ dsRNA และไม่เกิดกระบวนการยับยั้ง translation ของโปรตีนไวรัสได้ ซึ่งโปรตีน NS1 นั้นสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่ด้านไวรัสภายในเซลล์ 2 ชนิด คือ RNaseL ซึ่งถูกกระตุ้นให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้โดย OAS และ PKR โดยโปรตีน OAS/RNaseL และ PKR เป็นโปรตีนที่สำคัญในการยับยั้งกระบวนการ transcription และ translation ของไวรัส และการเกิด apoptosis ของเซลล์ (Garcia *et al.*, 2006)

4. การยับยั้งการเกิด apoptosis ของเซลล์

กระบวนการ apoptosis เป็นกระบวนการต่อต้านไวรัสของเซลล์ที่เกิดขึ้นเพื่อไม่ให้ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ ซึ่งในขณะที่มีกรดเชื้อไวรัสพบว่าไวรัสมีความเกี่ยวข้องกับ apoptosis แต่ยังไม่ทราบกระบวนการทั้งหมดอย่างชัดเจน ถึงแม้ว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่มีการพัฒนากลยุทธ์ต่างๆ เพื่อหลบหลีกการป้องกันจากเซลล์เจ้าบ้าน แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่า pro-apoptotic factors ของเซลล์มีส่วนช่วยให้ไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้นมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนั้นยังพบว่าโปรตีน NA และ PB1-F2 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ทำหน้าที่เป็น pro-apoptotic ได้อีกด้วย (Palese and Shaw, 2007) กลไก pro-apoptotic และ anti-apoptotic นั้นอาจเป็นกลไกที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนของไวรัส ซึ่งการที่กระบวนการ apoptotic ถูกยับยั้งในช่วงแรกของการติดเชื้อนั้นจะทำให้ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้และในขณะที่การส่งเสริมให้เกิด apoptosis ในช่วงท้ายของการติดเชื้อในเซลล์จะทำให้มีการปลดปล่อย progeny virions ออกมาภายนอก ส่วนบทบาทของโปรตีน NS1 ในการกระตุ้น apoptosis นั้นยังไม่ทราบกระบวนการอย่างชัดเจน แต่ได้มีรายงานว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ pro-apoptotic และ anti-apoptotic (Ehrhardt *et al.*, 2007) จากการทดลองให้มีการติดเชื้อไวรัส PR8 ที่มีส่วนหนึ่งของโปรตีน NS1 ขาดหายไป (deleted NS1) ในเซลล์ MDCK ซึ่งเป็นเซลล์ที่หลัง IFN ได้พบว่ามีการเกิด apoptosis มากกว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ PR8 (Zhirnov *et al.*, 2002) โปรตีน NS1 จึงทำหน้าที่ anti-apoptotic ที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งการสร้าง IFN ระหว่างการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

5. การยับยั้งการกระตุ้น adaptive immune ผ่าน DC

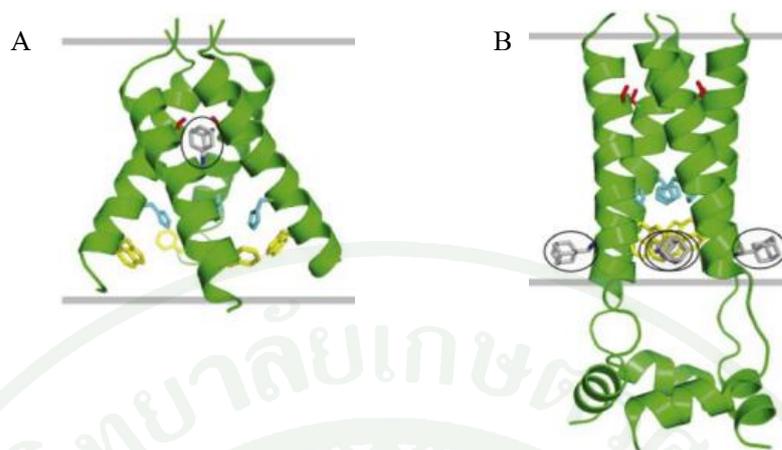
เมื่อร่างกายมีการติดเชื้อไวรัสจะถูกตรวจพบโดยเซลล์ dendritic sentinel (DCS) ซึ่ง DCS ที่จับเชื้อก่อโรคได้จะถูกกระตุ้นให้เจริญเป็น mature DC ซึ่งมีการหลั่ง cytokines และเคลื่อนที่ต่อไปยังต่อมน้ำเหลืองเพื่อทำการนำเสนอ antigen ที่จำเพาะต่อ helper T cell การตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immune จะมีความจำเพาะต่อไวรัสที่มากกระตุ้น โดยการจดจำผ่านโมเลกุลเฉพาะบนผิว T cell โดยที่ cytotoxic T-cell จะทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยตรง ในขณะที่ helper T cell จะผลิต cytokines เช่น IFN- γ และ TNF- β จากการทดลองในหนูโดยทำให้หนูติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 โปรตีน NS1 มีผลทำให้สาร cytokines และ TNF β ในไขกระดูกมีปริมาณลดลง (Hyland *et al.*, 2006) นอกจากนี้การติดเชื้อ PR8/NS1 จะมีผลต่ออินทรีย์ที่มีส่วนต่อการพัฒนาและการทำงานของ dendritic cell ซึ่ง DCS ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสจะไม่สามารถพัฒนาเป็น mature DC ที่สามารถกระตุ้น helper T cell ทำการหลั่ง IFN γ ได้ การแสดงออกของอินทรีย์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้าง DC จะมีกลุ่มอินทรีย์และกลไกการแสดงออกที่จำเพาะโดยไม่เกี่ยวข้องกับหลั่ง TNF- β (Fernandez-Sesma *et al.*, 2006) ในป้องกันติดเชื้อไวรัสนั้นต้องการการกระตุ้นซ้ำจาก memory T-cell โดยทำการนำเสนอ antigen ต่อ DC ที่อยู่ในไขกระดูก โปรตีน NS1 มีหน้าที่ยับยั้งการเจริญไปเป็น mature DC ที่สามารถช่วยกำจัดไวรัสได้ (Castiglioni *et al.*, 2008)

ยาต้านไวรัสที่มีเป้าหมายบนโปรตีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่

ยาต้านไวรัสนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อจากไวรัสไข้หวัดใหญ่เมื่อมีการระบาดเกิดขึ้น และเป็นสิ่งสำคัญในการรักษาสำหรับผู้ที่ติดเชื้อที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อน ยาต้านไวรัสต้องใช้ในการรักษาภายใน 30 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อถึงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส และยาต้านไวรัสนั้นยังสามารถเก็บเป็นคลังยาไว้ใช้ในเวลาที่เกิดการระบาดของไวรัส ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการป้องกันการกลับมาระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนก H5N1 ยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ใช้ในการรักษาอยู่ในปัจจุบันนั้นมีเป้าหมายอยู่ที่โปรตีน M2 และ neuraminidase (NA)

1. ยาด้านไวรัสที่มี M2 เป็นเป้าหมาย

ยาด้านไวรัสที่มีโปรตีน M2 เป็นเป้าหมายคือ amantadine และ rimantadine ซึ่งมีชื่อทางการค้าคือ Symmetrel และ Flumadine ตามลำดับ ลักษณะของโปรตีน M2 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 97 ตัว แล้วม้วนพับเป็นโครงสร้าง α -helix M2 helix จำนวน 4 อัน (tetramer) ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มไขมัน 2 ชั้นของไวรัสประกอบขึ้นเป็นช่องผ่านเยื่อ (channel membrane protein) ของอนุภาคไวรัส ซึ่งทำหน้าที่เป็นช่องผ่านเข้าออกของโปรตอน (H^+ -ion channel) เมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์จะมีการบีบโปรตอนเข้าไปทำให้ pH ภายในอนุภาคไวรัสต่ำลงแล้วเกิดการแตกออกของโปรตีน matrix ไวรัสจึงสามารถปลดปล่อยสารพันธุกรรมเข้าสู่ไซโทพลาซึม (uncoat) โดยมีกรดอะมิโน Histadine ตำแหน่งที่ 37 และ Tryptophane ตำแหน่งที่ 41 ทำหน้าที่ตรวจจับ pH และ H^+ ในการเข้าออก ซึ่ง amantadine จะเข้าไปยับยั้งไม่ให้โปรตีน M2 ทำหน้าที่ในการผ่านเข้าออกของ H^+ ได้ จึงไม่สามารถปลดปล่อยสารพันธุกรรมออกจากอนุภาคไวรัส ดังแสดงในภาพที่ 15 ซึ่งต่อมาในปี 2005 ถึง 2006 พบว่ามีการค้ายา amantadine ในไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล H3N2 และ H1N1 ที่ 90.5 % และ 15.5 % ตามลำดับ อีกทั้งยังมีรายงานว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัส H5N1 คือต่อยา amantadine (Puthavathana *et al.*, 2005) ซึ่งจากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน M2 ที่คือต่อยา amantadine พบว่ากรดอะมิโน Asparagine ตำแหน่งที่ 31 ได้เปลี่ยนเป็น Serine ทำให้มีผลต่อบริเวณที่เป็นเป้าหมายของยาด้านไวรัสจึงไม่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน M2 ได้ (Deyde *et al.*, 2007)



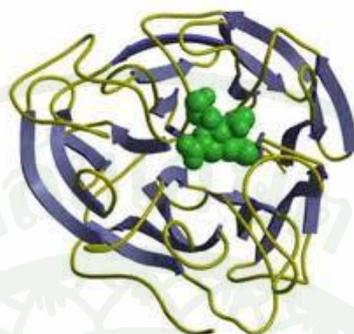
ภาพที่ 15 แสดงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน M2 ที่อยู่บริเวณ viral membrane (A) X-ray structure ของส่วน transmembrane domain (residues 22-46) ของโปรตีน M2 จำนวน 4 โมเลกุล ที่มีโครงสร้างเป็น tetramer และจับกับ amantadine 1 โมเลกุล (B) NMR structure ของส่วน transmembrane domain และ C-terminal (residues 18-60) ของ โปรตีน M2 ที่จับกับ rimantadine 4 โมเลกุล

ที่มา: Krug and Aramini (2009)

2. ยาด้านไวรัสที่มี NA เป็นเป้าหมาย

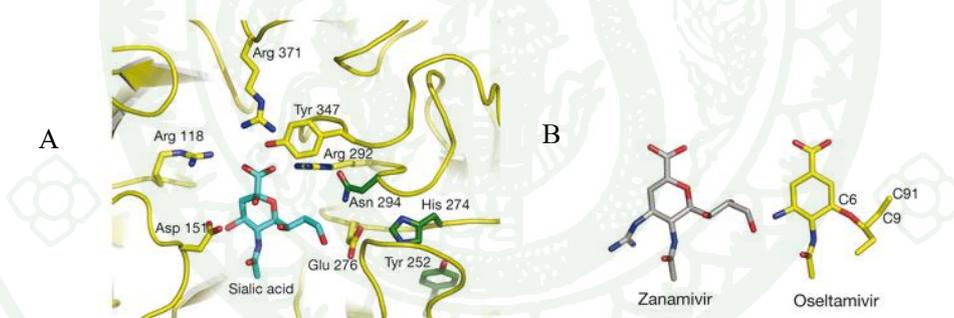
โปรตีน NA ที่ยื่นออกมาจากผิวอนุภาคไวรัสประกอบด้วย NA 4 โมเลกุล (tetramer) โดยแต่ละ monomer มีส่วนที่เป็น sialic acid binding pocket ดังแสดงในภาพที่ 16 กรดอะมิโนบริเวณนี้มีความอนุรักษ์สูงทั้งในไวรัส influenza A และ B ยาด้านไวรัสที่มีเป้าหมายต่อโปรตีน NA คือ zanamivir และ oseltamivir ซึ่งมีชื่อทางการค้า Relenza และ Tamiflu ตามลำดับ ยาด้านไวรัสทั้งสองนั้นเป็น โมเลกุลที่สามารถแย่งจับแทนที่ sialic acid ตรงบริเวณ sialic acid binding site (ภาพที่ 17) ของโปรตีน NA ต่อมามีการรายงานว่าในปี 2007 ไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้คือต่อยาด้านไวรัสทั้งสองชนิดนี้ (Lackenby *et al.*, 2008) เป็นเพราะว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้นได้มีการพัฒนาหลบหลีกการยับยั้งการเพิ่มจำนวนด้วยยาด้านไวรัส โดยการเปลี่ยนแปลง (mutation) กรดอะมิโน Histidine ตำแหน่งที่ 274 ไปเป็น Tyrosine ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้มีผลต่อการจัดวางตัวของกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 276 ตรงบริเวณ active site ทำให้ hydrophobic interaction ระหว่างโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลง และอีกทั้งยังเกิดการ mutation ของ Arginine ตำแหน่งที่ 292 ไปเป็น Lysine

ด้วยปัจจัยทั้งสองนี้จึงทำให้ยาด้านไวรัสไม่สามารถจับบริเวณ sialic acid binding pocket ของ NA ได้ และส่งผลให้เชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่เกิดการดื้อต่อยา oseltamivir และ zanamivir (ภาพที่ 18) (Das *et al.*, 2010)



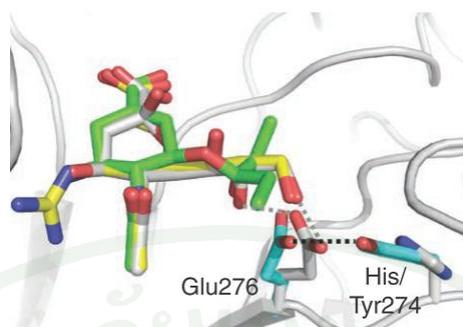
ภาพที่ 16 แสดงโครงสร้างโปรตีน neuraminidase (NA) และ sialic acid binding pocket

ที่มา: Martin (2000)



ภาพที่ 17 (A) แสดง sialic acid binding site ที่เป็นเป้าหมายของยาด้านไวรัส (B) โครงสร้างสามมิติของยาด้านไวรัส Zanamivir และ Oseltamivir ที่สามารถจับกับ sialic acid binding site

ที่มา: Collins *et al.*, (2008)



ภาพที่ 18 แสดงการเกิด mutation ของ Histadine ตำแหน่งที่ 274 ซึ่งเปลี่ยนไปเป็น Tyrosine และมีผลเปลี่ยนแปลงการวางตัวของกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่ง 276 ใน sialic acid binding site

ที่มา: Das *et al.*, (2010)

การศึกษาโครงสร้างสามมิติโปรตีนและการคัดสรร (virsaul screening) สารประกอบสำหรับค้นหา ตัวยาใหม่

เทคนิคการพัฒนาตัวยาด้านไวรัสใหม่ๆ นั้นมีหลายแนวทาง ซึ่งมีความสำคัญทางการแพทย์ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส ในการศึกษาคุณสมบัติของสารประกอบ (compound) ที่นำมาพัฒนาเป็นตัวยาในระดับโมเลกุลนั้นต้องศึกษาถึงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารประกอบว่ามีเป้าหมายต่อโมเลกุลใดและมีผลอย่างไรต่อระบบชีวภาพเมื่อนำไปใช้ในการรักษาจริง เป้าหมายของสารประกอบที่พัฒนาไปเป็นตัวยาส่วนมากจะยับยั้งโมเลกุลของโปรตีนในบริเวณที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนทำให้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติและต้องมีความจำเพาะสูง ซึ่งการที่จะทำการคัดสรรสารประกอบได้จะต้องทราบถึง โครงสร้างสามมิติ (3D structure) ของโปรตีนว่ามีรูปร่างและ active site แบบใดจึงสามารถคัดสรรสารประกอบ ได้อย่างเหมาะสม

1. การจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีน

การสร้างแบบจำลอง โครงสร้างสามมิติของ โปรตีน เป็นการทำนายโครงสร้างสามมิติจากโปรตีนต้นแบบที่มีโครงสร้างที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี x-ray crystallography และ nuclear

magnetic resonance (NMR) ซึ่งมีฐานข้อมูล Protein data base (PDB) ที่รวบรวมโครงสร้างของโปรตีนที่มีการพิสูจน์โครงสร้างแล้วและมีการรวบรวมโครงสร้างโปรตีนใหม่ตลอดเวลา

จากที่มีการรวบรวมข้อมูลทางชีวภาพเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูลของ Gen Bank (Benson *et al.*, 2009) ที่มีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์เกือบประมาณ 100 ล้านลำดับนิวคลีโอไทด์ และข้อมูลใน Protein Data Bank (PDB) ที่รวบรวมข้อมูลของโครงสร้างโปรตีนมากกว่า 55,000 โครงสร้าง (Berman *et al.*, 2000) ที่ทำให้ระบบสารสนเทศทางชีวภาพ มีข้อมูลที่เชื่อมโยงกัน อีกทั้งในปัจจุบันคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการปฏิบัติงานมีพลังความสามารถในการประมวลผลสูง จึงสามารถพัฒนาโปรแกรมที่ใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาโครงสร้างโปรตีนของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยสมมติฐาน และข้อมูลที่รวบรวมจากงานวิจัยทางชีวภาพที่มีในฐานข้อมูลต่างๆ เครือข่ายอินเทอร์เน็ตในปัจจุบันได้มีการใช้งาน และพัฒนาอย่างกว้างขวาง จึงทำให้ได้มีการพัฒนาโปรแกรม (Software) ที่ใช้สำหรับงานวิจัยทางด้านชีวภาพ ซึ่งเครือข่ายที่ใช้ในการศึกษาวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ Expasy (Gasteiger *et al.*, 2003), NCBI, EMBL-EBI, Biology WorkBench (Subramaniam, 1998) ซึ่งโปรแกรมอื่น ๆ ที่มีทางเครือข่ายอินเทอร์เน็ตได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างโปรแกรมจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่มีในเว็บไซค์

โปรแกรม	เว็บไซค์
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/
Protein Data Bank	http://www.rcsb.org
Expasy	http://ca.expasy.org/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
EMBL-EBI	http://www.ebi.ac.uk/
InterPro	http://www.ebi.ac.uk/interpro/
Swiss-Prot	http://ca.expasy.org/sprot/
UniProt	http://www.uniprot.org/
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
Pfam	http://pfam.sanger.ac.uk/
PROSITE	http://ca.expasy.org/prosite/

ตารางที่ 2 (ต่อ)

โปรแกรม	เว็บไซต์
MODELLER	http://salilab.org/modeller/
SWISS-MODEL	http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html
PredictProtein	http://www.predictprotein.org/
SSPro	http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/
Rosetta	http://rosetta.bakerlab.org/
PRINTS	http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/
PROCHECK	http://www.biochem.ucl.ac.uk/roman/procheck/procheck.html
HADDOCK	http://www.nmr.chem.uu.nl/haddock/
AMBER	http://ambermd.org/
Verify3D	http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/
GROMACS	http://www.gromacs.org/
T-Coffee	http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi
ProSA	https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php
FlexX	http://www.biosolveit.de/flexx/
TINKER	http://dasher.wustl.edu/tinker/
ClusPro	http://cluspro.bu.edu/login.php

ที่มา: Saxena *et al.*, (2009)

ในการจำลองโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนจากลำดับกรดอะมิโน ข้อมูลที่ส่วนมากที่นิยมใช้ในการค้นคว้า ได้แก่ NCBI หรือ Swiss-Prot (Bairoch *et al.*, 2004) โดยมีโปรแกรม BLAST หรือ โปรแกรม FASTA (Pearson, 1990) เป็นเครื่องมือ (tool) ใช้สำหรับเปรียบเทียบ (alignment) ลำดับกรดอะมิโนที่ต้องการศึกษาที่ใกล้เคียงหรือเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนภายในฐานข้อมูลที่มีการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่การทำงานไว้แล้วมาเป็นต้นแบบ โดยใช้สมมติฐานว่าโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันมากกว่า 40 % จะมีการม้วนพับ (folding) เป็นโครงสร้างและมีหน้าที่ในการทำงานเหมือนกัน (Davidson, 2008) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในฐานข้อมูลที่มีลำดับกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งโปรแกรมที่นิยมใช้ในการเปรียบเทียบ ได้แก่ ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) เป็นโปรแกรมที่ใช้งานสำหรับการเปรียบเทียบความเหมือนของ

ลำดับกรดอะมิโนหลายชนิด (multiple sequence alignments) ซึ่งมีค่าทางสถิติ expectation value (E-value) ที่ใช้ในการพิจารณา โดยลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลใดที่มีค่า E-value ที่ต่ำ แสดงว่าลำดับกรดอะมิโนนั้นมีความเหมือนลำดับอะมิโนโปรตีนที่ต้องการศึกษามากที่สุด การจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีนมีความสำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยโปรตีนต่าง ๆ ที่ต้องการทราบหน้าที่และบทบาททางชีวภาพ เช่น การศึกษา electrostatic ภายในโมเลกุล, การทำนาย active site หรือ binding site สำหรับ ligand หรือ small molecule ต่าง ๆ และ การศึกษาระบบตำแหน่งกรดอะมิโนที่สำคัญบนโปรตีน โดยวิธี site-directed mutagenesis เป็นต้น ซึ่งการศึกษาเหล่านี้ต้องใช้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีโครง x-ray crystal structure หรือ NMR ปรากฏในฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ

โปรแกรมที่ใช้สำหรับจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีน ได้แก่ FUGUE (Shi *et al.*, 2001) และ MODELLER (Murts-Benom *et al.*, 2000) อีกทั้งยังมีโปรแกรมทางอินเทอร์เน็ต เช่น SWISS-MODELLWE (Schwede *et al.*, 2003) ที่ใช้สำหรับสร้างโครงสร้างสามมิติของโปรตีน เมื่อได้โครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่ต้องการศึกษา ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของโครงสร้างโปรตีนที่ได้จำลองขึ้นมา (Structure validation) ด้วยการตรวจสอบ backbone distortion การจัดวางตัวของ side-chain และประจุ ภายในโครงสร้างโปรตีน ซึ่งเป็นเป็นสิ่งสำคัญในขั้นตอนสุดท้าย โปรแกรมที่ช่วยในการตรวจสอบโครงสร้าง ได้แก่ โปรแกรม PBOCHECK (Luskowski *et al.*, 1993) และ WHATIF (Vricnd, 1990) เป็นต้น

2. Molecular Docking

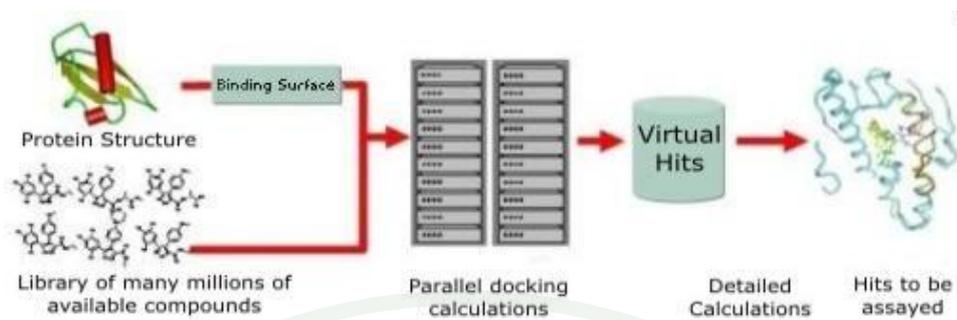
ในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนหลายๆ ชนิดในการทดลองจริงอาจทำได้ยาก ซึ่งการศึกษาการทำงาน หรือคุณสมบัติของโปรตีน เช่น ศึกษาบริเวณ active site หรือบริเวณที่เกิด interaction กับ โมเลกุลอื่น อาทิ การจับกับ โมเลกุลของยา ligands หรือ โปรตีนด้วยกัน ซึ่งการทดลองแบบ *In vitro* ที่ทดลองในหลอดทดลองนั้นอาจไม่สะดวกที่จะทดสอบสารต่างๆ ได้ครั้งละจำนวนมาก หรือจากข้อจำกัดจากสถานะต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีเทคนิคที่จำลองการเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลที่เรียกว่า Molecular Docking โดยโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณสำหรับ Docking นั้นมีหลายโปรแกรม แต่ทุกโปรแกรมจะมีส่วนประกอบพื้นฐานที่สำคัญ 2 ประการ คือ การค้นหา algorithm และ ค่าพลังงาน (energy scoring function) (Leach *et al.*, 2006) ซึ่งการคำนวณพลังงานจากการ docking เป็นการคำนวณสารประกอบในลักษณะ โครงสร้างสามมิติที่เป็น covalent structure ในการเลือกโปรแกรมที่จะใช้ในการ docking ต้องพิจารณาในงานวิจัยที่ต้องการศึกษา โดย

บางโปรแกรมจะมีระบบ และ parameter ที่อาจจำเพาะต่อประเภทของโครงสร้างโปรตีน หรือ โมเลกุลขนาดเล็ก แต่บางโปรแกรมก็สามารถใช้ได้กับโครงสร้างโปรตีนต่างๆ ไป การ docking แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ การ docking ระหว่างโปรตีนกับ compound และ โปรตีนกับโปรตีน โปรแกรม docking สำเร็จรูปที่นิยมใช้โดยทั่วไป ได้แก่ Auto Dock (Goodsell and Olson, 1990) , FlexX (Rarey *et al.*, 1995), GLIDE (Friesner *et al.*, 2004) , GOLD (Jones *et al.*, 1995), HADDOCK (Dominguez *et al.*, 2003) และ RosettaDock (Schueler-Furman *et al.*, 2005)

3. การคัดสรรเสมือนจริง (Virtual Screening)

ซึ่งเทคนิคการคัดสรรเสมือนจริง (Virtual screening) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการออกแบบยาสมัยใหม่โดยการสร้างแบบจำลองทางคอมพิวเตอร์ที่เป็นการลดขั้นตอนและเวลาในการหาสารออกฤทธิ์ที่มีจำนวนมากๆ โดยในงานวิจัยนี้ใช้โปรแกรม AutoDock 3.0.5 โดยการคำนวณค่าพลังงานด้วยคอมพิวเตอร์และทำการคัดเลือกสารออกฤทธิ์ที่สามารถ จับบน โปรตีนเป้าหมาย และทำการวิเคราะห์ค่า binding energy จากผลของการทำ molecular docking ของสารที่สามารถ binding บนเป้าหมายของโปรตีน NS1

เทคนิคการคัดสรรเสมือนจริง เป็นเทคนิคที่ใช้ในการออกแบบยาสมัยใหม่ โดยการสร้างแบบจำลองบนคอมพิวเตอร์ เพื่อศึกษาอัตรากิริยาของ โมเลกุลขนาดเล็กกับ โปรตีนเป้าหมาย แล้ววิเคราะห์ผลจากค่า binding energy ระหว่างสารประกอบกับโปรตีน ว่าสารประกอบตัวใดในฐานข้อมูลที่มีค่า binding energy ต่ำที่สุดจะเป็นสารประกอบที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนชนิดนั้นได้ดี การหาตัวยานี้ใหม่จากฐานข้อมูลสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการ docking ให้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กจับในบริเวณที่เป็น active site ของโปรตีนในการคัดสรรสารประกอบที่สามารถจับตรงเป้าหมายของโปรตีน (ภาพที่ 19) สารประกอบจะถูกจัดเป็นกลุ่มอยู่ในฐานข้อมูล เช่น Available Chemicals Directory , CheCX, Maybridge Database, Sinc และ NCI Diversity Sot (Voigt *et al.*, 2001) ซึ่งฐานข้อมูลดังกล่าวได้ถูกนำมาคัดสรรด้วยวิธีการ docking เพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีนเป้าหมาย ในการค้นหาตัวยานี้ใหม่ ๆ ด้วยวิธี High-Throughput ที่นิยมใช้ในการวิจัยของบริษัทฯ ต่าง ๆ เป็นวิธีที่ต้องใช้ต้นทุนเป็นจำนวนมาก และใช้ระยะเวลาที่มาก ซึ่งชุดของฐานข้อมูลจะมีสารประกอบ อยู่ประมาณ 1,000-100,000 โมเลกุล แต่เมื่อใช้เทคนิค Virtual screening ที่ใช้การคำนวณด้วยระบบคอมพิวเตอร์แล้ว จะทำให้ประหยัดต้นทุน และเวลาได้มากขึ้น (Saxena *et al.*, 2009)



ภาพที่ 19 แสดงกระบวนการคัดสรร Virtual screening

ที่มา: Hubbard (2011)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ใช้สำหรับเก็บตัวอย่าง
2. หลอด PCR ขนาด 0.2 ml
3. เครื่องเขย่าปรับอุณหภูมิ
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycle)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge machine)
6. เครื่องมือดูดสารละลาย (Micropipette)
7. ขวดแก้วรูปชมพู่ (E Mayer flask) ขนาด 1000 ml
8. เครื่องแยกสารพันธุกรรมและ โปริตตินด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis Systems)
9. เครื่องส่งถ่ายสารพันธุกรรมและ โปริตตินด้วยกระแสไฟฟ้า (Electroblotting)
10. เครื่องเขย่าผสมตัวอย่าง (Vertex Mixer)
11. DNA Dark reader
12. ตู้ไฟแดงสำหรับห้องมืดล้างฟิล์มเอกซเรย์
13. water bath
14. QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)
15. QIA prep Miniprep (Qiagen)
16. DIG Northern Starter Kit (Roche)
17. pGEM_T easy vectors (Promega)
18. pQE80L expression vector (Qiagen)
19. Protino® NI-IDA Resin column (Macherey - NaGel)
20. Refrigerated centrifuge
21. Cassette สำหรับประกบฟิล์มเอกซเรย์
22. ฟิล์มเอกซเรย์
23. ระบบปฏิบัติการ Linux version Fedora core 4 (RedHat) ในคอมพิวเตอร์ Pentium IV
24. โปรแกรม AutoDock 3.0.5
25. โปรแกรม PyMOL version 0.99

วิธีการ

1. การโคลนยีน NS1 เต็มสายของไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์รุนแรงชนิด H5N1

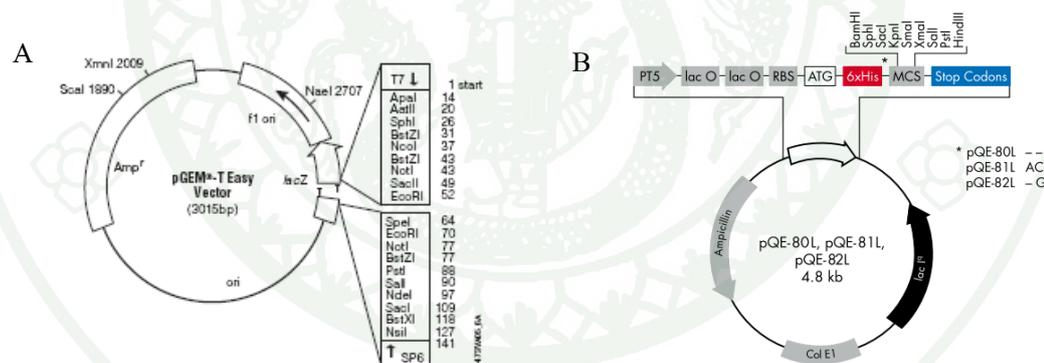
A/chicken/Thailand/KU14/2004 (Cloning of full length NS1 gene of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) A/chicken/Thailand/KU14/2004)

ทำการสกัด RNA จาก allantoic fluid ของไข่ไก่ฟักที่ถูก inoculate ด้วย HPAI H5N1 โดยใช้ Trizol reagent[®] (Invitrogen) จากนั้นทำการถอดรหัสย้อนกลับ RNA มาเป็น cDNA โดยเอนไซม์ SuperScrip III (Invitrogen) และไพรเมอร์ Uni12 (Hoffmann *et al.*, 2001) ซึ่งในปฏิกิริยา 20 μ l ประกอบด้วย RNA 9 μ l, 10 mM dNTP (Amresco), 10 mM Uni12 ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน บ่มที่ 70°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นบ่มในน้ำแข็ง 2 นาที แล้วเติมสารดังต่อไปนี้ 5XRT buffer, 0.1 M DTT, 40 U RNaseOUT, 200 U SuperScriptIII ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 50 นาที เมื่อครบเวลาแล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ 95°C เวลา 10 นาที จากนั้นเก็บ cDNA ที่ได้ไว้ใน -20°C เพื่อใช้ในเพิ่มจำนวนยีน NS1 ต่อไป

จากนั้นใช้ cDNA เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีน NS1 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน NS1 ที่ออกแบบให้มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sa*II มีลำดับเบสดังนี้ NS1-*Bam*HI_F (5'-ACT TGG ATC CGA TTC CAA CAC TGT GTC-3') และ NS1-*Sa*II_R (5'-CAG TGT CGA CTC AAA CTT CTG ACT CAA TTG-3') โดยปฏิกิริยา 50 μ l ประกอบด้วย cDNA 4 μ l, 10X buffer without MgCl₂, 25 mM MgCl₂, 10mM dNTP (Amersco), 10 pM ของ NS1-*Bam*HI_F และ NS1-*Sa*II_R, 1.75 U Tag DNA polymerase (Roche) ใช้อุณหภูมิในการเพิ่มสายพันธุ์กรรมดังนี้ 94°C 30 วินาที, 55°C 30 วินาที, 72°C 45 วินาที ตามลำดับ โดยจะทำซ้ำ 35 รอบ และต่อด้วย 72°C 7 นาที เพื่อให้ DNA polymerase ทำการต่อสาย DNA ได้อย่างสมบูรณ์

จากนั้นนำสาย PCR product มาแยกขนาดด้วย 1% อะกาโรสเจล ตัดเจลบริเวณที่มีแถบ DNA ขนาดประมาณ 650 คู่เบส มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIAEXII (Qiagen) นำ DNA ที่ได้เชื่อม (ligation) กับพลาสมิด pGEM_T easy (Promega) ซึ่งเป็น cloning vector แสดงแผนผังของพลาสมิดในภาพที่ 20 A โดยในปฏิกิริยา ligation 10 μ l นั้นประกอบด้วยชิ้นส่วน DNA ของยีน NS1 3 μ l, พลาสมิด pGEM_T easy 0.5 μ l, 2X ligation buffer (Promega) 5 μ l และ 1U T4 DNA ligase (Promega) ผสมสารละลายแล้วบ่มไว้ที่ 23°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้

ปริมาตร 5 μ l มาทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. Coli* DH5 α (NEB) คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวซึ่งเป็นโคโลนีที่ได้รับ DNA สายผสมมาคัดเลือกโดยวิธี Colony PCR screening เมื่อได้โคโลนีที่มี PCR product ที่มีขนาด 650 คู่เบส จะเลือกโคโลนีนั้นมาเลี้ยง และสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIA prep® (Qiagen) จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน NS1 พบว่าถูกต้อง จากนั้นทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *Bam*HI (Fermentas) และ *Sa*II (NEB) โดยในปฏิกิริยาการตัดจำเพาะ (Restriction reaction) 50 μ l ประกอบด้วย พลาสมิด pGEM_NS1 15 μ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI 4 μ l หรือ *Sa*II 4 μ l, 10X restriction buffer 5 μ l, จากนั้นทำการบ่มที่ 37°C 2 ชั่วโมง ทำการแยกชิ้นส่วน NS1 ที่ถูกตัดแล้วด้วย 1% agarose gel แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAEXII (Qiagen) แยกชิ้นยีน NS1 มาเชื่อมกับพลาสมิด pQE80L (Qiagen) expression vector ที่ผ่านการตัดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ซึ่งแผนผังของพลาสมิดได้แสดงไว้ ในภาพที่ 20 B พลาสมิด pQE80L ซึ่งมีส่วนของ 6XHis-tag จะเชื่อมกับโปรตีน NS1 โดยในปฏิกิริยา ligation 10 μ l ประกอบด้วย พลาสมิด pQE80L 2 μ l, ชิ้นยีน NS1 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 μ l, 5X ligation buffer 2 μ l และ T4 DNA ligase 1U (Invitrogen) บ่มที่ 23°C 2 ชั่วโมง



ภาพที่ 20 แสดงแผนผังของพลาสมิด pGEM_T easy cloning vector (A) และ พลาสมิด pQE80L expression vector (B)

จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ปริมาตร 5 μ l มาทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. Coli* DH5 α (NEB) แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวซึ่งเป็นโคโลนีที่ได้รับ DNA สายผสมมาคัดเลือกโดยวิธี Colony PCR screening คัดเลือกโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงแล้วสกัดพลาสมิดด้วย QIA prep® (Qiagen) นำพลาสมิดที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสว่าเมื่อเกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน NS1 แล้วถูกต้องจึงนำพลาสมิด pQE_NS1 ที่สกัดได้ปริมาตร 0.5 μ l มาทำการ transform เข้าสู่ *E. coli*

BL21 (DE) ที่เป็น expression host สำหรับการแสดงออกของโปรตีนต่อไป ส่วนลำดับ nucleotide ที่วิเคราะห์ได้นั้นจะทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Expasy tool (<http://expasy.org/tools/>) เพื่อทำการเปรียบเทียบกับโครงสร้างสามมิติของโปรตีน NS1 ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Protein Data Bank (PDB www.pdb.org) ต่อไป

2. การแสดงออกของโปรตีน NS1 เต็มสาย (Overexpression of full length NS1)

เมื่อได้ transformant *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด pQE_NS1 ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB-broth ปริมาตร 5 ml ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 1 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 ml ลงในอาหาร LB-broth ปริมาตร 1,000 ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมงจนเชื้อมีความเข้มข้นเพียงพอซึ่งเมื่อวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่น 600 nm จะมีค่าประมาณ 0.6 จากนั้นทำการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วยแลคโตส 0.1% w/v แล้วเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำเซลล์ที่ได้ล้างด้วย cleaning buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) 10 ml ทำการ vortex ให้เซลล์กระจายตัวในสารละลาย จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เติม lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.25 mg/ml lysozyme, 0.1% TritonX, pH 8.0) 10 ml ต่อมาทำให้เซลล์แตกเพื่อให้โปรตีน NS1 หลุดออกมาออกเซลล์ด้วยวิธี Sonication โดยใช้กำลัง 140 วัตต์ 10 วินาที หยุดพัก 5 วินาที รวมเวลาทั้งหมด 20 นาที จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการแบ่งส่วนสารละลายใส (Soluble) ออกจากส่วนที่เป็นตะกอน (inclusion) ซึ่งส่วนที่เป็นตะกอนนั้นจะละลายด้วย denaturing washing buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 8 M Urea, pH 8.0) ปริมาตร 10 ml แล้วบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อแยกตะกอนอื่นๆ ที่ไม่สามารถละลายได้ใน denaturing washing buffer และนำส่วน โปรตีนที่อยู่ในรูปสารละลาย (Soluble) และ denaturing buffer มาตรวจสอบโดยวิธีการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบว่าโปรตีน NS1 นั้นอยู่ในส่วนใด

3. การทำโปรตีน NS1 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี (Purification of full length NS1 protien using affinity chromatography)

เมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยผ่าน SDS-PAGE นั้นพบว่าโปรตีน NS1 อยู่ในสถานะที่เป็น inclusion ในการทำให้บริสุทธิ์จึงต้องทำในสถานะที่โปรตีนเสียสภาพ (denaturing protein) โดยใช้ denaturing washing buffer ที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยขั้นแรกจะทำการล้าง Protino[®] Ni-IAD Resin 1 กรัม ลงใน Protino[®] column และปรับสถานะในคอลัมน์ให้มีค่า pH 8.0 ด้วย denaturing washing buffer pH 8.0 ปริมาตร 10 ml โดยให้บัฟเฟอร์ไหลผ่านคอลัมน์ด้วยแรงโน้มถ่วง (Gravity flow) จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายโปรตีน NS1 ที่ละลายใน denaturing washing buffer ให้สารละลายไหลผ่านคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย denaturing washing buffer ปริมาตร 10 ml เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไป ขั้นต่อมาทำการชะล้างด้วย denaturing elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 8 M Urea, 100 mM Imidazole, pH 8.0) ที่มี 100 mM Imidazole ปริมาตร 8 ml โดยทำการแบ่งเก็บสารละลายจากคอลัมน์เป็น 4 ช่วง (fraction) ช่วงละ 2 ml ต่อมาทำการล้างด้วย denaturing washing buffer อีก 10 ml แล้วทำการชะโปรตีนออกด้วย denaturing elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 8 M Urea, 250 mM imidazole, pH 8.0) ที่มี 250 mM imidazole 8 ml แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาเป็น 4 ช่วง ช่วงละ 2 ml จากนั้นนำสารละลายทั้ง 4 ช่วงมารวมกันใส่ใน Centricon (Amicon) ที่มีแผ่นกรองซึ่งมีค่า cut off ขนาด 10 kDa แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 rpm จนสารละลายเหลือปริมาณ 1 ml จากนั้นกำจัด imidazole ออกโดยเติม denaturing washing buffer ลงไปในสารละลายโปรตีนปริมาณ 6 ml แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 rpm จนสารละลายเหลือปริมาณ 1 ml ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง จนสารละลายโปรตีนเหลือ 2 ml นำตัวอย่างสารละลายจากคอลัมน์ที่เก็บได้มาทำการแยกด้วย SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ต่อไป

4. การโคลนยีนส่วน RNA binding domain (RBD) ของโปรตีน NS1 (Cloning of RBD_NS1)

จากการแสดงออกของโปรตีน NS1 เต็มสาย (full length) นั้นโปรตีนจะอยู่ในสถานะ inclusion ที่ต้องละลายด้วย denaturing washing buffer ซึ่งลักษณะการม้วนพับ (folding) ของโปรตีนนั้นจะอยู่ในสถานะที่เสียสภาพทางธรรมชาติ ไม่สามารถนำมาทดสอบการทำงาน (function) ได้ จึงทำการโคลนส่วน RNA binding domain (RBD) (Chien *et al.*, 2004) ของโปรตีน NS1 ที่มีโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เป็นแบบ α -helix ที่มีความยาวของกรดอะมิโน 72 ตัว ซึ่งเมื่อทำการแสดงออกของโปรตีนแล้วโปรตีนอาจอยู่ในสถานะธรรมชาติที่อยู่ในลักษณะของสารละลายได้ ซึ่งการโคลนยีน RBD_NS1 นั้นจะใช้ไพรเมอร์ NS1-BamHI_F (5'-ACT TGG ATC

CGA TTC CAA CAC TGT GTC-3') และ RBD_NS1-SalI_R (5'-ATA TGT CGA CTT AAG ACT CCT CCT CCA G-3') ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนจากพลาสมิด pGEM_NS1 ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งตำแหน่งของไพรเมอร์จะครอบคลุมนิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 216 ของ NS1 ORF โดยในปฏิกิริยา 150 μ l ประกอบด้วย pGEM_NS1 (เจือจาง 1:100) 6 μ l ที่ใช้เป็น DNA แม่แบบ, 10X high fidelity buffer 15 μ l, 50 mM MgSO₄ 6 μ l, 10 mM dNTP (Amersco) 3 μ l, 10 pM primers NS1-BamHI_F และ RBD_NS1-SalI_R ตัวอย่างละ 6 μ l, Platinum Tag DNA polymerase (Invitrogen) 1.2 μ l ใช้อุณหภูมิในการเพิ่มสายพันธุกรรมดังนี้ 94°C 2 นาที เพื่อทำการแยกสาย DNA อย่างสมบูรณ์ จากนั้นบ่มที่ 94°C 30 วินาที, 55°C 30 วินาที และ 68°C 45 วินาที ตามลำดับ โดยจะทำซ้ำ 35 รอบ และต่อด้วย 68°C 7 นาที เพื่อให้ Platinum DNA polymerase ทำการต่อสาย DNA ได้อย่างสมบูรณ์

จากนั้นนำสาย PCR product มาแยกขนาดด้วย 1% อะกาโรสเจล แล้วตัดเจลบริเวณที่มีแถบ DNA ขนาดประมาณ 219 คู่เบส มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIAEX II (Qiagen) แล้วนำ DNA ที่ได้มาตัดปลายทั้งสองข้างด้วยเอนไซม์จำเพาะ BamHI (Fermentas) และ SalI (NEB) ก่อนที่จะนำมาเชื่อมต่อ (ligation) กับพลาสมิด โดยในปฏิกิริยาการตัดจำเพาะ (Restriction reaction) 100 μ l ประกอบด้วยชิ้นส่วน RBD-NS1 DNA 25 μ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ SalI อย่างละ 6 μ l, 10X restriction buffer 10 μ l, ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 37°C 2 ชั่วโมง กำจัดเศษนิวคลีโอไทด์จากการตัดด้วยเอนไซม์ด้วยการแยก DNA ผ่าน 1% อะกาโรสเจล แล้วตัดเจลบริเวณที่มีแถบ DNA ขนาดประมาณ 219 คู่เบส มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIAEX II (Qiagen) จากนั้นนำชิ้นส่วน RBD_NS1 มาเชื่อมกับพลาสมิด pQE80L (Qiagen) expression vector ที่ผ่านการตัดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ที่มีส่วนของ 6xHis-tag ที่เชื่อมกับโปรตีน RBD_NS1 โดยในปฏิกิริยา ligation 10 μ l ประกอบด้วย พลาสมิด pQE80L 2 μ l, ชิ้นส่วน NS1 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 μ l, 5X ligation buffer 2 μ l และ T4 DNA ligase 1U (Invitrogen) บ่มที่ 23°C 2 ชั่วโมง

จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ปริมาตร 5 μ l มาทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. Coli* DH5 α (NEB) แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวซึ่งเป็นโคโลนีที่ได้รับ DNA สายผสมโดยวิธี Colony PCR screening เลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกมาเลี้ยงใน LB broth ที่มี Ampicilin สกัดพลาสมิดด้วย QIA prep® (Qiagen) แล้วนำพลาสมิดที่ได้ส่งไปหาลำดับเบส ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและการแปลรหัสเป็นโปรตีน NS1 เมื่อได้โคลนที่มีลำดับเบสและกรดอะมิโนถูกต้องจึงนำพลาสมิด pQE_NS1 ที่สกัดได้ปริมาตร 0.5 μ l มาทำการ transform เข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE) ที่เป็น expression host สำหรับการแสดงออกของโปรตีนต่อไป

5. การแสดงออกของโปรตีน RBD_NS1 (Overexpression of RBD_NS1)

เมื่อได้ transformant *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด pQE_RBD_NS1 จะทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB-broth ปริมาตร 5 ml ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาตร 10 μl ลงในอาหาร LB-broth ปริมาตร 10 ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมงจนเชื้อมีความเข้มข้นเพียงพอ เมื่อวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ยาวคลื่น 600 nm จะมีค่าประมาณ 0.6 จากนั้นทดสอบการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วยสารกระตุ้น 2 ชนิดคือ IPTG ที่ความเข้มข้น 0.2 mM และ 1 mM แลคโตส ที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.3% โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบว่าโปรตีน RBD_NS1 นั้นสามารถถูกเหนี่ยวนำได้ในสภาวะใด จากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำเซลล์ที่ได้ล้างด้วย cleaning buffer 5 ml ทำการ vortex ให้เซลล์กระจายตัวในสารละลาย จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ต่อมาทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ 10 μl ผสมน้ำกลั่น 10 μl และผสม 2X Laemmli loading dye (BioRad) แล้วต้มตัวอย่าง ในน้ำเดือด 10 นาที นำตัวอย่างที่ต้มแล้วปริมาตร 10 μl หยดใส่ช่องตัวอย่างใน SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน จากนั้นทำให้เซลล์เกิดการแตกเพื่อให้โปรตีน RBD_NS1 หลุดออกมานอกเซลล์ด้วยการ sonication โดยใช้กำลัง 140 วัตต์ 10 วินาที หยุดพัก 5 วินาที รวมเวลาทั้งหมด 20 นาที จากนั้นนำสารละลายปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ทำการแบ่งส่วนสารละลายใส (soluble) ออกจากส่วนที่เป็นตะกอน (pellet) ซึ่งส่วนที่เป็นตะกอนนั้นจะละลายด้วย denaturing washing buffer pH 8.0 ปริมาตร 10 ml แล้วบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อแยกตะกอนอื่นๆ ที่ไม่สามารถละลายได้ใน denaturing washing buffer ออก และนำส่วนโปรตีนที่อยู่ในรูปสารละลาย (soluble) และที่ละลายใน denaturing buffer มาตรวจสอบโดยวิธีการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบว่าโปรตีน RBD_NS1 นั้นอยู่ในส่วนใด

6. การทำโปรตีน RBD_NS1 ให้บริสุทธิ์ด้วยแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (Purification of RBD_NS1 protein using affinity chromatography)

เมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยผ่าน SDS-PAGE นั้นพบว่าโปรตีน RBD_NS1 อยู่ในสภาวะที่ละลายได้ (Soluble) จึงทำให้บริสุทธิ์ในสภาพโปรตีนธรรมชาติ (native) ขั้นแรกจะทำการซั่ง Protino® Ni-IAD Resin (Macherey-NaGel) 1 กรัม ลงใน Protino® column (Macherey-

NaGel) และปรับสภาวะในคอลัมน์ให้มีความ pH 8.0 ด้วย native washing buffer pH 8.0 ปริมาตร 10 ml โดยให้บัฟเฟอร์ไหลผ่านคอลัมน์ด้วยแรงโน้มถ่วง (Gravity flow) จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายโปรตีน RBD_NS1 ที่ละลายใน native washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) แล้วให้สารละลายไหลผ่านคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย native washing buffer ปริมาตร 10 ml เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไปบางส่วน จากนั้นมาทำการชะล้างด้วย native elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 100 mM Imidazole, pH 8.0) ที่มี 100 mM Imidazole ปริมาตร 8 ml โดยทำการแบ่งเก็บสารละลายจากคอลัมน์เป็น 4 ช่วง (fraction) ช่วงละ 2 ml ต่อมาทำการล้างด้วย native washing buffer อีก 10 ml แล้วทำการชะโปรตีน RBD_NS1 ที่เหลือออกอีกด้วย native elution buffer ที่มี 250 mM Imidazole 8 ml แล้วเก็บสารละลายเป็น 4 ช่วง ช่วงละ 2 ml จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายจากคอลัมน์ที่เก็บได้มาทำการแยกด้วย SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ต่อไป

7. การวิเคราะห์โปรตีน NS1 และ โปรตีน RBD_NS1 ด้วยเทคนิค Western blot (Analysis of NS1 and RBD_NS1 using Western blot technique)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot เป็นการพิสูจน์ว่าโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกนั้นเป็นโปรตีน NS1 เต็มสาย (full length) และ RBD_NS1 จริงหรือไม่โดยโปรตีนที่มีการแสดงออกมานั้นจะเชื่อมติดอยู่กับ His-tag ทางด้านปลาย N ซึ่งจะใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ histag (anti-Histag) เป็นสิ่งที่พิสูจน์การแสดงออกของโปรตีน โดยจะทำการเตรียม 12% SDS-PAGE ใส่ตัวอย่างโปรตีน NS1 และ RBD_NS1 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วลงในแต่ละช่อง จากนั้นแยกโปรตีนตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 140 V เป็นเวลา 70 นาที จากนั้นเตรียมการถ่ายโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane โดยเริ่มจากการแช่ fiber pad, กระดาษกรอง (filter paper), Nitrocellulose membrane ใน transfer blotting buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นติดตั้งเครื่องส่งถ่ายโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า กับ polyacrylamide gel ที่มีตัวอย่างโปรตีนที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 V กระแสไฟฟ้า 200 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ในการส่งถ่ายโปรตีนจาก polyacrylamide gel ไปสู่ Nitrocellulose membrane เมื่อครบเวลาแล้วล้าง Nitrocellulose membrane ด้วย washing buffer (TBS; 50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, pH 7.5) โดยบ่มเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องทำซ้ำ 3 ครั้งเมื่อครบแล้วเท washing buffer ออก และเติม blocking buffer 3% BSA-TBST (สูตร TBST + 3% BSA) เพื่อป้องกันการจับที่ไม่จำเพาะของ antibody โดยบ่มที่ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย washing buffer โดยบ่มเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องทำซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อครบแล้วแล้วเท washing buffer ทิ้ง และเติม anti-His (1:1000)

ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย washing buffer โดยบ่มเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องทำซ้ำ 3 ครั้งจากนั้นเติม anti-mouse-IgG-HRP (1:1500) ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย washing buffer โดยบ่มเป็นเวลา 5 นาทีทำซ้ำ 3 ครั้งจากนั้นเติม DAB substrate (Sigma) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จะสังเกตเห็นแถบสีน้ำตาลเข้มของโปรตีนเกิดขึ้นแล้วล้างด้วย TBS อีกครั้งเพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป

8. การสร้างโครงสร้างสามมิติของโปรตีน RBD_NS1 และคัดสรรสารยับยั้ง (3D structure modeling of RBD_NS1 protein and Virtual screening for inhibitor compound)

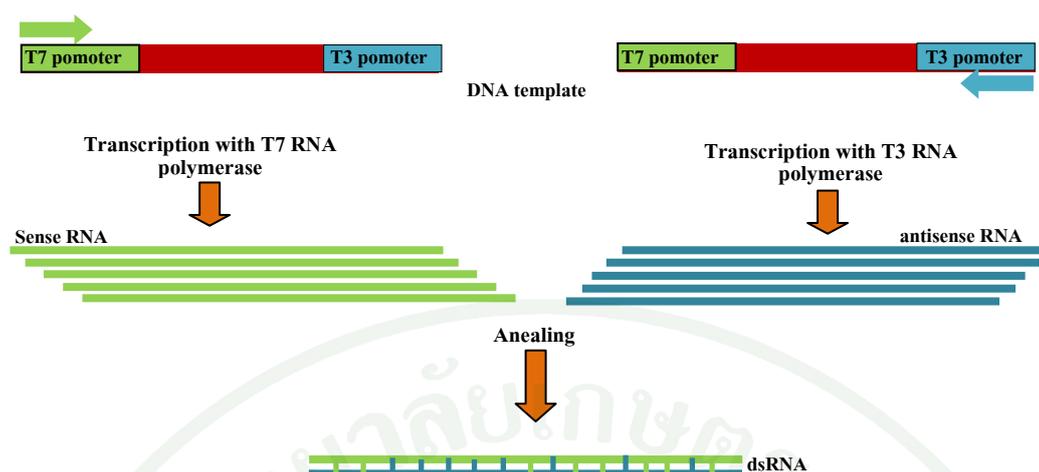
นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NS1 ของ A/chicken/TH/KU14/04 ที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน เพื่อทำ Protein Blast ในฐานข้อมูล GenBank ว่าเหมือนกับโปรตีนตัวใดในฐานข้อมูล GenBank จากนั้นหาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนในฐานข้อมูล Protein Data Bank (PDB) (www.pdb.org) ที่มีโครงสร้างสามมิติจากการวิเคราะห์ crystal structure นำโครงสร้างที่ชนิดของไฟล์คือ .pdb เข้าสู่โปรแกรม Modeller 9v1 เพื่อตรวจสอบว่าโครงสร้างของโปรตีนมีจำนวนกรดอะมิโนครบถ้วน แล้วนำโครงสร้างมาทำการเติมไฮโดรเจนอะตอม และนำโมเลกุลน้ำที่มีอยู่ออกเพื่อใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายสำหรับการคัดสรร Virtual screening (VS) เพื่อหาสารประกอบที่สามารถจับบริเวณเป้าหมายของโปรตีนได้

ในการเตรียมสารประกอบสำหรับ Docking ทำได้โดยการกำหนดแกนหมุนภายในโครงสร้าง และเติมประจุ ซึ่งการทำ virtual screening จะใช้โปรแกรม AutoDock 3.0.5 ในการคำนวณค่าพลังงาน binding energy ระหว่าง โปรตีน NS1 กับสารประกอบในชุดฐานข้อมูลจาก National Cancer Institute (NCI) database (www.cancer.gov) ที่ได้ทำการกำหนดค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของอะตอมและประจุภายในโครงสร้างสารประกอบซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่มีสารประกอบทั้งหมดจำนวน 1990 โครงสร้างซึ่งจะใช้ระบบปฏิบัติการ Linux version Fedora core 4 (RedHat) ในคอมพิวเตอร์ Pentium IV เป็นระบบปฏิบัติการสำหรับดำเนินการโปรแกรม AutoDock 3.0.5 ในการทำ virtual screening และคำนวณค่า binding energy ขณะที่มีการจำกัดการเคลื่อนไหวของอะตอมในสารประกอบ และ site chain ของโปรตีนเป้าหมาย โดยได้กำหนดกล่องของขอบเขตการคำนวณ (Grid box) ครอบคลุมบริเวณ RNA binding site ของ RNA binding domain ของโปรตีน NS1 โปรแกรมการคำนวณแบบ genetic algorithm (GA) ที่ออกแบบให้สารประกอบมีความอิสระในการเคลื่อนที่ที่เหมาะสมกับพลังงานในการจับกับโปรตีนเป้าหมาย grid box ที่สร้างขึ้นในบริเวณ RNA binding domain จะกำหนดการคำนวณค่าพลังงานของอะตอมชนิดต่างๆ ภายใน

สารประกอบ (A = aromatic carbon, C = aliphatic carbon, H = hydrogen, O = oxygen, S = sulfur, N = nitrogen, P = phosphorus, I = iodine, F = iron, f = fluorine, b = bromine, and c = chlorine) ซึ่งค่า binding energy จะบอกถึงความเสถียรของการจับกันระหว่างสารประกอบและโปรตีน NS1 โดยถ้าค่า binding energy มีค่าที่ต่ำแสดงว่าการจับกันระหว่างสารประกอบ และ โปรตีน NS1 ก็มีความเสถียรที่สูงจากนั้นทำการวิเคราะห์ค่า binding energy ที่เกิดขึ้นและตำแหน่งการจับกันระหว่างโปรตีน NS1 และ สารประกอบนำผลการคำนวณมาแสดงด้วยภาพโดยใช้โปรแกรม PyMOL version 0.99

9. การสร้าง RNA สายคู่ที่ติดฉลากด้วย Digoxigenin ด้วยปฏิกิริยา *In vitro* transcription (Production and labelling of double stranded RNA with digoxigenin using *In vitro* transcription assay)

การสร้างสาย RNA ที่ติดฉลาก Digoxigenin (DIG) ด้วยปฏิกิริยา *In vitro* transcription จะต้องทำการเตรียมสาย DNA แม่แบบที่มีส่วนของ T7 promoter และ T3 promoter ที่ใช้เป็นบริเวณเริ่มต้นในการเกิดการ transcription เป็นสาย RNA ซึ่งสาย RNA ที่ต้องการทดสอบกับโปรตีน NS1 นั้นต้องเป็น RNA สายคู่ (dsRNA) แต่ในกระบวนการที่สร้างสาย RNA นั้นสาย RNA ที่ได้จะเป็น RNA สายเดี่ยว (ssRNA) จากนั้นจึงต้องทำการจับคู่สม (annealing) ให้เป็น RNA สายคู่ด้วยการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่อไป โดยความยาวของสาย RNA ที่ใช้ทดสอบกับโปรตีน NS1 จะทดลองใช้ RNA สายคู่ 2 ชนิดที่มีความยาว 345 คู่เบส และ ความยาว 110 คู่เบส ซึ่งขั้นตอนเตรียมสาย DNA แม่แบบนั้นจะใช้เทคนิค PCR โดยจะทำการเพิ่มปริมาณสาย DNA จากบางส่วนของยีน NS1 จากพลาสมิด pGEM_NS1 โดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter_F (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') และ NS345-T3 promoter_R (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGT ACT CAA GCT ATG CAT CC-3') จะได้ PCR product ขนาด 345 คู่เบส และ ใช้ไพรเมอร์ T7promoter_F และ NS110-T3promoter_R (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGC ATG GCG CGA ATC GAA TT-3') จะได้ PCR product ขนาด 110 คู่เบส จากนั้นนำสาย PCR product ที่มีลำดับเบสของ T7 promoter และ T3 promoter ทั้ง 2 สายนั้นมาแยก DNA ตามขนาดด้วย 1.2% อะกาโรสเจลแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จสำหรับสกัด DNA จากเจล QIAEXII (Qiagen)



ภาพที่ 21 แสดงปฏิกิริยา *In vitro* transcription และการผลิต RNA สายคู่

จากนั้นทำการเตรียมปฏิกิริยา *In vitro* transcription (ภาพที่ 21) โดยจะทำการเตรียมในส่วน ของสายหลัก (sense) และสายตรงข้าม (antisense) ในสายหลักจะใช้เอนไซม์ T7 RNA polymerase ส่วนสายที่ตรงข้ามจะใช้เอนไซม์ T3 RNA polymerase ในปฏิกิริยา *In vitro* transcription 20 μ l ประกอบด้วย DNA แม่แบบ 5 μ l, 5x DIG-labeling mix (Roche) 4 μ l, 5x transcription buffer 4 μ l, T7 หรือ T3 RNA polymerase (20U/ μ l) (Roche) 2 μ l จากนั้นทำการบ่มที่ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วทำการเติม DNaseI-RNase free (Roche) 2 μ l บ่มที่ 37 °C 15 นาที เพื่อเป็นการกำจัดสาย DNA แม่แบบ ต่อมาเติม 0.2 M EDTA (pH 8.0) 2 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพสาย RNA ที่ได้ด้วย 1% อะกาโรสเจล แล้วทำให้สาย RNA นั้นบริสุทธิ์ด้วยวิธี Ethanol precipitation ซึ่งเมื่อได้ตะกอน RNA แล้วทำการละลายด้วย TN buffer ทำการวัดปริมาณ RNA สายเดี่ยวที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อตรวจสอบปริมาณสาย RNA ในการจับคู่สม (annealing) เป็น RNA สายคู่ (dsRNA) นั้น ทำโดยผสมสาย RNA sense และ antisense อย่างละ 5 μ M แล้วทำการบ่มที่ 95 °C 5 นาที เพื่อให้สาย RNA แยกออกจากกัน โดยสมบูรณ์แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อให้ RNA สายเดี่ยวนั้นค่อยๆ จับคู่สมกันเกิดเป็น RNA สายคู่ จากนั้นทำการตรวจสอบการเกิด RNA สายคู่ที่ได้ด้วยการแยกขนาด RNA ผ่าน 2% อะกาโรสเจล

ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการติดฉลากของ DIG-11-UTP ด้วยวิธี dot blot ซึ่งเป็นการ วัดประสิทธิภาพของการติดฉลากด้วย DIG ในสาย ssRNA ทั้งสาย sense และ antisense ที่ได้จาก ปฏิกิริยา *in vitro* transcription เป็นการเปรียบเทียบกับ DIG labeled probe control (Roche) ขนาด 10 ng/ μ l โดยทำการเจือจาง probe control ให้มีความเข้มข้นและทำการเจือจาง ssRNA ที่ได้จาก *in vitro* transcription (โดยประมาณว่าในปฏิกิริยา 20 μ l สามารถผลิต RNA ได้ 1 μ g/ μ l) ให้มีความ

เข้มข้น 10 pg/μl, 8 pg/μl, 6 pg/μl, 4 pg/μl และ 2 pg/μl จากนั้นทำการหยดแต่ละตัวอย่างลงบน Positively Charge Nylon membrane (Pall) 1 μl แล้วทำการอบแผ่น membrane ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วเติม washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3% (v/v) Tween 20, pH 7.5) 15 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องพร้อมเขย่า 5 นาที แล้วเท buffer ที่เติม blocking buffer (Roche) 10 ml บ่ม 30 นาที แล้วเท buffer ที่เติม และเติม Anti-DIG-AP, Fab fragment solution 6 ml บ่ม 30 นาที เท solution ที่เติม จากนั้นเติม washing buffer 15 ml บ่ม 15 นาที และเท buffer ที่เติม ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง ก่อนเติม detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) 10 ml บ่ม 5 นาที และเท buffer ที่เติม จากนั้นนำแผ่น nylon membrane วางลงบนแผ่นพลาสติกแล้วหยด CDP-Star ready-to-use 3 หยด จากนั้นซีลแผ่นพลาสติกโดยไม่ให้มีฟองอากาศบ่มที่ไว้ประมาณ 5 นาที จากนั้นทำการ expose ลงบน X-ray film เพื่อดูความเข้มของจุดที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับระหว่าง DIG labeled probe control และ ssRNA probe สัญญาณที่ได้จากการสังเคราะห์ DIG labeled ssRNA probe จะต้องไม่น้อยกว่า 4 pg/μl จึงสามารถนำไปใช้ได้

10. RNA binding assay และ Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

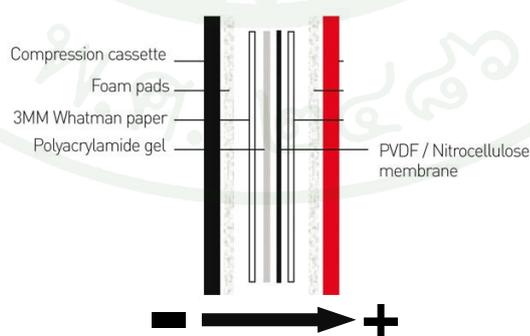
เมื่อได้โปรตีน RBD_NS1 แล้วทำการทดสอบการจับกันระหว่าง RBD_NS1 กับ dsRNA ด้วยปฏิกิริยา RNA binding assay โดยทำการทดสอบความสามารถในการจับ dsRNA ของ RBD_NS1 ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน RBD_NS1 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 และ 3.5 μM ตามลำดับ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยา RNA binding assay โดยปฏิกิริยา RNA binding assay 20 μl มีส่วนประกอบดังนี้ 10 x Tris-glycine 2 μl, 80% glycerol 2 μl, 0.1 M DTT (Invitrogen) 0.2 μl, RNase OUT (Invitrogen) 1 μl, 500 ng/μl tRNA (Roche) 2 μl, 25 mM MgCl₂ (Fermentas) 2 μl และ โปรตีน RBD_NS1 ตามความเข้มข้นที่กำหนด ทำการบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 10 นาที ซึ่ง tRNA จับกับโปรตีน RBD_NS1 อย่างไม่จำเพาะเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะระหว่างโปรตีน RBD_NS1 และ dsRNA จากนั้นทำการเติม 1 μM DIG-dsRNA 2 μl จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 nM ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ต่อเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการแยกขนาดโมเลกุลเชิงซ้อนระหว่าง DIG dsRNA ที่จับกับโปรตีน RBD_NS1 และ DIG dsRNA อิสระที่ไม่ได้จับกับโปรตีน RBD_NS1 ด้วยเทคนิค Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) จากความสามารถในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดต่างกัน โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นการเคลื่อนที่ระหว่างโมเลกุลเชิงซ้อน dsRNA-RBD_NS1 นั้นจะช้ากว่า dsRNA อิสระที่ไม่ได้จับกับโปรตีน จึงเห็นแถบของ DIG dsRNA-RBD_NS1 อยู่สูงกว่า DIG dsRNA อิสระ ในขั้นตอนการใส่สารละลายจาก

ปฏิกิริยาลงในหลุมตัวอย่างของ non denaturing PAGE จะทำโดยการผสม 6x loading dye (Fermentas) 3 ul ลงในปฏิกิริยาแล้วแบ่งสารละลาย 5 ul ใส่ลงในหลุมตัวอย่างของ 12% non denaturing PAGE ที่มี 1x TBE running buffer (89 mM Tris base, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0) จากนั้นทำการ electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ต้องแช่แท่งของ electrolyte buffer ในน้ำแข็งเพื่อป้องกันโปรตีนและโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนกับ dsRNA เสื่อมสภาพจากความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการแยกด้วยไฟฟ้า

จากนั้นทำการทดสอบความจำเพาะในการทำงานของโปรตีน RBD_NS1 โดยทดสอบการจับกับ RNA สายเดี่ยว (ssRNA) และนำโปรตีนชนิดอื่นมาทดสอบจับกับ dsRNA ด้วย

11. การตรวจสอบผลการเคลื่อนที่ของ dsRNA ด้วย Northern blot โดยใช้กระแสไฟฟ้า (Northern blot Analysis)

เมื่อทำการแยกโมเลกุลเชิงซ้อนด้วยกระแสไฟฟ้าจะทำการติดตามผลการเคลื่อนที่ของโมเลกุลจาก DIG-dsRNA โดยจะทำการส่งถ่าย dsRNA จาก non denaturing polyacrylamide gel ลงบนแผ่น positive charge Nylon membrane (PALL) ด้วยเครื่องส่งถ่ายสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Electro blotting) ขั้นตอนการเตรียมการ blot ขั้นแรกต้องทำการเตรียม Nylon membrane, filter paper, filter pad และ polyacrylamide gel ที่มี dsRNA มาแช่ไว้ใน 0.5 x TBE ประมาณ 5 นาที จากนั้นติดตั้งอุปกรณ์เข้ากับชุดการส่งถ่ายดังกล่าวไว้ในน้ำแข็งดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 แสดงการจัดวางอุปกรณ์ Northern blot โดยใช้กระแสไฟฟ้า

จากนั้นทำการ blot ที่ความต่างศักย์ 80 V ด้วยกระแสไฟฟ้า 200 mA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำแผ่น membrane ไปอบที่ตู้อบ Oven ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตรึง RNA กับแผ่น membrane แล้วนำแผ่น membrane ใส่ในกล่องพลาสติกเพื่อทำการเขย่าในแนวราบ (Orbital Shaker) เติม washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3% (v/v) Tween 20, pH 7.5) ปริมาตร 10 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อปรับสภาพของแผ่น membrane และนำสารอื่นๆออกก่อนทำขั้นตอน immuno assay เมื่อครบเวลาเทบัพเฟอร์ทิ้งแล้วเติม blocking buffer (Roche) ปริมาตร 10 ml บ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที เพื่อป้องกันการจับที่ไม่จำเพาะของ anti-DIG antibody และป้องกันเกิด background เมื่อครบเวลาเทบัพเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม antibody solution ที่มี anti-digoxigenin AP Fab fragment (75 mU/ml) 6 ml บ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที แล้วเทบัพเฟอร์ทิ้ง ต่อมาเติม detection buffer ปริมาตร 10 ml แล้วบ่มเป็นเวลา 5 นาทีเทบัพเฟอร์ทิ้ง นำแผ่น membrane ออกจากกล่องพลาสติกไปวางบนช่องพลาสติกที่พร้อมสำหรับการปิดผนึกแล้วทำการหยด CDP-Star ready-to-use (Roche) 4 หยด ลงบนแผ่น membrane ปิดผนึกของพลาสติกโดยไม่ให้มีฟองอากาศ บ่มกับ chemiluminescence substrate CDP-Star ready-to-use เป็นเวลา 5 นาทีซึ่งปฏิกิริยานี้จะทำให้เกิดแสง (photon) จากนั้นนำแผ่น membrane ที่ผนึกในช่องพลาสติกไปประกบกับแผ่นฟิล์ม X-ray ใน cassette ซึ่งต้องทำในห้องมืด โดยเตรียมแผ่นฟิล์ม X-ray ให้มีความพอดีกับแผ่น Nylon membrane แล้วทำการประกบเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำฟิล์ม X-ray จุ่มลงในน้ำยา developer (Kodak) 3 วินาที แล้วจุ่มลงในน้ำยา fixer (Kodak) ทันทีเป็นเวลา 10 วินาที แล้วแช่ในน้ำประมาณ 10 นาที แล้วนำแผ่นฟิล์มมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและดูผลของแถบ RNA ที่เกิดขึ้นบนแผ่นฟิล์ม

12. การทดสอบหาสารยับยั้งการทำงานของ RBD_NS1 (Screening assay for RBD_NS1 inhibitor)

ในการทดสอบหา inhibiting compound ที่จะสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน RBD_NS1 นั้นใช้สารที่ได้จากการทำ virtual screening และสารสกัดจากสมุนไพรไทย ซึ่งการสกัดสารสมุนไพรนั้นได้จากการชั่งตัวอย่างสมุนไพร 40 กรัม บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วนำตัวอย่างที่บดเสร็จแล้วใส่ใน thimble ประมาณ 10 กรัม ปิด thimble ด้วยสำลี ประกอบเครื่อง Soxhlet extractor ให้เรียบร้อย เติมเฮกเซนลงในขวดก้นกลมปริมาตร 180 ml ให้เครื่องทำงานประมาณ 8 ชั่วโมง เก็บ thimble ไว้ในตู้ดูดควันเพื่อไล่เฮกเซนออกให้หมด แล้วชั่งน้ำหนักแห้ง นำสารละลายที่สกัดได้ไปทำ evaporation เพื่อแยกเฮกเซนออกจากสารที่ต้องการ จากนั้นนำ DMSO 1 ml มาละลายสารที่ได้ แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอในการทดสอบต่อไป

สารที่ได้จาก virtual screening จะพิจารณาจากสารที่มี binding energy ต่ำ 2 ชนิดที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Estradiol (NCI0035) และ Veratridine (NCI 0082) (Sigma) ซึ่งเป็นสารอยู่ในรูปแบบผงแล้วนำมาละลายด้วย DMSO โดยใช้ความเข้มข้น 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 μM ส่วนสารสกัดจากสมุนไพรจะทำการทดสอบสมุนไพร 34 ชนิดแสดงในตารางที่ 2 โดยใช้ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยทำการใส่สารประกอบและสารสกัดจากสมุนไพรไทยลงไปในการปฏิบัติ RNA binding assay ในช่วงทำการบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะเติม dsRNA ลงไป จากนั้นทำการบ่มปฏิบัติการ และดำเนินขั้นตอน Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA), Northern blot และ ตรวจสอบสัญญาณบวกด้วย anti-DIG-AP Fab และ CDP-Star ดังที่อธิบายในขั้นตอนที่ 10-11 เพื่อตรวจสอบความสามารถในการยับยั้ง RBD_NS1

ตารางที่ 3 สารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ RBD_NS1

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำมาสกัด	สรรพคุณ
สะเดา	<i>Azadirachta indica</i>	ใบ	รักษาโรคผิวหนัง
ทองพันชั่ง	<i>Rhinacanthus nasutus</i>	Aerial part	รักษาโรคผิวหนัง
ราชคฤ์	<i>Brucea amarissima</i>	ผล	แก้ไข้
อบเชยญวน	<i>Cinnamomum loureiroi</i>	เปลือกไม้	แก้ท้องร่วง
เบญจกานี	<i>Quercus infectoria</i>	ผล	แก้ท้องเสีย
อ้อยแดง	<i>Saccharum officinarum</i>	ลำต้น	แก้ไข้ ขับปัสสาวะ
จันทร์เทศ	<i>Myristica fragrans</i>	ลำต้น	แก้ท้องอืด
ต้อยตั่ง	<i>Ruellia tuberosa</i>	ลำต้น	ขับปัสสาวะ
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma longa</i>	เหง้า	แก้ไข้
เทียนกิ่ง	<i>Lawsonia inermis</i>	Aerial part	รักษาบาดแผล
โกฐกะกลิ้ง	<i>Strychnos nux-vomica</i>	เมล็ด	แก้ท้องเสีย
ว่านชักมดลูก	<i>Curcuma xanthorrhiza</i>	เหง้า	แก้ปวดประจำเดือน
สมอพิเภก	<i>Terminalia belirica</i>	ผล	ขับปัสสาวะ
สมอทะเล	<i>Sapium indicum</i>	ผล	ขับเสมหะ
สมอไทย	<i>Terminalia chebula</i>	ผล	แก้ท้องผูก
กำแพงเจ็ดชั้น	<i>Salacia chinensis</i>	ลำต้น	ยาระบาย
ดอกคำเสด	<i>Mallotus philippensis</i>	ดอก	แก้ไข้ ขับปัสสาวะ
ไพล	<i>Zingiber montanum</i>	เหง้า	ขับประจำเดือน

ตารางที่ 3 (ต่อ)

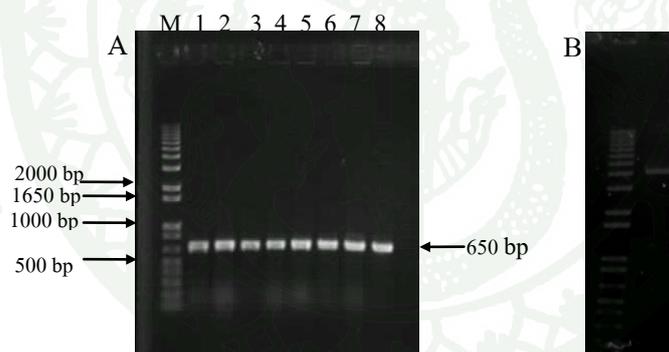
สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำมาสกัด	สรรพคุณ
สารภี	<i>Mammea siamensis T. Anders.</i>	ดอก	ขับเสมหะ ฟอกโลหิต
นมราชสีห์	<i>Euphorbia hirta L.</i>	ลำต้น	แก้หอบหืด
คนทีสอ	<i>Vitex negundo L.</i>	ราก	แก้ตะคริว ขับ ปัสสาวะ
เจตมูลเพลิง แดง	<i>Plumbago indica L.</i>	ราก	แก้ท้องเสีย บำรุง โลหิต
จันทร์ผา	<i>Dracaena lourieri</i>	ลำต้น	แก้เลือดออกตาม ไรฟัน บำรุงหัวใจ
กระเจี๊ยบแดง	<i>Roselle Hibiscus sabdariffa L.</i>	ดอก	แก้ไข ขับปัสสาวะ
แกแล	<i>Maclura cochinchinensis</i>	ลำต้น	ขับปัสสาวะ
สีเสียดเปลือก	<i>Pentace burmannica Kurz</i>	เปลือกไม้	แก้ท้องเสีย
สีเสียดยางก้อน	<i>Acacia catechu</i>	Resin	แก้ท้องเสีย
ฝาง	<i>Caesalpinia sappan</i>	ลำต้น	ขับประจำเดือน
มะเกลือ	<i>Diospyros Mollis Griff</i>	ลำต้น	ขับถ่ายพยาธิ
เปลือกมังคุด	<i>Garcinia mangostana L</i>	เปลือกผล	รักษาบาดแผล

ที่มา: <http://www.thaiherb.most.go.th/?q=herb> (2010)

ผลและวิจารณ์

1. การโคลน NS1 เต็มสาย (Cloning of full length NS1)

จากการใช้ cDNA เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีน NS1 โดยใช้ไพรเมอร์ NS1-BamHI_F และ NS1-SalI_R ที่จำเพาะต่อยีน NS จะได้สาย PCR product ที่มีขนาด 650 คู่เบส นำมาเชื่อม (ligation) กับพลาสมิด pGEM_T easy (Promega) และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. Coli* DH5 α (NEB) ผลการคัดเลือกโคโลนีโดยวิธี Colony PCR พบว่าทุกโคลนปรากฏ PCR product ที่มีขนาด 650 คู่เบส (ภาพที่ 23) เมื่อทำการ subclone ยีน NS1 เข้าสู่ pQE80L (Qiagen) expression vector ที่บริเวณ BamHI และ SalI เพิ่มจำนวนพลาสมิดใน *E. Coli* DH5 α (NEB) ก่อนนำพลาสมิด pQE_NS1 ที่สกัดได้ มาทำการ transform เข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE) และสกัดแยกพลาสมิดจากโคลนที่ให้ผลบวก ได้ผลดังภาพที่ 23 B ซึ่งจะใช้ในการผลิตโปรตีน NS1 ในเชื้อแบคทีเรีย BL21 ต่อไป

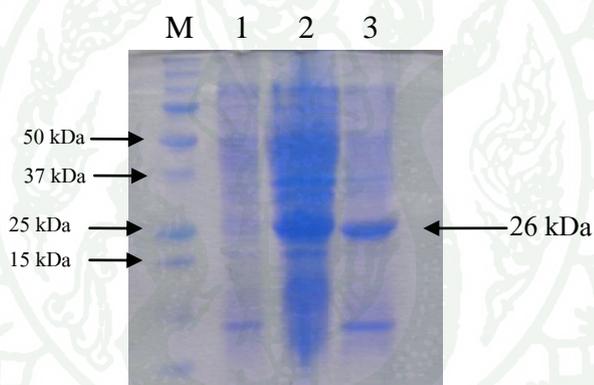


ภาพที่ 23 แสดงผล 1% agarose gel electrophoresis (A) การทำ PCR colony screening พลาสมิด pQE_NS1 ในเชื้อแบคทีเรีย DH5 α (B) แสดงพลาสมิด pQE_NS1 (B)

จากภาพที่ 23 (A) เมื่อทำ colony PCR screening จะให้ผลบวกทุกโคลนโดยจะเห็นแถบของ DNA ที่ขนาด 650 คู่เบส ส่วนในภาพ (B) เป็นพลาสมิด pQE_NS1 ที่เป็น expression vector ที่มีชิ้นส่วนของยีน NS1 เพื่อทำการถ่ายเข้าสู่เชื้อ *E. coli* BL21 ที่ใช้เป็น expression host สำหรับการสร้างโปรตีน NS1

2. การแสดงออกของโปรตีน NS1 เต็มสาย (Overexpression of full length NS1)

เมื่อได้ transformant *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด pQE_NS1 แล้วทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB-broth ปริมาตร 1,000 ml แล้วเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 ด้วยแลคโตส 0.1% w/v เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลาข้ามคืน ทำให้เซลล์แตกด้วยการ Sonication จากนั้นแบ่งส่วนสารละลาย (Soluble) ออกจากส่วนที่เป็นตะกอน (inclusion) เพื่อตรวจสอบว่าโปรตีน NS1 นั้นละลายอยู่ในส่วนใดโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 12% SDS-PAGE ได้ผลดังภาพที่ 24 ซึ่งจะเห็นว่าหลังจากทำให้เซลล์แตกจะไม่พบแถบโปรตีน NS1 ที่มีขนาดประมาณ 26 kDa นั้นจะอยู่ในส่วนที่เป็นสารละลาย (ช่องที่ 1) แต่จะพบในส่วนที่เป็นตะกอน (inclusion) ซึ่งต้องละลายด้วย denaturing washing buffer ซึ่งมี urea 8 M เป็นส่วนประกอบ (ช่องที่ 3) โดยในสภาวะสารละลายใน denaturing washing buffer โปรตีนจะอยู่ในสภาวะที่เสียสภาพจากธรรมชาติ

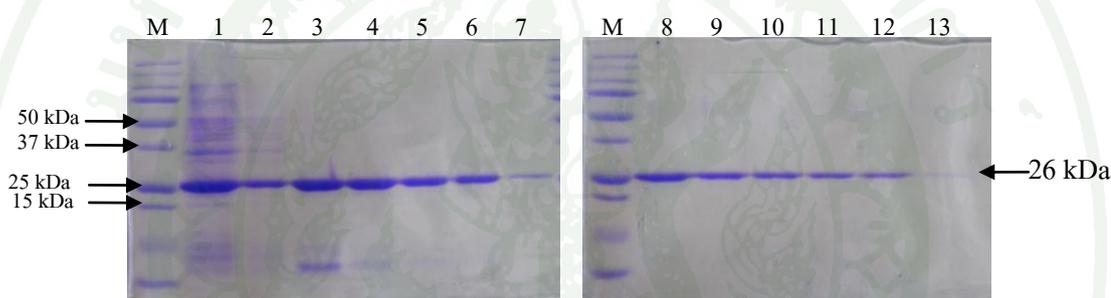


ภาพที่ 24 แสดงผล 12% SDS-PAGE หลังจากการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 เต็มสายโดยในช่องที่ 1 เป็นส่วนสารละลายหลังจากการทำให้เซลล์แตก ช่องที่ 2 เป็นส่วนของตะกอนเซลล์ก่อนทำให้เซลล์แตก ช่องที่ 3 ส่วนของตะกอน (inclusion) หลังจากการทำให้เซลล์แตกแล้วละลายใน denaturing washing buffer

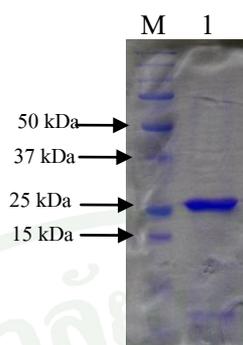
3. การทำโปรตีน NS1 ให้บริสุทธิ์ในสภาวะที่โปรตีนเสียสภาพ (Purification of NS1 in denaturing condition)

เมื่อทดสอบการแสดงออกของโปรตีน NS1 แล้วทราบว่าโปรตีนนั้นละลายอยู่ในส่วน denaturing washing buffer จากนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอฟิไนตีโครมาโตกราฟีผ่าน Nickle

column buffer ที่ใช้จะเป็น denaturing buffer ที่มีส่วนประกอบของ 8 M urea ทั้งใน washing buffer และ elution buffer ทำการแบ่งเก็บสารละลายโปรตีนจากการชะล้าง (elution buffer) ที่ผ่านคอลัมน์เป็นช่วง (fraction) ช่วงละ 2 ml ได้ผลดังภาพที่ 25 ซึ่งโปรตีน NS1 ส่วนใหญ่จะหลุดออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของ imidazole เป็น 100 mM จะเห็นว่าในส่วนที่ได้จากการชะล้างด้วย denaturing elution buffer แถบของโปรตีน NS1 ที่ได้จะแสดงถึงความบริสุทธิ์ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้แต่ละส่วนมารวมกันแล้วเพิ่มความเข้มข้น (concentrate) ของโปรตีนด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านตัวกรองที่เป็น membrane ขนาด 10 kDa ที่ยอมให้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า 10,000 Da ผ่าน แต่โปรตีน NS1 ขนาด 26 kDa ไม่สามารถผ่านได้ เมื่อแยกด้วย 12% SDS-PAGE ดังภาพที่ 26 จะเห็นว่าโปรตีน NS1 มีความบริสุทธิ์



ภาพที่ 25 แสดง 12% SDS-PAGE การทำโปรตีน NS1 ให้บริสุทธิ์ (Purification) ในสารละลาย denaturing buffer ในช่องที่ 1 เป็นสารละลายโปรตีนก่อนการทำ purification ซึ่งจะเห็นแถบโปรตีนอื่นๆปนอยู่ ช่องที่ 2, 7 และ 13 เป็นสารละลายที่ถูกล้างจากคอลัมน์ด้วย denaturing washing buffer ช่องที่ 3, 4, 5 และ 6 เป็นสารละลายโปรตีน NS1 ที่ชะล้างด้วย 100 mM imidazol denaturing elution buffer ช่องที่ 8, 9, 10, 11 และ 12 เป็นสารละลายโปรตีน NS1 ที่ชะล้างด้วย 250 mM imidazol denaturing elution buffer

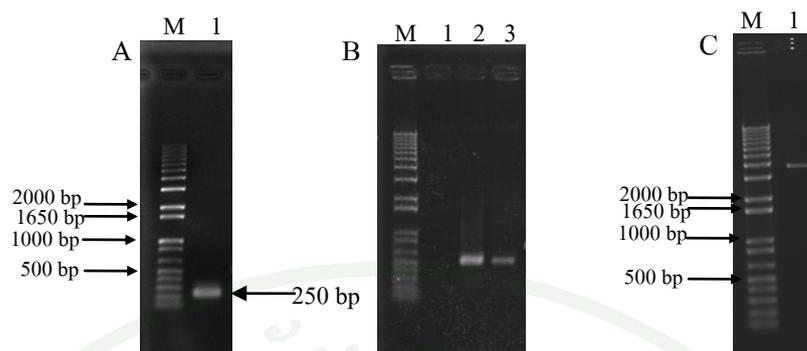


ภาพที่ 26 แสดงผล 12% SDS-PAGE หลังการทำโปรตีน NS1 ให้บริสุทธิ์ (Purification) แล้วนำโปรตีนในแต่ละ fraction มารวมกันแล้วเพิ่มความเข้มข้น

จากนั้นเมื่อนำโปรตีนมาทำการกำจัด 8 M urea ออก (dialysis) เพื่อที่จะนำโปรตีนไปทดสอบการทำงานปรากฏว่าโปรตีน NS1 นั้นตกตะกอนทั้งหมดไม่สามารถละลายอยู่ในสภาวะที่ปราศจาก 8 M urea ได้ ทำให้ไม่สามารถนำโปรตีน NS1 ทั้งสายนั้นมาทดสอบการทำงานได้ ดังนั้นต้องทำการโคลนยีนบางส่วนของโปรตีน NS1 คือ ส่วนของ RNA binding domain (RBD) ที่มีขนาด 10 kDa และเมื่อทำการเหนี่ยวนำให้เกิดแสดงออกอาจสามารถอยู่ในสภาวะธรรมชาติ (native) ที่ละลายในสารละลายที่ปราศจาก 8 M urea ได้

4. การโคลนยีนส่วน RNA binding domain ของโปรตีน NS1 (RBD_NS1)

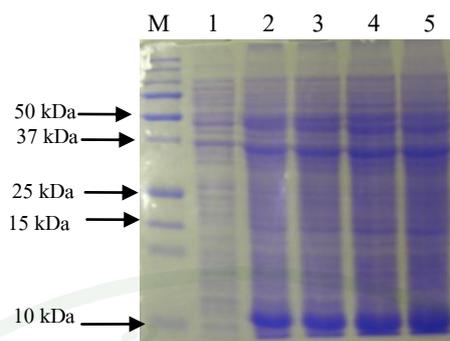
จากการโคลนยีน RBD_NS1 โดยการเพิ่มจำนวนชิ้น RBD_NS1 DNA ด้วยเทคนิค PCR จากพลาสมิด pGEM_NS1 full length ทำให้ได้ชิ้นยีนที่มีขนาด 250 คู่เบส ดังภาพที่ 27 ทำการเชื่อม RBD_NS1 เข้าสู่พลาสมิด pQE80L ก่อนที่จะถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย DH5 α ทำการเลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกโดยใช้วิธี colony PCR screening ด้วยไพรเมอร์ pQE_F และ ไพรเมอร์ pQE_R ที่มีความจำเพาะต่อพลาสมิด pQE80L ผลปรากฏว่ามีผลบวกเห็นแถบ DNA ที่มีขนาด 450 คู่เบส จำนวน 2 โคโลนดังภาพที่ 27 (B) เมื่อถ่ายพลาสมิด RBD_NS1 เข้าสู่ *E. coli* BL21 จะได้ผลดังภาพที่ 27 (C) จากนั้นจะใช้ *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิด pQE_RBD_NS1 ในการผลิตโปรตีนต่อไป



ภาพที่ 27 agarose gel electrophoresis แสดง (A) ชิ้นส่วนของยีน RBD_NS1 ที่ได้จากการทำ PCR จากพลาสมิด pGEM_NS1 (B) ผล colony PCR screening พลาสมิด pQE_RBD_NS1 ในเชื้อแบคทีเรีย DH5 α (C) พลาสมิด pQE_RBD_NS1 ใน *E. Coli* BL21

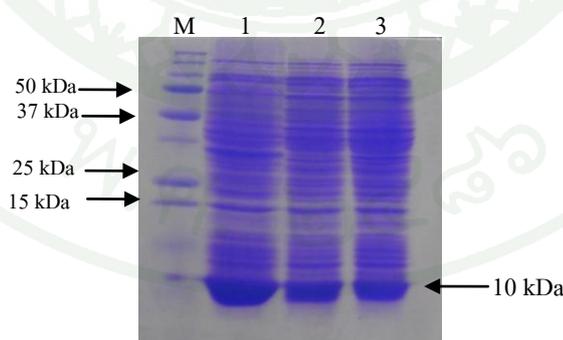
5. การแสดงออกของโปรตีน RBD_NS1 (Overexpression of RBD_NS1 protein)

เมื่อทำการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน RBD_NS1 ใน *E. coli* BL21 ได้ผลดังจากภาพที่ 28 ซึ่งเป็นการทดสอบการเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนในสภาวะต่างๆ โดยใช้แลคโตส และ IPTG เป็นสารเหนี่ยวนำที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในการผลิตโปรตีน RBD_NS1 พบว่าโปรตีน RBD_NS1 ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเมื่อทำการเหนี่ยวนำด้วย แลคโตส 0.1% และ 0.2% หรือ IPTG 0.2 mM และ 1 mM ตามลำดับ ซึ่งจากภาพแถบของโปรตีนขนาด 10 kDa ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีน RBD_NS1 ทั้ง 4 สภาวะ แต่สังเกตว่าในสภาวะที่เหนี่ยวนำด้วย 0.2 mM IPTG ที่ 37°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นั้นมีความเข้มของแถบโปรตีน RBD_NS1 มากที่สุดจึงเลือกสภาวะนี้ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน RBD_NS1



ภาพที่ 28 12% SDS-PAGE แสดงผลการแสดงออกโปรตีน RBD_NS1 ในสภาวะต่างๆ ช่องที่ 1 เป็นตะกอนเซลล์ก่อนการเหนี่ยวนำ ช่องที่ 2 และ 3 โปรตีนของเซลล์เมื่อเหนี่ยวนำด้วยแลคโตสความเข้มข้น 0.1 % และ 0.2 % ตามลำดับหรือ IPTG ที่ความเข้มข้น 0.2 mM (ช่องที่ 4) และ 1 mM (ช่องที่ 5)

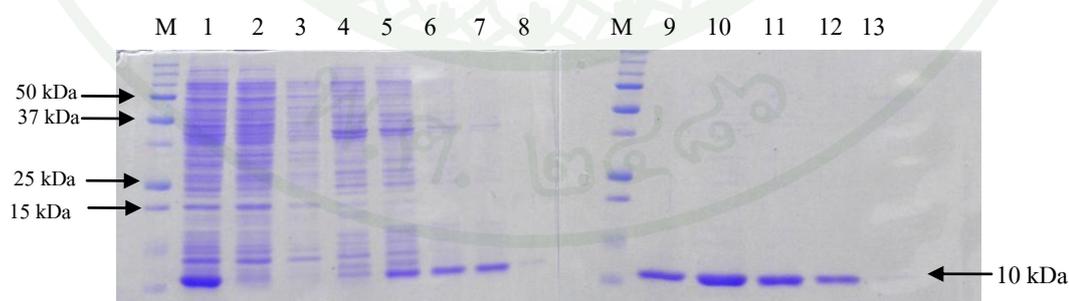
หลังจากการเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย 0.2 mM IPTG ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำตะกอนของเซลล์ทั้งก่อนและหลังทำให้เซลล์แตกมาแยกด้วย 12% SDS-PAGE ได้ผลดังภาพที่ 29 ซึ่งเห็นได้ว่าโปรตีน RBD_NS1 ปรากฏอยู่ทั้งส่วนตะกอนที่ต้องละลายด้วย denaturing washing buffer และส่วนที่เป็นสารละลายใส แต่โปรตีนที่สามารถนำไปทดสอบการทำงานได้นั้น ต้องเป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปสารละลาย (native form) ซึ่งปราศจาก urea ในสารละลาย จากนั้นจะนำโปรตีน RBD_NS1 ที่ละลายอยู่ในส่วนสารละลายนั้นไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



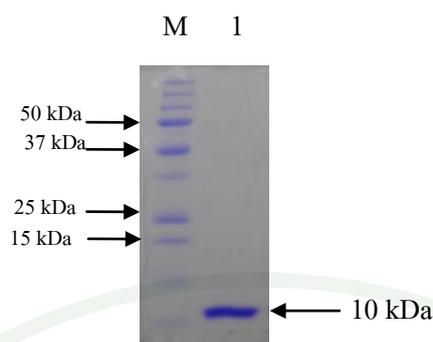
ภาพที่ 29 12% SDS-PAGE แสดงผลการแสดงออกโปรตีน RBD_NS1 ช่องที่ 1 ตะกอนเซลล์ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.2 mM ช่องที่ 2 เป็นส่วนตะกอน (inclusion) ที่ละลายใน denaturing buffer และ ช่องที่ 3 ส่วนสารละลายใสที่ละลายใน native buffer หลังจากทำให้เซลล์แตก

6. การทำโปรตีน RBD_NS1 ให้บริสุทธิ์ในสภาวะธรรมชาติ (Purification of RBD_NS1 in native condition)

เมื่อทดสอบการแสดงออกของโปรตีน RBD_NS1 และทราบว่าโปรตีนนั้นอยู่ในส่วนที่เป็นสารละลาย ซึ่งการทำให้บริสุทธิ์จะใช้ native buffer ทั้งระบบรวมทั้งใน washing buffer และ elution buffer เมื่อทำการแบ่งเก็บสารละลายโปรตีนจากการชะล้าง (elution buffer) ที่ผ่านคอลัมน์เป็นช่วง (fraction) ช่วงละ 2 ml ได้ผลดังภาพที่ 30 ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารละลายโปรตีนก่อนการทำ purification จะมีแถบโปรตีน RBD_NS1 และโปรตีนอื่นๆปนอยู่ (ช่องที่ 1) เมื่อผ่าน Nickle column จะเห็นโปรตีนอื่นๆ ที่หลุดออกมา ในสารละลาย (ช่องที่ 2) จากเมื่อล้างคอลัมน์ด้วย native washing buffer จะเห็นโปรตีนอื่นๆ หลุดออกมา (ช่องที่ 3, 8 และ 13) หลังจากที่จะล้างด้วย 100 mM imidazol native elution buffer จะเห็นสารละลายโปรตีน RBD_NS1 เมื่อชะล้างด้วย 250 mM imidazol native elution buffer จะเห็นว่าแถบของโปรตีน RBD_NS1 ที่ได้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มารวมกันแล้วเพิ่มความเข้มข้น (concentrate) ของโปรตีนโดยการ dialysis ในถุง cellulose membrane ที่ยอมให้โมเลกุลที่เล็กกว่า 3.5 kDa ไหลผ่านได้ แล้วทำการบ่มไว้ในสารละลาย native washing buffer ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืนเพื่อกำจัด imidazol ออกจากสารละลายแล้วได้โปรตีน RBD_NS1 ที่มีความบริสุทธิ์ดังภาพที่ 31 จากนั้นทำการวัดโปรตีนด้วยชุดน้ำยาสำเร็จ BCATM Protein Assay Kit วัดความเข้มข้นของโปรตีนได้ 0.9 mg/ml จากนั้นแบ่งเก็บสารละลายโปรตีนในหลอด microcentrifuge หลอดละ 100 μ l ไว้ที่ -80°C เพื่อไว้สำหรับทดสอบในการจับกับ RNA สายคู่ (dsRNA) ต่อไป



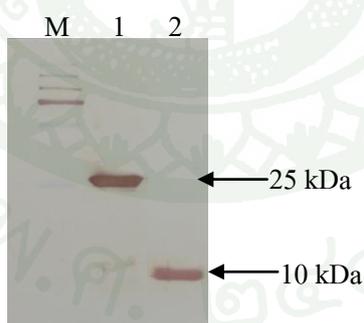
ภาพที่ 30 12% SDS-PAGE แสดงผลการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีน RBD_NS ในสภาวะ native สารละลายที่ผ่าน Nickle column (ช่องที่ 1), สารละลายที่ล้างคอลัมน์ด้วย native washing buffer (ช่องที่ 2, 8, 13), สารละลายชะล้างด้วย 100 mM imidazol native elution buffer (ช่องที่ 4-7), สารละลายชะล้างด้วย 250 mM imidazol native elution buffer (ช่องที่ 9-12)



ภาพที่ 31 12% SDS-PAGE แสดงผลหลังการทำโปรตีน RBD_NS1 ให้บริสุทธิ์ (Purification) แล้ว นำโปรตีนในแต่ละ fraction มารวมกันแล้วเพิ่มความเข้มข้น

7. การตรวจสอบโปรตีน NS1 และ โปรตีน RBD_NS1 ด้วยเทคนิค Western blot analysis โดยใช้ กระแสไฟฟ้า (Detection of NS1 and RBD_NS1 using Western blotting)

เมื่อโปรตีน NS1 เต็มสาย และ RBD_NS1 ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว นำมาทำการตรวจสอบความจำเพาะกับ antibody ต่อ histidine tag ด้วย Western blot โดยใช้กระแสไฟฟ้าได้ผลดังภาพที่ 32 ซึ่งโปรตีน NS1 มีขนาด 25 kDa และ RBD_NS1 มีขนาด 10 kDa ซึ่งทำปฏิกิริยากับ antibody ต่อ histidine tag อย่างแรง



ภาพที่ 32 แสดงผล Western blot ด้วยเทคนิค Electro blotting โดยใช้ anti-His หลังการทำโปรตีน NS1 และ RBD_NS1 ให้บริสุทธิ์ (Purification) ช่องที่ 1 โปรตีน NS1 เต็มสาย และช่องที่ 2 โปรตีน RBD_NS1

8. การสร้างโครงสร้างสามมิติของโปรตีน RBD_NS1 และคัดสรรสารยับยั้ง (3D structure modeling of RBD_NS1 protein and Virtual screening for inhibitor compound)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NS1 ของ A/chicken/TH/KU14/04 ที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนลำดับที่ 1-73 ของโปรตีน NS1 เพื่อทำ Protein Blast ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเหมือนกับปลายอะมิโนของ NS1 ของ A/crow/Kyoto/T1/2004 (H5N1) 100% ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนแสดงดังภาพที่ 33 จากนั้นหาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน NS1 ของ A/crow/Kyoto/T1/2004 (H5N1) ในฐานข้อมูล Protein Data Bank (PDB) (www.pdb.org) ที่มีรหัสในฐานข้อมูลคือ 2Z0A

จากนั้นสร้างโครงสร้าง 3 มิติ A/chicken/TH/KU14/04 โดยใช้โครงสร้างจาก .pdb ไฟล์ของ A/crow/Kyoto/T1/2004 มาเข้าสู่โปรแกรม Modeller 9v1 เพื่อจำลองโครงสร้างสามมิติโปรตีน RBD_NS1 ของ A/chicken/TH/KU14/04

```

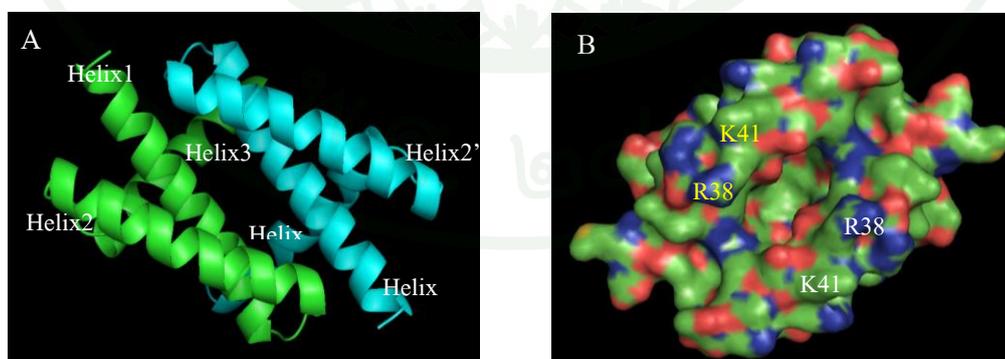
2Z0A      MDPNTVSSFFQVDCFLWHVVKRLADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNTLGLDIETATRA 60
A/Chicken/TH/KU14/04 MDSNTVSSFFQVDCFLWHVVKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNTLGLDIETATRA 60
*****

2Z0A      GKQIVERILEEE 72
A/Chicken/TH/KU14/04 GKQIVERILEEE 72
*****

```

ภาพที่ 33 แสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนลำดับที่ 1-72 ของโปรตีน RBD-NS1

NS1/A/chicken/TH/KU14/04 กับ A/crow/Kyoto/T1/2004 (H5N1) รหัส 2Z0A

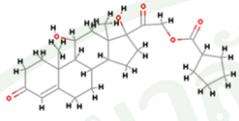
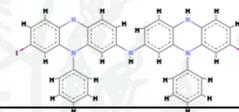
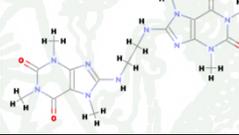
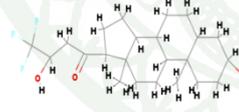
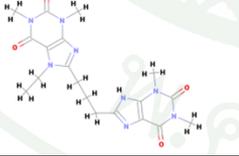
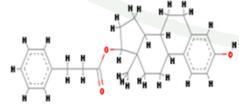
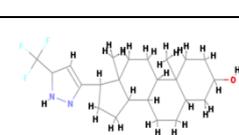


ภาพที่ 34 โครงสร้างสามมิติโปรตีน RBD_NS1 A/chicken/TH/KU14/04 ภาพ A แสดงการม้วนพับสาย (ribbon diagram) ภาพ B แสดงพื้นผิวของโมเลกุลโปรตีนที่สามารถจับกับ dsRNA และ สารประกอบขนาดเล็ก

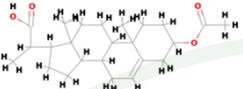
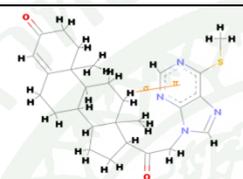
ภาพที่ 34 แสดงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน RBD_NS1 ของ A/chicken/TH/KU14/04 ด้วยโปรแกรม PyMOL version 0.99 ในภาพ A แสดงลักษณะการม้วนพับ (folding) เป็นโครงสร้าง secondary structure มีโครงสร้างสามมิติแบบ α -helices แต่ละ subunit (สีที่ต่างกัน) จะมี 3 helices โดยแต่ละ subunit จะจับกันเป็น dimer ในทิศทางที่สวนทางกันรวมทั้งหมด 6 helices ส่วนในภาพ B แสดงลักษณะพื้นผิวของโมเลกุลโปรตีนที่มีส่วนของกรดอะมิโน 2 ตัวที่จับกับ dsRNA คือ Arginine ตำแหน่งที่ 38 และ Lysine ตำแหน่งที่ 41 และสามารถเห็นหลุม (groove) ตรงกลางของโมเลกุลโปรตีน RBD_NS1 ที่อาจเป็นเป้าหมายของ inhibitor compound

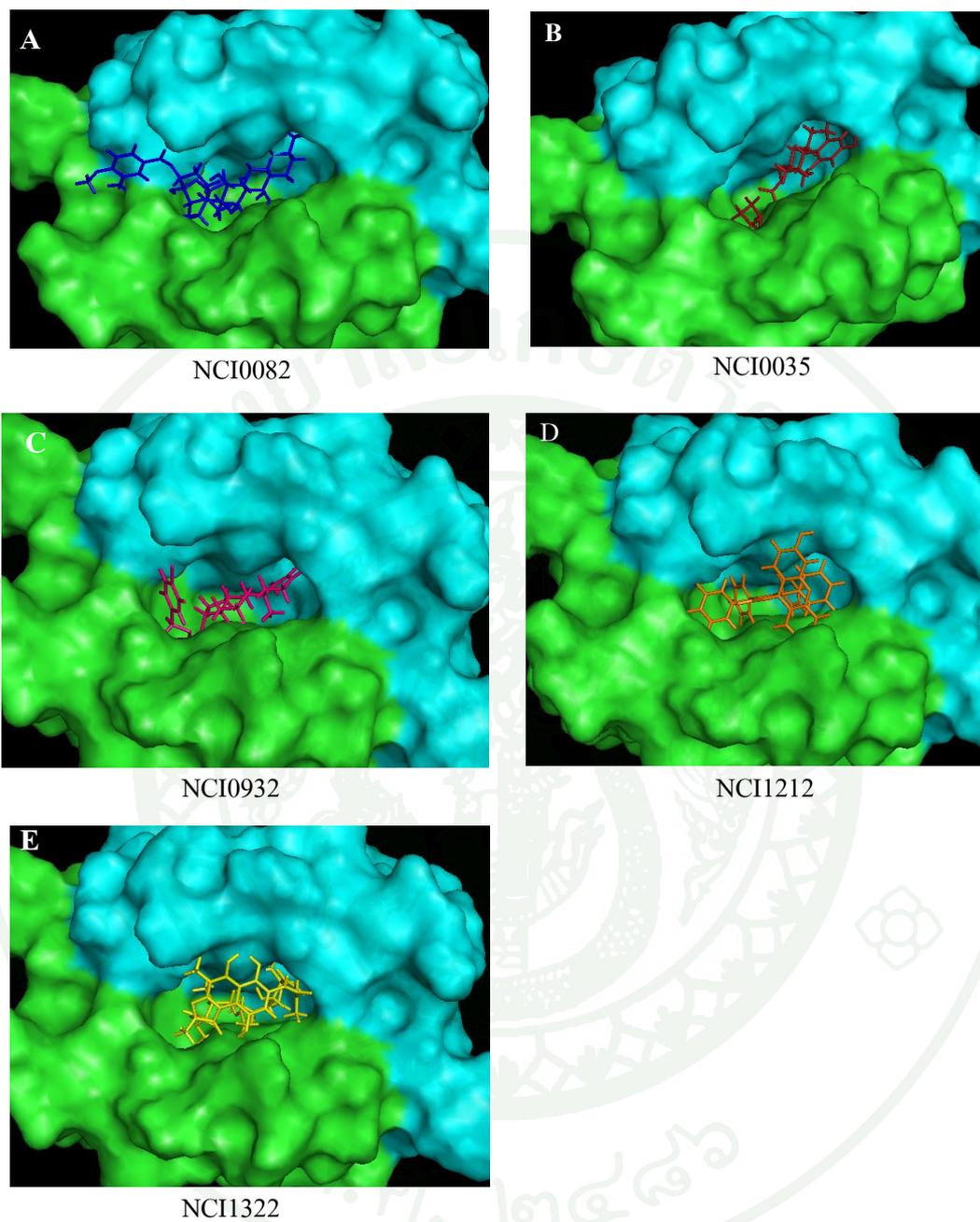
ผลของการทำ Virtual screening โดยใช้โปรแกรม AutoDock 3.0.5 จากฐานข้อมูลของ NCI นั้นสารประกอบมีรูปแบบของหมู่ฟังก์ชันหลายชนิด และค่า binding energy ที่เป็นผลจากการคำนวณค่าพลังงานในการ binding ระหว่างสารประกอบ และ โปรตีน NS1 ในบริเวณ RNA binding domain ของแต่ละสารประกอบ มีค่าที่แตกต่างกัน และเมื่อทำการวิเคราะห์ตำแหน่งในการจับกันระหว่างสารประกอบและ side chain ของโปรตีน NS1 จากสารประกอบทั้งหมด 1990 โครงสร้างในฐานข้อมูล NCI พบว่ามีสารประกอบจำนวน 20 โครงสร้างที่มีค่า binding energy ต่ำกว่า -15.04 Kcal/ โดยในตารางที่ 4 ได้แสดงสารประกอบ 15 โครงสร้างที่มีค่า binding energy อยู่ในช่วง -15.04 ถึง -15.99 Kcal/mol ที่จับอยู่ภายในหลุมของโปรตีน RBD_NS1 และ ตารางที่ 5 แสดงสารประกอบ 5 โครงสร้างที่มีค่า binding energy ต่ำที่สุด ส่วนในภาพที่ 35 แสดงให้เห็นว่าสารประกอบทั้ง 5 โครงสร้างจับในบริเวณ groove ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการ binding ระหว่างโปรตีน NS1 dsRNA หรือบริเวณที่เป็น dimer-interface ของโปรตีน NS1 และพบว่าพันธะ H-bond เป็นพันธะที่มีความสำคัญในการ binding ระหว่างสารประกอบและโปรตีน NS1

ตารางที่ 4 แสดงค่าพลังงานของสารประกอบ 15 โครงสร้างที่มีค่า binding energy -15.04 ถึง -15.99 Kcal/mol

สารประกอบ	โครงสร้าง 2 มิติ	สูตรโมเลกุล	Binding energy (Kcal/mol)
NCI0221		$C_{27}H_{38}O_6$	-15.04
NCI0436		$C_{24}H_{22}N_2O_4S_2$	-15.20
NCI1280		$C_{26}H_{19}N_3O_8S_2$	-15.23
NCI1896		$C_{36}H_{23}I_2N_5$	-15.23
NCI0189		$C_{18}H_{24}N_{10}O_4$	-15.27
NCI0542		$C_{23}H_{35}F_3O_3$	-15.32
NCI0298		$C_{19}H_{24}N_8O_4$	-15.33
NCI0334		$C_{27}H_{32}O_3$	-15.40
NCI0866		$C_{23}H_{33}F_3N_2O$	-15.40

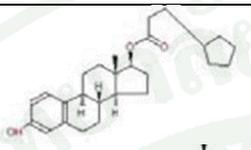
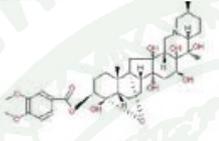
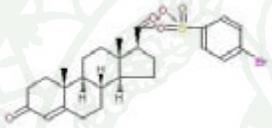
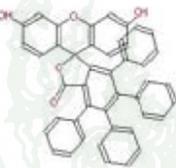
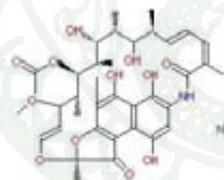
ตารางที่ 4 (ต่อ)

สารประกอบ	โครงสร้าง 2 มิติ	สูตรโมเลกุล	Binding energy (Kcal/mol)
NCI0780		$C_{24}H_{36}O_4$	-15.45
NCI1792		$C_{28}H_{30}Cl_2N_6$	-15.62
NCI1100		$C_{27}H_{34}N_4O_2S$	-15.64
NCI1655		$C_{32}H_{26}O_{14}$	-15.87
NCI1153		$C_{26}H_{32}N_4O_2S$	-15.91
NCI1043		$C_{27}H_{43}NO_8^-$	-15.99



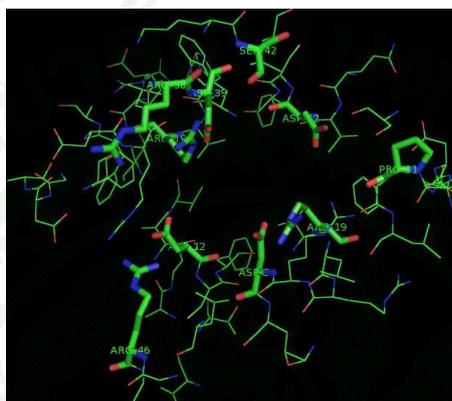
ภาพที่ 35 โครงสร้างสามมิติโปรตีน RBD_NS1 ที่แสดงสารประกอบ 5 โครงสร้างมี binding energy ต่ำที่สุดจับบริเวณ groove ซึ่งอยู่ตรงกลางของ RNA binding site

ตารางที่ 5 แสดงค่าพลังงานของสารประกอบ 5 โครงสร้างที่มีค่า binding energy ต่ำที่สุดจากการ คัดสรร

สารประกอบ	โครงสร้าง 2 มิติ	สูตรโมเลกุล	กรดอะมิโนที่เกิด พันธะH-bond กับ compounds	Binding energy (Kcal/mol)
NCI0035		$C_{26}H_{36}O_3$	Ser42', Arg46'	-16.39
NCI0082		$C_{36}H_{51}NO_{11}$	Arg19 (2)	-17.36
NCI0932		$C_{27}H_{33}BrO_5S$	Arg19 (2)	-16.05
NCI1212		$C_{44}H_{28}O_5$	Arg38	-16.39
NCI1322		$C_{37}H_{47}NO_{12}$	Asp39(2), Asp39', Ser42'	-17.21

โครงสร้าง และ binding energy ของ compounds ในฐานข้อมูลของ NCI database ที่ถูกคัดสรรโดยวิธี virtual screening ด้วยโปรแกรม AutoDock 3.0.5 ได้ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 5 ซึ่งสารประกอบ ทั้ง 5 โครงสร้างสามารถจับกับบริเวณร่องตรงกลางและ RNA binding site ของโปรตีน NS1 (ภาพที่ 35) และมีค่า binding energy ที่ต่ำ 5 อันดับแรกโดยมีค่า binding energy อยู่ระหว่าง -16.05 ถึง -17.36 Kcal/mol ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการจับกันระหว่าง compounds และ โปรตีน NS1 compounds ที่สามารถจับบริเวณเป้าหมายของโปรตีน NS1 นั้นจะมีโครงสร้าง โดยรวมเป็น aromatic ring และสามารถเกิดพันธะ H-bond กับกรดอะมิโนในโปรตีนได้ ซึ่งกรดอะมิโนที่เกิดพันธะกับสารประกอบ ทั้ง 5 โครงสร้างได้แสดงไว้ในภาพที่ 36

โดยกรดอะมิโนในตำแหน่งที่เป็นตัวหนาจะสามารถเกิดพันธะ H-bond กับ compound ได้ ซึ่งได้แก่ Serine ตำแหน่งที่ 42 Arginine ตำแหน่งที่ 19, 38, 46 และ Aspartate ตำแหน่งที่ 39 โดยกรดอะมิโนดังกล่าวอยู่ในบริเวณ groove ที่อยู่ตรงกลางของบริเวณที่มีการจับกับ dsRNA ของโปรตีน RBD_NS1 ซึ่งจะนำ compound ที่มีค่า binding energy ต่ำ มาทำการทดสอบว่าสามารถยับยั้งการทำจับกันระหว่างโปรตีน RBD-NS1 กับ dsRNA ได้หรือไม่



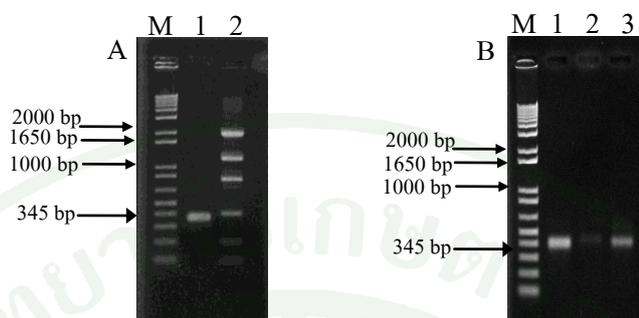
ภาพที่ 36 แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนใน RNA binding groove บนโปรตีน NS1 ที่สามารถเกิดพันธะ H-bond กับ compounds ที่ถูกคัดสรรจาก NCI database

9. การสร้าง RNA สายคู่ที่ติดฉลากด้วย DIG ด้วยปฏิกิริยา *In vitro* transcription (Production and labelling of double stranded RNA with digoxigenin using *In vitro* transcription assay)

9.1 การสร้าง probe ขนาด 345 คู่เบส

สาย DNA แม่แบบที่สร้างจากเทคนิค PCR จากพลาสมิด pGEM_NS1 โดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter_F กับ NS345-T3promoter_R จะได้สาย DNA ที่มีขนาด 345 คู่เบส ดังภาพที่ 37 A และเมื่อสร้าง DIG-ssRNA ด้วยปฏิกิริยา *In vitro* transcription จะได้สาย sense DIG-ssRNA และ anti-sense DIG-ssRNA ที่มีขนาด 300 คู่เบสได้ผลดังภาพที่ 37 B เมื่อทำการวัดปริมาณสาย RNA ที่ได้โดยการทำ dot blot เทียบกับ control RNA probe พบว่าด้านสาย sense DIG-ssRNA จะมีความเข้มข้น 45.9 μM ส่วนด้าน anti-sense DIG-ssRNA จะมีความเข้มข้น 29.5 μM จากนั้นทำการเจือจางสาย sense DIG-ssRNA และ anti-sense DIG-ssRNA ด้วย TN buffer โดยให้มีความเข้มข้น 5 μM ในการเตรียม dsRNA นั้นจะนำ RNA ทั้งสองสายที่มีความเข้มข้น 5 μM มาผสมกันอย่างละ 5 μl ทำ

การ annealing ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น แล้วตรวจโดยการแยกด้วยไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบการเคลื่อนที่ใน 2% agarose gel

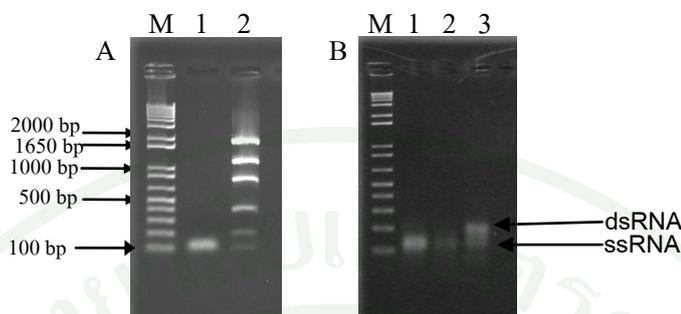


ภาพที่ 37 แสดงผล 1.2 % agarose gel electrophoresis (A) ช่องที่ 1 สาย DNA แม่แบบขนาด 345 คู่เบส ที่ได้จากเทคนิค PCR ช่องที่ 2 low mass DNA ladder (B) ช่องที่ 1 sense DIG -ssRNA ขนาด 300 คู่เบส ช่องที่ 2 antisense DIG - ssRNA ขนาด 300 คู่เบส ช่องที่ 3 dsRNA ที่ได้จากการ annealing

จากภาพที่ 37 จะเห็นว่าสาย DIG -ssRNA ซึ่งมีความยาว 300 คู่เบส แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA marker แล้วจะเท่ากับ DNA ขนาด 400 คู่เบส เนื่องจากโมเลกุลของ ssRNA นั้นถูกติดฉลากด้วย DIG จึงมีขนาดที่ใหญ่กว่า และในส่วนของ sense DIG -ssRNA (ช่องที่ 1 ในภาพ B) ซึ่งเริ่มต้นการสังเคราะห์สายจาก T7 promoter จะมีความเข้มกว่า sense DIG -ssRNA ที่สังเคราะห์จาก T3 promoter (ช่องที่ 2 ในภาพ B) และเมื่อ annealing สาย RNA เข้าด้วยกันยังไม่ค่อยเห็นความแตกต่างระหว่างการเคลื่อนที่หลังจากกลายเป็น dsRNA แล้ว

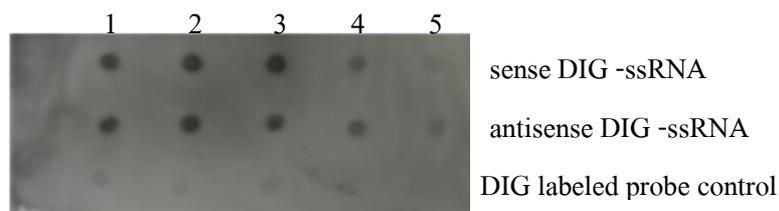
เมื่อนำ dsRNA ที่มีความยาว 300 คู่เบสไปทดสอบ RNA binding assay จับกับ โปรตีน RBD_NS1 ผลของการเคลื่อนที่ระหว่าง dsRNA กับ dsRNA-protein complex นั้นไม่แตกต่างกัน ซึ่งสาย ssRNA ที่มีขนาดยาวมากเกินไปนั้นอาจสามารถเกิด secondary structure ได้มากขึ้นและส่งผลกระทบต่อกระบวนการ annealing ที่สร้าง dsRNA ทำให้รบกวนการจับกันของ sense และ anti sense RNA เป็น dsRNA และอาจจะมีผลต่อเทคนิค RNA binding assay ด้วย จึงต้องทำการสร้าง probe ใหม่ที่มีขนาดสั้นกว่า 100 คู่เบส

9.2 การสร้าง probe ขนาด 80 คู่เบส



ภาพที่ 38 แสดงผล 1.2 % agarose gel electrophoresis ภาพ A สาย DNA แม่แบบขนาด 100 คู่เบส ที่ได้จากเทคนิค PCR (ช่องที่ 1) และ low mass DNA (ช่องที่ 2), ภาพ B ช่องที่ 1 sense DIG -ssRNA labeled 80 คู่เบส ช่องที่ 2 antisense DIG - ssRNA และ ช่องที่ 3 dsRNA ที่ได้จากการ annealing สาย sense และ antisense RNA

สาย DNA แม่แบบที่ใช้ไพรเมอร์ T7 promoter_F กับไพรเมอร์ NS110-T3 promoter_R จะได้สาย RNA ที่มีขนาด 100 คู่เบส ดังภาพที่ 38 (A) และเมื่อสร้าง DIG-ssRNA ด้วยปฏิกิริยา *In vitro* transcription ได้สาย sense DIG-ssRNA และ anti-sense DIG-ssRNA ที่มีขนาด 80 คู่เบส และจะเห็นว่าสาย DIG-ssRNA ซึ่งมีขนาด 80 คู่เบส แต่ปรากฏว่ามีขนาดยาวกว่าสาย DNA แม่แบบ เนื่องจากโมเลกุลของ ssRNA นั้นถูกติดด้วย DIG จึงมีขนาดที่ใหญ่กว่า และในส่วนของ sense DIG-ssRNA (ช่องที่ 1 ในภาพ 38 B) เริ่มต้นการสังเคราะห์สายจาก T7 promoter จะมีความเข้มกว่า anti-sense DIG-ssRNA ที่สังเคราะห์จาก T3 promoter (ช่องที่ 2 ในภาพ 38 B) และเมื่อ anneal สาย RNA เข้าด้วยกันจะเห็นความแตกต่างของการเคลื่อนระหว่าง ssRNA กับ dsRNA โดย จะเห็นแถบของ RNA เป็น 2 แถบชัดเจน ซึ่ง dsRNA จะเป็นแถบที่อยู่ด้านบน ssRNA (ช่องที่ 3 ในภาพ 38 B)



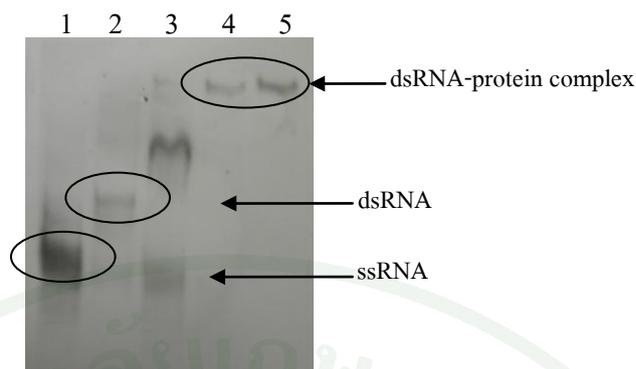
ภาพที่ 39 ภาพ X-ray फिल्मที่ได้จากการทำ dot blot ซึ่ง DIG-labeled RNA จะมีความเข้มข้น 10 pg/ μ l, 8 pg/ μ l, 6 pg/ μ l, 4 pg/ μ l และ 2 pg/ μ l ในแถวที่ 1-5 ตามลำดับ

เมื่อทำการตรวจสอบคุณภาพของ ssRNA probe ด้วยวิธี dot blot (ภาพที่ 39) ซึ่งเป็นการแสดงประสิทธิภาพของการ labeling ด้วยการเปรียบเทียบกับ DIG labeled probe control (Roche) ซึ่ง DIG - ssRNA ที่ได้นั้นก็มีความเข้มที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน จากภาพจะเห็นว่า RNA ที่ได้จากปฏิกิริยานั้นมีความเข้มมากกว่า DIG labeled probe control แสดงว่าปริมาณ ssRNA ที่ได้นั้นมีปริมาณมากกว่า probe control และมีประสิทธิภาพในการติดฉลากด้วย DIG เพียงพอสำหรับใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ต่อไป

10. RNA binding assay และ Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

10.1 การทดสอบความสามารถในการจับ dsRNA ของโปรตีน NS1

การทดสอบการทำงานของโปรตีน RBD_NS1 ด้วยเทคนิค RNA binding assay ด้วยวิธี Electrophoretic Mobility shift assay (EMSA) เป็นการทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน NS1 และ dsRNA ซึ่งจากการทดลองของ Chien และคณะ (2004) นั้น โปรตีน NS1 สามารถจับกับ dsRNA ได้เท่านั้นและไม่สามารถจับกับ ssRNA ได้ จึงทำการทดสอบด้วยว่าโปรตีน RBD_NS1 ที่ได้จากการ Over expression นั้น สามารถจับกับ dsRNA ได้หรือไม่ และการจับกันของโปรตีน NS1 กับ dsRNA และ ssRNA มีความแตกต่างกันอย่างไร ซึ่งได้ผลดังภาพที่ 40

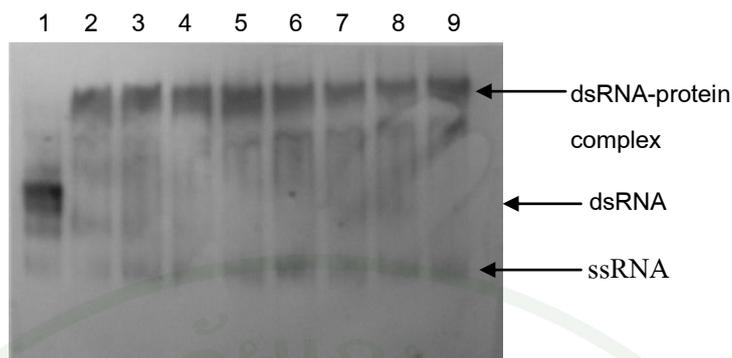


ภาพที่ 40 ภาพ X-ray ฟิล์มที่ได้จาก Northern blot analysis ที่ทำการทดสอบความแตกต่างของการจับกันระหว่างโปรตีน NS1 กับ dsRNA และ ssRNA ด้วยเทคนิค EMSA โดยใช้ 12% non-denaturing PAGE; sense ssRNA (ช่องที่ 1), dsRNA (ช่องที่ 2), sense ssRNA + 2 μM NS1 protein (ช่องที่ 3), dsRNA + 1 μM NS1 protein (ช่องที่ 4), dsRNA + 2 μM NS1 protein (ช่องที่ 5)

จากภาพที่ 40 สามารถเห็นความแตกต่างของการเคลื่อนที่ระหว่าง free-RNA กับ RNA ที่จับกับโปรตีน (RNA-protein complex) ซึ่งในการทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน RBD_NS1 กับ dsRNA นั้น (ช่องที่ 4) จะเกิดเป็น RNA-protein complex จึงเกิดการ shift ขึ้นเมื่อเทียบกับ free-dsRNA (ช่องที่ 2) แสดงว่าโปรตีน RBD_NS1 ที่ได้จากการ over expression นั้น สามารถมีวนพับเป็นโครงสร้างที่ถูกต้องจึงสามารถจับกับ dsRNA ได้ แต่ในการทดลองการจับกันของโปรตีน NS1 กับ ssRNA (ช่องที่ 3) สามารถเห็นการ shift เกิดขึ้น แต่ระยะของการ shift ขึ้นนั้นจะไม่เท่ากับการทดสอบกับ dsRNA ทั้งนี้เนื่องจาก ssRNA-DIG labeled 80 bp สามารถเกิด secondary structure เป็น stem loop และ hair pin ได้ จึงทำให้มีส่วนของ dsRNA เกิดขึ้น จึงมีโอกาสเป็นไปได้ที่โปรตีน NS1 สามารถจับกับ stem และ hair pin structure ได้ ดังนั้นจึงเกิดการ shift ขึ้นในช่องที่ 3

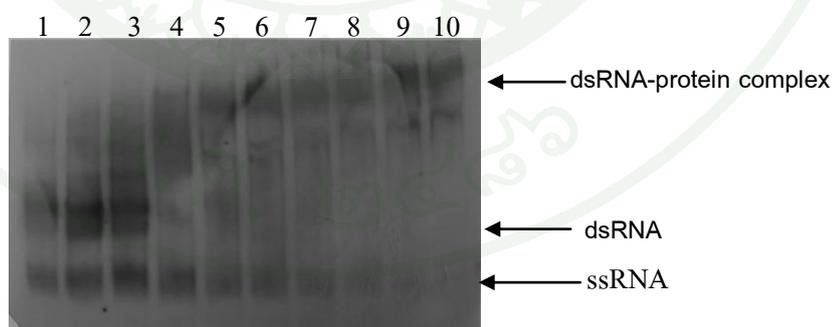
10.2 การหาปริมาณ RBD_NS1 ที่เหมาะสมในการทดสอบสารยับยั้ง

ต่อมาได้ทำการทดลอง RNA binding assay ในการจับกันของโปรตีน RBD_NS1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ dsRNA โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ dsRNA คงที่ที่ 1 μM ส่วนความเข้มข้นของโปรตีน RBD_NS1 ที่ใช้จะเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 μM ได้ผลดังภาพที่



ภาพที่ 41 ภาพ X-ray फिल्मที่ได้จาก Northern blot analysis ที่ทดสอบการจับกันของ dsRNA ที่ความเข้มข้น 1 μM กับ โปรตีน RBD_NS1 ที่มีความเข้มข้น 0 (ช่องที่ 1), 0.5 (ช่องที่ 2), 1 (ช่องที่ 3), 1.5 (ช่องที่ 4), 2 (ช่องที่ 5), 2.5 (ช่องที่ 6), 3 (ช่องที่ 7), 3.5 (ช่องที่ 8) และ 4 μM (ช่องที่ 9)

จากภาพที่ 41 จะเห็นว่าเกิดการ shift ขึ้นเป็น dsRNA-protein complex ตั้งแต่ความเข้มข้นของโปรตีน RBD_NS1 ที่ 0.5 μM เนื่องจาก complex มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า dsRNA แต่ยังไม่สามารถบอกถึงขนาดของโปรตีนที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง RBD_NS1 และ dsRNA จึงทำการทดสอบต่อเพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของ dsRNA จึงทำการทดสอบการเคลื่อนที่ของโปรตีน RBD_NS1 และ dsRNA complex ในช่วงที่มีความเข้มข้นต่างๆของโปรตีน RBD_NS1 ดังนี้ 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 และ 3.5 μM

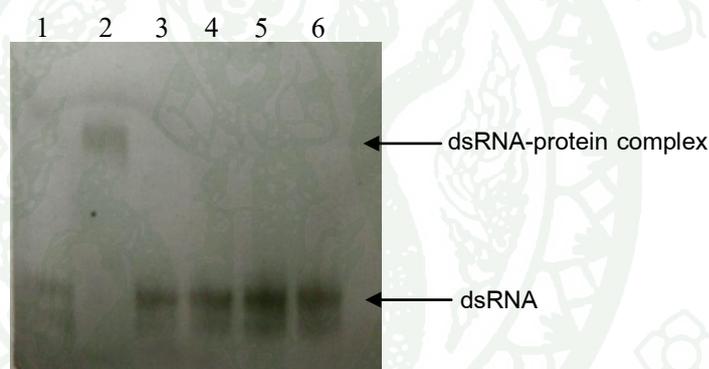


ภาพที่ 42 ภาพ X-ray फिल्मที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงผล RNA binding assay ที่ใช้วิธี EMSA ทดสอบการจับกันระหว่าง dsRNA 1 μM กับ RBD_NS1 ที่ความเข้มข้น 0 (ช่องที่ 1), 0.05 (ช่องที่ 2), 0.1 (ช่องที่ 3), 0.5 (ช่องที่ 4), 1 (ช่องที่ 5), 1.5 (ช่องที่ 6), 2 (ช่องที่ 7), 2.5 (ช่องที่ 8), 3 (ช่องที่ 9) และ 3.5 μM (ช่องที่ 10)

จากภาพที่ 42 จะเห็นว่าเกิดการเคลื่อนที่ช้าลง (shift) ของ dsRNA-protein complex ตั้งแต่ความเข้มข้นของโปรตีน RBD_NS1 ที่ 0.5 μM และเกิดการ shift ที่คงที่และสม่ำเสมอที่ความเข้มข้น 1 μM จึงใช้ความเข้มข้น 1 μM ในการทดสอบการยับยั้งด้วย inhibitor compound และสารสกัดจากสมุนไพรไทย

10.3 ความจำเพาะของการจับระหว่าง dsRNA และ โปรตีน RBD_NS1

เพื่อตรวจสอบว่าโปรตีน RBD_NS1 นั้นจับกับ dsRNA อย่างจำเพาะจึงทำการทดสอบปฏิกิริยาระหว่าง dsRNA กับ โปรตีนอื่นๆ ที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจับ dsRNA ได้แก่ โปรตีน Trypsin, α -chymotrypsin, BSA และ 6xHis-RT HIV 1 โดยจะใช้โปรตีนดังกล่าวที่ความเข้มข้น 1 μM และให้ผลดังภาพที่ 43



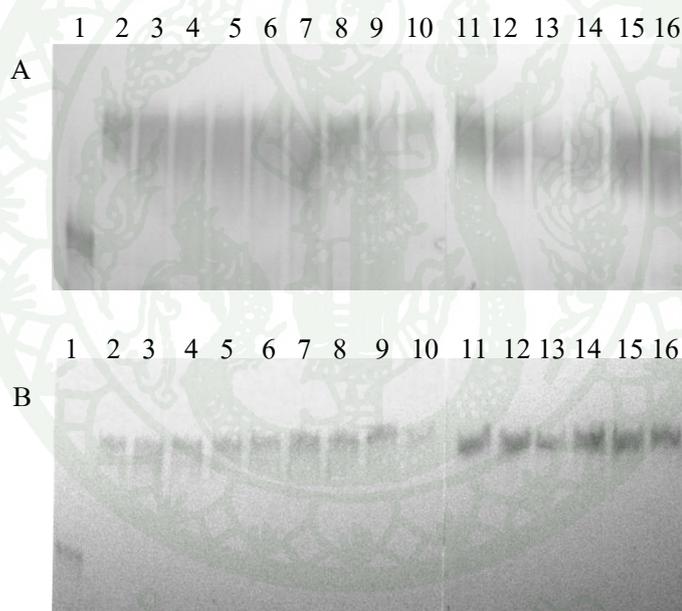
ภาพที่ 43 ภาพ X-ray ฟิล์์มที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงผลการจับกันระหว่าง dsRNA 1 μM กับ RBD_NS1 (ช่องที่ 2), Trypsin (ช่องที่ 3), α -chymotrypsin (ช่องที่ 4), BSA (ช่องที่ 5) และ 6xHis-RT HIV 1 (ช่องที่ 6) ที่ความเข้มข้น 1 μM ในช่องที่ 1 คือ dsRNA

ภาพที่ 43 แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยา RNA binding assay ของโปรตีน RBD_NS1 นั้นมีความจำเพาะ เห็นได้จากเมื่อนำโปรตีนอื่นนั้นมาทดสอบในแบบเดียวกันกับโปรตีน RBD_NS1 ไม่มีโปรตีนใดจับกับ dsRNA ได้เป็นผลให้ไม่มีการ shift ของ dsRNA เหมือนกับ complex ระหว่างโปรตีน RBD_NS1 และ dsRNA รวมทั้งโปรตีน 6xHis-RT HIV 1 ซึ่งมี 6xHis-tag ติดอยู่ในสายเปปไทด์เหมือนกับโปรตีน RBD_NS1 เป็นการแสดงว่า 6xHis-tag ที่ติดอยู่นั้นไม่ได้มีผลต่อการจับกับ dsRNA ของโปรตีน

11. การทดสอบหาสารยับยั้งการทำงานของ RBD_NS1 (Screening assay for RBD_NS1 inhibitor)

11.1 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของ RBD_NS1 โดยสารที่คัดสรรโดย virtual screening

ผลการทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยา RNA binding assay ระหว่างโปรตีน RBD_NS1 และ dsRNA ด้วย Estradiol (NCI0035) และ Veratridine (NCI0082) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 μ M – 1 mM พบว่าสารทั้งสองไม่สามารถยับยั้งการจับกันระหว่างโปรตีน RBD_NS1 กับ dsRNA ได้แสดงในภาพที่ 44



ภาพที่ 44 ภาพ X-ray ฟิล์์มที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงการทดสอบ compound ภาพ A Estradiol (NCI0035) และ ภาพ B Veratridine (NCI 0082) ในการยับยั้ง ปฏิกิริยา RNA binding assay ที่ความเข้มข้น 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 μ M (ช่องที่ 4 - 15 ตามลำดับ) ช่องที่ 1 dsRNA, ช่องที่ 2 dsRNA ที่จับกับ โปรตีน RBD_NS1, ช่องที่ 3 dsRNA ที่จับกับ โปรตีน RBD_NS1 + 10% DMSO

จากภาพที่ 44 (A และB) เป็นการทดสอบการยับยั้งโปรตีน RBD_NS1 ในปฏิกิริยา RNA binding assay ด้วยสารประกอบจาก NCI database compounds ที่ได้จากการคัดสรร 2 ชนิดคือ

Estradiol (NCI0035) และ Veratridine (NCI 0082) ที่ความเข้มข้น 10 μM ถึง 1000 μM ไม่สามารถยับยั้งการเกิด RNA binding reaction เพราะการ shift ของ dsRNA ยังเกิดขึ้นได้ในทุกความเข้มข้นของสารประกอบได้อาจเป็นเพราะการจับของ compound นั้นอยู่ตรงกลางบริเวณ RNA binding site จึงไม่สามารถขัดขวางการจับ dsRNA กับโปรตีน RBD_NS1 และไม่ทำให้โครงสร้างของ RBD_NS1 เปลี่ยนไป

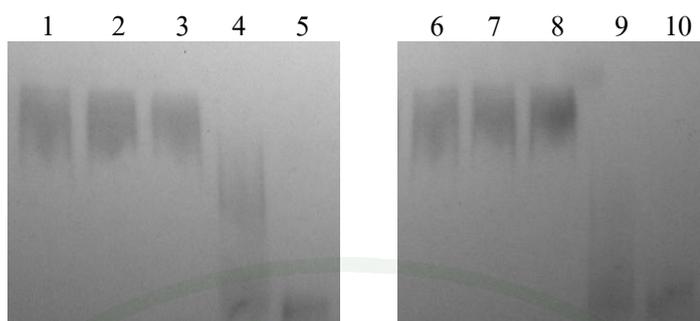
11.2 การทดสอบสารยับยั้งการทำงานของ RBD_NS1 โดยสารสกัดสมุนไพร

ในการทดสอบการยับยั้งด้วยสารสกัดจากสมุนไพรไทย 34 ชนิดนั้นพบว่ามีสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิดคือ ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza*), สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*), กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis*), ไพล (*Zingiber montanum*) และ เปลือกนนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml สามารถยับยั้งการเกิด complex ระหว่างโปรตีน RBD-NS1 และ dsRNA ได้ดังภาพที่ 45 ส่วนสมุนไพรอื่นๆ ได้แก่ สะเดา (*Azadirachta indica*) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) ราชคัค (*Brucea amarissima*) อบเชยญวน (*Cinnamomum loureiroi*) เบญจกานี (*Quercus infectoria*) อ้อยแดง (*Saccharum officinarum*) จันทร์เทศ (*Myristica fragrans*) ต้อยติ่ง (*Ruellia tuberosa*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) เทียนกิ่ง (*Lawsonia inermis*) โกรฐกะกลิ้ง (*Strychnos nux-vomica*) สมอทะเล (*Sapium indicum*) สมอไทย (*Terminalia chebula*) ดอกคำแสด (*Mallotus philippensis*) มะกอก (*Spondias pinnata*) แกแล (*Maclura cochinchinensis*) สีสียดเปลือก (*Pentace burmannica Kurz*) สีสียดยางก้อน (*Acacia catechu*) ฝาง (*Caesalpinia sappan*) มะเกลือ (*Diospyros Mollis Griff*) เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana L*) เปลือกมะกรูด (*Citrus hystrix*) สารภี (*Mammea siamensis T. Anders.*) นมราชสีห์ (*Euphorbia hirta L.*) คนทีสอ (*Vitex negundo L.*) เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica*) จันทร์ผา (*Dracaena lourieri*) กระจับปี่แดง (*Roselle Hibiscus sabdariffa L.*) มะรุม (*Moringa oleifera Lam.*) และเมล็ดขนุน (*Artocarpus heterophyllus Lam*) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน RBD-NS1 ในการจับกับ dsRNA



ภาพที่ 45 ภาพ X-ray फिल्मที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรไทยพบสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิดคือ ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza*) ช่องที่ 13, สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*) ช่องที่ 14, กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis*) ช่องที่ 17, ไพล (*Zingiber montanum*) ช่องที่ 21 และ เปลือกนนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) ช่องที่ 22 ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml (ช่องที่ 1 และ 18 คือ dsRNA)

จากนั้นจึงทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสมุนไพร ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza*) เปลือกนนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) โดยการให้โปรตีน RBD_NS1 ทำปฏิกิริยากับสารสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 10 $\mu\text{g/ml}$ ถึง 10 mg/ml ดังภาพที่ 46 ซึ่งมีสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิดคือ สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*), กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis*) และ ไพล (*Zingiber montanum*) ไม่ได้นำมาทดสอบความเข้มข้นในการยับยั้งที่เหมาะสม เพราะการเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ได้นั้นมีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการทดสอบที่ความเข้มข้น 10 mg/ml



ภาพที่ 46 ภาพ X-ray फिल्मที่ได้จาก Northern blot analysis แสดงการทดสอบความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการ shift ของ dsRNA ช่องที่ 2-5 ว่านขมิ้นคูลูก (*Curcuma xanthorrhiza*) ความเข้มข้น 10 ug/ml, 100 ug/ml, 1 mg/ml และ 10 mg / ml ตามลำดับ ช่องที่ 7-10 เปลือกนนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) ความเข้มข้น 10 ug/ml, 100 ug/ml, 1 mg/ml และ 10 mg / ml ตามลำดับ (ช่องที่ 1 และ 6 คือ dsRNA-protein complex ที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร)

จากภาพที่ 46 ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถเปลี่ยนแปลงการ shift ของ dsRNA ได้ คือที่ 1 mg/ml แต่ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml นั้นจะยับยั้งการ shift ของ dsRNA ได้อย่างสมบูรณ์

สารสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดแต่ละชนิดได้มีการรายงานการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยในกำแพงเจ็ดชั้นเป็นพืชในสกุล Salacia ที่ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน (Grover *et al.*, 2002) และมีการรายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidases ภายในลำไส้ (Yoshikawa *et al.*, 2008) อีกทั้งรายงานว่าพืชในสกุล Salacia สามารถลดระดับกลูโคสภายในกระแสเลือดหลังจากได้รับอาหารทั้งในคนและสัตว์ (Williams *et al.*, 2007) และมีการรายงานจาก Jihong และคณะ (2011) ที่ศึกษาผลกระทบสารสกัดจากกำแพงเจ็ดชั้นที่มีต่อระบบสืบพันธุ์โดยทำการทดลองในหนูทดลองซึ่งใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 2000 mg ต่อน้ำหนักตัว 1 kg ต่อวัน พบว่าสารสกัดจากกำแพงเจ็ดชั้นนั้นไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์และไม่มีความเป็นพิษอื่นๆ เกิดขึ้น

จากการทดลองของ Jeenapongsa และคณะ (2003) พบสารประกอบ (E)-1-(3,4-Dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) ในไพล (*Zingiber montanum*) ที่สกัดด้วยเฮกเซนแล้วทดลองในระดับ *In vitro* และ *In vivo* มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory) การบวมนี้

(edema formation) และสามารถยับยั้ง cyclooxygenase (CO) และ lipoxygenase (LO) pathways ในหนูทดลองสายพันธุ์ Sprague Dawley

ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza*) มีรายงานพบสารประกอบชื่อว่า Xanthorrhiza (1,3,5,10-bisabolatetraen-3-ol) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิด *Streptococcus spp.*, *Actinomyces viscosus* และ *Porphyromonas gingivalis* (Hwang *et al.*, 2000)

สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*) มีรายงานว่าพบสารประกอบ termilignan, thannilignan, 7-hydroxy-3',4'-(methylenedioxy) flavan และ anolignan B ซึ่งสารประกอบทั้ง 4 ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส HIV 1, *Plasmodium falciparum* เชื้อปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย และเชื้อรา *P. expansum* (Valsaraj *et al.*, 1997)

Biswas และคณะ (2010) ได้ทดลองนำสารสกัดจากใบนนทรีมาทดสอบในหนูทดลองพบว่าสามารถยับยั้งการทำลายตับ (acute liver damage) จากยา paracetamol ได้

การศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันครั้งแรกว่าสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน RDB_NS1 ของไวรัสไข้หวัดนกได้ สารออกฤทธิ์ที่มีการค้นพบในสารสกัดจากสมุนไพรดังกล่าวอาจจะมีฤทธิ์ในการต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ ซึ่งการทดสอบความสามารถของสมุนไพรดังกล่าวในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน RDB_NS1 อาจเป็นปัจจัยเริ่มต้นในการทดลองขั้นต่อไปทั้งในด้านการทดสอบกับเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสหรือการสกัดหาสารออกฤทธิ์ที่มีในอยู่สารสกัดจากสมุนไพรที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นต้านไวรัสไข้หวัดนกต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การโคลนและแสดงออกโปรตีน NS1 เต็มสายแล้วทำให้บริสุทธิ์ได้โปรตีน NS1 ที่มีขนาด 26 kDa แต่เมื่อทำการเปลี่ยนให้โปรตีนละลายในสภาวะธรรมชาติโปรตีนเกิดการตะกอนจึงไม่สามารถทดสอบการจับกับ dsRNA รายงานของ Bornholdt และ Prasad (2008) ที่ศึกษาโครงสร้างสามมิติโปรตีน NS1 เต็มสายด้วย X-ray crystal structure นั้นต้องการ mutation Arginine ตำแหน่ง 38 และ Lysine ตำแหน่ง 41 ไปเป็น Alanine จึงสามารถป้องกันการตกตะกอนได้แต่การทดสอบการจับกับ dsRNA นั้นต้องเกิดปฏิกิริยาระหว่าง dsRNA กับกรดอะมิโน Arginine และ Lysine ในตำแหน่งดังกล่าวจึงไม่สามารถทำการ mutation จึงทำการ cloning เฉพาะส่วน RNA binding domain (RBD) (Chien *et al.*, 2004) ที่มีโครงสร้างเป็น α -helix homodimer เมื่อให้มีการผลิตโปรตีนใน *E. coli* แล้วทำให้บริสุทธิ์จะได้โปรตีน RBD_NS1 ที่มีขนาด 10 kDa ซึ่งอยู่ในสภาวะธรรมชาติในรูปสารละลายได้

ทำการตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนแล้วสร้างโครงสร้างสามมิติของโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 A/chicken/Thailand/KU14/2004 ได้โปรตีนที่มีโครงสร้าง α -helix homodimer ซึ่งมี 6 α -helix แล้วกำหนดบริเวณโปรตีน RBD_NS1 สำหรับการคัดสรรสารประกอบใน NCI database ให้อยู่บริเวณ RND binding site ได้สารประกอบ 5 โครงสร้าง ที่มีค่า binding energy ต่ำกว่า -16.05 Kcal/mol ที่จะใช้ทดสอบในการยับยั้งปฏิกิริยา RNA binding assay

เมื่อนำโปรตีน RBD_NS1 ที่ความเข้มข้น 1 μ M มาทดสอบจับกับ DIG labeled dsRNA ที่ความเข้มข้น 100 nM ตามรูปแบบการทดลอง RNA-protein interaction (Kang *et al.*, 2006) ในปฏิกิริยา RNA binding assay แล้วแยกการเคลื่อนที่ด้วย EMSA พบว่าเกิดการ shift ของ dsRNA ตามแบบการทดลองของ Chien และคณะ (2004) ที่โปรตีน RBD_NS1 สามารถจับกับ dsRNA แล้วทำให้เกิดการ shift ของ dsRNA ได้

เมื่อทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยา RNA binding assay ด้วยสารประกอบ 2 โครงสร้าง คือ Estradiol (NCI0035) และ Veratridine (NCI 0082) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 μ M – 1000 μ M พบว่าสารทั้งสองไม่สามารถยับยั้งการจับกันระหว่างโปรตีน RBD_NS1 กับ dsRNA อาจเป็นเพราะการจับของสารประกอบไม่ได้ทำให้โปรตีน RBD_NS1 เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformation)

ในบริเวณ RNA binding site หรือ แอ่งจับบริเวณ RNA binding site โดยตรง จึงทำให้โปรตีน RBD_NS1 ยังสามารถจับกับ dsRNA ได้ แต่การทดลองของ Basu และคณะ (2009) ได้ทำการทดสอบหาสารยับยั้งการทำงานของโปรตีน NS1 โดยใช้สารประกอบจาก NCI database แล้วตรวจสอบผลยับยั้งโดยดูผลการสังเคราะห์ของ IFN mRNA ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อแล้วพบว่าสารประกอบ NSC128164 NSC109834 และ NSC95676 สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน NS1 ภายในเซลล์ได้แต่ไม่ได้รายงานบริเวณที่จำเพาะบนโปรตีน NS1 ที่เกิดการ interaction ระหว่างสารประกอบเมื่อในการวิจัยนี้ทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยา RNA binding assay จากสารสกัดสมุนไพรพบว่ามีสมุนไพร 5 ชนิดที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้คือ ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza*), สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*), กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis*), ไพล (*Zingiber montanum*) และ เปลือกนนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ซึ่งในสารสกัดจากสมุนไพรอาจมีสารประกอบอิสระที่สามารถจับบริเวณ RNA binding site จึงสามารถยับยั้งการจับกันระหว่างโปรตีน RBD_NS1 และ dsRNA ดังนั้นการทดลองนี้สามารถระบุเป้าหมายของสารประกอบในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน NS1 ได้โดยตรงคือบริเวณ RNA binding domain

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทดสอบสารประกอบที่ได้จากการคัดสรรโดยวิธี molecular docking ซึ่งพบโมเลกุลที่สามารถจับตรงตำแหน่งบริเวณ RNA binding site ไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยา RNA binding assay ได้อาจเป็นเพราะการจับของสารประกอบไม่ได้ทำให้โปรตีน RBD_NS1 เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในบริเวณ RNA binding site หรือ แอ่งจับบริเวณ RNA binding site โดยตรง แต่การทดสอบจากสารสกัดสมุนไพรพบว่ามีสมุนไพรที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าว ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาต่อไปว่าในสมุนไพรที่มีสารประกอบอิสระตัวใดที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งในการทำงานของโปรตีน NS1 นอกจากนั้นเทคนิค RNA binding assay ที่ได้พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้สามารถพัฒนาใช้เป็นเทคนิคในการทดสอบสำหรับการค้นหาสารประกอบตั้งต้นอื่นๆ ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนกเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านไวรัสต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จุฑาทิรัตน์ ลิดจันทร. 2551. การพัฒนาเชื้อไวรัสวัคซีนไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยเทคนิค reverse genetic (rgH5N1). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฐานข้อมูลสมุนไพร (Thai Herb Database). <http://www.thaiherb.most.go.th/?q=herb%20> (2010). 10 ธันวาคม 2553.

พรทิพา เล็กเจริญสุข. 2550. บทบาทของวัคซีนในการควบคุมและป้องกันโรคไข้หวัดนก. สัมนาวิชาการไข้หวัดนก ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์กิตติวรรณการพิมพ์, นครปฐม.

_____, เฉลิมพล เล็กเจริญสุข, ทิพย์วรรณ ธนไพศาล และ วันทนีย์ ทมมิต. 2549. บทบาทของวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนกชนิดรุนแรงสายพันธุ์ H5N1 เพื่อการควบคุมโรคในสัตว์ปีกสำหรับประเทศไทย. บริษัทโรงพิมพ์อัมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ

สำนักงานเศรษฐกิจการคลัง กระทรวงพาณิชย์. 2548. ผลกระทบของไข้หวัดนกต่อเศรษฐกิจไทย. มีนาคม 2548.

Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J. and Nieto, A. 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. **Mol Cell Biol.** 20: 6259–6268.

Bairoch, A., B. Boeckmann, S. Ferro and E. Gasteiger. 2004. Swiss-Prot: juggling between evolution and stability. **Brief Bioinform.** 5 (1): 39-55.

Basu, D., M. P. Walkiewicz, M. Frieman, R. S. Baric, D. T. Auble and D. A. Engel. 2009. Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. **J Virol.** 83 (4): 1881-91.

- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell and E. W. Sayers. 2009. GenBank. **Nucleic Acids Res.** 37 (Database issue): D26-31.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne. 2000. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.** 28 (1): 235-42.
- Biswas, K., A. Kumar, A. B. Bhavin, K. Prabhu and S. S. Ramachandra. 2010. Hepatoprotective effect of leaves of *Peltophorum pterocarpum* against paracetamol Induced acute liver damage in rats. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy.** 001, 10-15.
- Biswas, S. K., P. L. Boutz and D. B. Nayak. 1998. Influenza virus nucleoprotein interaction with Influenza virus polymerase protein. **Journal of virology.** 72(7): 5493-5501.
- Bornholdt Z. A. and B. V. Prasad. 2006. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. **Nat Struct Mol Biol.** 13(6):559-60.
- _____. 2008. X-ray structure of NS1 from a highly pathogenic H5N1 influenza virus. **Nature.** 456(7224):985-8.
- Burgui I., Aragón T, Ortín J and Nieto A. 2003. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. **J Gen Virol.** Dec; 84 (Pt 12):3263-74.
- Casalegno, J.S., M. Bouscambert-Duchamp, V. Caro, I. Schuffenecker, M. Sabatier, A. Traversier, M. Valette, B. Lina, O. Ferraris and V. Escuret. 2010. Oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) viruses in south of France, 2007/2009. **Antiviral Res.** 87 (2): 242-8.

- Castiglioni, P., D. S. Hall, E. L. Jacovetty, E. Ingulli and M. Zanetti. 2008. Protection against influenza A virus by memory CD8 T cells requires reactivation by bone marrow derived dendritic cells. **J Immunol.** 180, 4956–4964.
- Chen, Z., Li, Y., Krug, RM. 1999. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. **EMBO J.** 18: 2273–2283.
- Cheng, A., S. M. Wong, Y. A. Yuan. 2009. Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. **Cell Research.** 19:187-195.
- Chien, C., Y. Xu, R. Xiao, M. J. Aramini, V. P. Sahasrabudhe, M. R. Krug and T. G. Montelione. 2004. Biophysical Characterization of the Complex between Double-Stranded RNA and the N-Terminal Domain of the NS1 Protein from Influenza A Virus: Evidence for a Novel RNA-Binding Mode. **Biochemistry.** 43,1950-1962.
- Chutinimitkul, S., T Songserm, A Amonsin, S. Payungporn, K. Suwannakarn, S. Damrongwatanapokin, A. Chaisingh, B. Nuansrichay, T. Chieochansin, A. Theamboonlers, Y. Poovorawan. 2007. New strain of influenza A virus (H5N1), Thailand. **Emerg. Infect. Dis.** 13, 506–507.
- Collins, P.J., L. F. Haire, Y. P. Lin, J. Liu, R. J. Russell, P. A. Walker, J. J. Skehel, S. R. Martin, A. J. Hay and S. J. Gamblin. 2008. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. **Nature.** 453 (7199): 1258-61.
- Das, K., J. M. Aramini, L. C. Ma, R. M. Krug and E. Arnold. 2010. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets (Review). **Nat Struct Mol Biol.** 17 (5): 530-8.
- Davidson, A. R. 2008. A folding space odyssey. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 105(8), 2759–2760.

- Deyde, V.M., X. Xu, R. A. Bright, M. Shaw, C. B. Smith, Y. Zhang, Y. Shu, L. V. Gubareva, N. J. Cox, and A. I. Klimov. 2007. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A(H1N1) viruses isolated world wide. **J Infect Dis.** 196 (2): 249-257.
- Dias, A.,D. Bouvier, T. Crepin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack and R.W. Ruigrok. 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. **Nature.** 458: 914-918.
- Dominguez, C., R. Boelens and A. M. Bonvin. 2003. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. **J Am Chem Soc.** 125 (7):1731-7.
- Dongzi LIN, Jingfang LAN, Zhizhen ZHANG. 2007. Structure and Function of the NS1 Protein of Influenza A Virus. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica** 39 (3) , 155–162.
- Ehrhardt, C., T. Wolff, S. J. Ludwig. 2007. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by the nonstructural NS1 protein is not conserved among type A and B influenza viruses. **Virology.** 81(21):12097-100.
- Fernandez-Sesma, A., S. Marukian, B. J. Ebersole, D. Kaminski, M. S. Park, T. Yuen, S. C. Sealfon, A. Garcia-Sastre and T. M. Moran. 2006. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. **J Virology.** 80, 6295–6304.
- Ferraris, O. and B. Lina. 2008. Mutation of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. **Journal of clinical virology.** 41: 13-19.
- Fodor, E., L. J. Mingay and M. Crow. 2003. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. **J Virology.** 77: 5017-5020.

- Fodor, E., P. Fechter, M. Crow, T. Deng, L. Mingay, J. Sharps and G. G. Brownlee. 2004. Mutational analysis of the PA and PB2 subunits of the influenza RNA polymerase complex leads to new insights into function. **International congress series**. 1263: 25-28.
- Friesner, R. A., J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis and P. S. Shenkin. 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **J Med Chem**. 47(7):1739-49.
- Gabriel, G., B. Dauber, T. Wolff, O. Planz, H. D. Klenk and J. Steach. 2005. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. **PNAS**. 102: 18590-18595.
- García M.A., J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas and M. Esteban. 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action (Review). **Microbiol Mol Biol Rev**. 70 (4): 1032-60.
- García-Sastre A., 2002. Mechanisms of inhibition of the host interferon α/β -mediated antiviral responses by viruses. **Microbes Infect**. 4(6): 647-655.
- García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P, Muster T. 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. **Virology**. Dec 20;252(2):324-330.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel and A. Bairoch. 2003. ExPASy: The proteomics server for indepth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res**. 31(13): 3784-8.
- Girard, M. P., T. Cherian. Y. Pervikov and M. P. Kieny. 2005. A review of Vaccine research and Development: Human acute respiratory infections. **Vaccine**. 23: 5708-5724.

- Girard M.P, Tam JS, Assossou OM, Kiény MP. 2010. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. **Vaccine**. Jul 12;28(31): 4895-902.
- Glass, R. J., L. M. Glass, W. E. Beyeler and H. J. Min. 2006. Targeted Social Distancing Design for Pandemic Influenza. **Emerg Infect Dis**. 12 (11): 1671-81.
- Goodsell, D. S., and A. J. Olson, 1990. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. **Proteins** .8 (3), 195–202.
- Grover, J.K., S. Yadav and V. Vats. 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology** 81, 81–100.
- Guo, Z., L. M. Chen, H. Zeng, J. A. Gomez, J. Plowden, T. Fujita, J. M. Katz, R. O. Donis and S. Sambhara. 2007. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 36(3): 263-9.
- Hale, B.G., R. E. Randall, J. Ortín and D. Jackson. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses (Review). **J Gen Virol**. 89(Pt 10): 2359-2376.
- Hara, K., M. Shiota and H. Kido. 2001. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. **Genes Cells**. 6: 87-97.
- He, X., J. Zhou and M. Bartlam. 2008. Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. **Nature**. 454: 1123-1126.
- Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R.G. Webster and D. R. Perez. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A virus. **Arch Virol**. 146: 2275-2289.

Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzózka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K.

Conzelmann, M. Schlee, S. Endres and G. Hartmann. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. **Science**. 314 (5801): 994-7.

Hu, X., D. Liu, M. Wang, L. Yang, M. Wang, Q. Zhu, L. Li and G. F. Gao. 2011. Clade 2.3.2

Avian Influenza Virus (H5N1), Qinghai Lake Region, China, 2009-2010. **Emerg Infect Dis**. 17(3):560-562.

Huarte, M., A. Falcon and Y. Nakaya. 2003. Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. **J Virol**. 77: 6007-6013.

Hubbard, E. R. 2010. Structure based drug discovery.

<http://www.york.ac.uk/chemistry/staff/academic/h-n/rhubbard/>. March 20, 2011

Hulse-Post, D. J., J. Franks and K. Boyd. 2007. Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks. **J Virol**. 81: 8515-8524.

Hwang J.K., J.S. Shim and Y.R. Pyun. 2000. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. **Fitoterapia**. 71, 321-323.

Hyland, L., R. Webby, M. R. Sandbulte, B. Clarke and S. Hou. 2006. Influenza virus NS1 protein protects against lymphohematopoietic pathogenesis in an in vivo mouse model. **Virology**. 349, 156-163.

Isin, B., P. Doruker and I. Bahar. 2002. Functional motion of influenza virus hemagglutinin: a Structure-base analytical approach. **Biophysical Journal**. 82: 569-581.

- Jeenapongsa, R., K. Yoovathaworn, K. M. Sriwatanakul, U. Pongprayoon and K. Sriwatanakul. 2003. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**. 87 (2003) 143-148.
- Jihong, Y., L. Shaozhong, S. Jingfeng, M. Kobayashi, J. Akaki, K. Yamashita, M. Tamesada and T. Umemura. 2011. Effects of *Salacia chinensis* extract on reproductive outcome in rats. **Food and Chemical Toxicology**. 49 (2011) 57–60.
- Jones, G., P. Willett and R. C. Glen. 1995. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. **J. Comput. Aided. Mol.** 96, 532–549.
- Kang, H. M., D. Batchuluun, M. C. Kim, J. G. Choi, T. O. Erdene-Ochir, M. R. Paek, T. Sugir, R. Sodnomdarjaa, J. H. Kwon, Y. J. Lee. 2011. Genetic analyses of H5N1 avian influenza virus in Mongolia, 2009 and its relationship with those of eastern Asia. **Vet Microbiol.** 147 (1-2):170-175.
- Kang, J., M. S. Lee and D. G. Gorenstein. 2006. Chemiluminescence-based electrophoretic mobility shift assay of heparin-protein interactions. **Anal Biochem.** 349 (1): 156-8.
- Kim, H.R., C. K. Park, Y. J. Lee, G. H. Woo, K. K. Lee, J. K. Oem, S. H. Kim, Y. H. Jean, Y. C. Bae, S. S. Yoon, I. S. Roh, O. M. Jeong, H. Y. Kim, J. S Choi, J. W. Byun, Y. K. Song, , J. H. Kwon and Y. S. Joo. 2010. An outbreak of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Korea, 2008. **Vet. Microbiol.** 141, 362–366.
- Kochs, G., A. García-Sastre and L. Martínez-Sobrido. 2007. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. **J Virol.** 81 (13): 7011-21.
- Krug, R. M., and J. M. Aramini. 2009. Emerging antiviral targets for influenza A virus. **Trends Pharmacol Sci.** 30(6):269-77.

- Kuo, R. L and R. M. Krug. 2009. Influenza a virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells. **J Virol.** 83: 1611-1616.
- Lackenby, A., O. Hungnes, S. G. Dudman, A. Meijer, W. J. Paget, A. J. Hay and M. C. Zambon. 2008. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. **Euro Surveill.** 13(5). pii: 8026.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics.** 23 (21): 2947-8.
- Lekcharoensuk, P. 2008. Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1 Virus in Asia: Evolution and Vaccination. **Vet. World.** 1 (12): 368-374.
- Lewis, D. B. 2006. Avian flu to human influenza. **Annu. Rev. Med.** 57: 139-154.
- Li, K.S., Y. Guan , J. Wang , G. J. Smith , K. M. Xu, L. Duan, A.P. Rahardjo , P. Puthavathana , C. Buranathai , T.D. Nguyen , A.T. Estoepangestie , A. Chaisingh , P. Auewarakul, H.T. Long , N.T. Hanh , R.J. Webby , L.L. Poon , H. Chen, K.F. Shortridge, K.Y. Yuen , R.G. Webster and J.S. Peiris .2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. **Nature.** 430 (6996): 209-13.
- Li, M. L, P. Rao. and R. M. Krug. 2001. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. **Embo J.** 20: 20780-2086.
- Lipatov, A.S., E. A. Govorkova, R.J. Webby, H. Ozaki, M. Peiris, Y. Guan, L. Poon, R.G. Webster. 2004. Influenza: emergence and control. **J Virol.** 78 (17): 8951-9.
- Lin, D., J. Lan and Z. Zhang. 2007. Structure and Function of the NS1 Protein of Influenza A Virus. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica.** 39(3): 155-162

- Liu, J., Lynch, A.P., Chien, C-Y., Montelione, T.G., Krug M.R. and Berman, M.H. 1997. Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. **Nature structural biology**. 4 (11): 869-899.
- Liu, T. and Z. Ye. 2004. Alteration of the basic amino acid domain of wild-type matrix protein reduced influenza virus replication at non-permissive temperature. **International Congress Series**. 1263: 83– 89.
- Liu, Y., Z. Lou, M. Bartlam and Z. Rao. 2009. Structure-function studies of the influenza virus RNA polymerase PA subunit (Review). **Sci China C Life Sci**. 52(5):450-8.
- Lu, Y., Wambach, M, Katze MG, Krug RM. 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. **Virology**. Dec 1; 214(1):222-8.
- Martin, J. 2000. Designer medicines molecules of the future. **Annual symposium**. Australian Academy of science
- Min, J.Y. and R. M. Krug. 2006. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 103(18):7100-5.
- Mogensen, T. H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev**. 22: 240-273.
- Nemeroff, M.E., S. M. Barabino, Y. Li, W. Keller and R. M. Krug. 1998. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. **Mol Cell**. 1 (7): 991-1000.

- Nemeroff, M.E., U. Utans, A. Krämer and R. M. Krug. 1992. Identification of cis-acting intron and exon regions in influenza virus NS1 mRNA that inhibit splicing and cause the formation of aberrantly sedimenting presplicing complexes. **Mol Cell Biol.** 12 (3): 962-70.
- Noah DL, K. Y. Twu and R. M. Krug. 2003. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. **Virology.** 307(2): 386-95.
- Obayashi, E., H. Yoshida and F. Kawai. 2008. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. **Nature.** 454: 1127-1131.
- Palease, P. and M. L. Show. 2007. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication, pp. 1647-1689. In D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. **Field virology.** Lippincott William & Wilkins, Philadelphia.
- Pappaioanou M. 2009. Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus: Cause of the next pandemic?. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases.** 32. 287-300.
- Pearson, W. R. 1990. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. **Methods Enzymol.** 183, 63-98.
- Portela, A. and P. Digard. 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication, **Journal of General Virology.** 83: 723-734.
- Puthavathana, P., P. Auewarakul, P. C. Charoenying, K. Sangsiriwut, P. Pooruk, K. Boonnak, R. Khanyok, P. Thawachsupa, R. Kijphati and P. Sawanpanyalert 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. **J Gen Virol.** 86 (Pt 2): 423-33.

- Qiu, Y. and Krug, R. M. 1994. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). **J Virol.** 68: 2425–2432.
- Randall, R. E. and S. Goodbourn. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures (Review). **J Gen Virol.** 89 (Pt 1):1-47.
- Regan, J. F., Y. Liang and T. G. Parslow. 2006. Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA. **J Virol.** 80: 252-261.
- Richard, M., C. Deléage, M. Barthélémy, Y. P. Lin, A. Hay, B. Lina and O. Ferraris. 2008. Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase to neuraminidase inhibitors. **J Clin Virol.** 41(1):20-4.
- Ruigrok, R. W., T. Crépin, D.J. Hart and S. Cusack. 2010. Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. **Curr Opin Struct Biol.** 20 (1): 104-13.
- Saijo S, Kishishita S., Kamo-Uchikubo T., Terada T., Shirouzu M., Ito H., Ito T., Yokoyama S. To be Published. Crystal structure of RNA-binding domain of NS1 from influenza A virus A/crow/Kyoto/T1/2004(H5N1)
- Saxena, A., D. Wong, K. Diraviyam and D. Sept. 2009. The basic concepts of molecular modeling. **Methods Enzymol.** 2009. 467: 307-34.
- Schmolke, M., and A. García-Sastre. 2010. Evasion of innate and adaptive immune responses by influenza A virus (Review). **Cell Microbiol.** 12 (7): 873-80.
- Schueler-Furman, O., C. Wang, P. Bradley, K. Misura and D. Baker. 2005. Progress in modeling of protein structures and interactions (Review). **Science.** 310 (5748): 638-42.

- Seo, S.H., E. Hoffmann and R. G. Webster. 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape host antiviral cytokine responses. **Nat Med.** 8 (9): 950-4.
- Silverman, R. H. 2007. Viral encounters with 29,59-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. **J Virol.** 81, 12720–12729.
- Subbaro, K. and T. Joseph. 2007. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. **Nature review.** 7: 267-278.
- Subramaniam, S. 1998. The biology workbench A seamless database and analysis environment for the biologist. **Proteins.** 32(1), 1-2.
- Suwannakarn K, A. Amonsin , J. Sasipreeyajan, P. Kitikoon, R. Tantilertcharoen, S. Parchariyanon, A. Chaisingh, B. Nuansrichay, T. Songserm, A. Theamboonlers and Y. Poovorawan. 2009. Molecular evolution of H5N1 in Thailand between 2004 and 2008. **Infect Genet Evol.** 9(5):896-902.
- Twu, KY., Noah, DL., Rao, P., Kuo, RL and Krug, RM. 2006. The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. **J Virol.** 80: 3957-3965.
- Twu, K. Y., R. L. Kuo, J. Marklund and R. M. Krug (2007). The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. **J Virol.** 81, 8112–8121.
- Valsaraj, R., P. Pushpangadan, U. W. Smitt, A. Adersen, S. B. Christensen, A. Sittie, U. Nyman, C. Nielsen, and C. E. Olsen. 1997. New Anti-HIV-1, Antimalarial, and Antifungal Compounds from *Terminalia bellerica*. **J. Nat. Prod.** 60, 739-742.
- Voigt, J.H., B. Bienfait, S. Wang and M. C. Nicklaus. 2001. Comparison of the NCI open database with seven large chemical structural databases. **J Chem Inf Comput Sci.** 41 (3): 702-12

- Vriend, G. 1990. WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. **J. Mol. Graph.** 8 (1), 52-56.
- Wang, Q. and G. G. Carmichael. 2004. Effects of length and location on the cellular response to double-stranded RNA (Review). **Microbiol Mol Biol Rev.** 68 (3): 432-52.
- Wang, W. and Krug, RM. 1998. U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6 snRNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein. **RNA.**, 4: 55–64.
- Wang, W., K. Riedel, P. Lynch, C. Y. Chien, G. T. Montelione and R. M. Krug. 1999. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. **RNA.** 5: 195-205.
- Wang X, C.F. Basler, B.R. Williams, R.H. Silverman, P. Palese and A. Garcia-Sastre . 2002. Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. **J Virol.** Dec; 76(24):12951-62.
- Williams, J.A., Y. S. Choe, M. J. Noss, C.J. Baumgartner and V. A. Mustad. 2007. Extract of *Salacia oblonga* lowers acute glycemia in patients with type 2 diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition.** 86 (1), 124–130.
- World Health Organization (WHO). 2005. Global Inuenza Program Surveillance Network. Evolution of HN1 avian inuenza viruses in Asia. **Emerg Inf Dis.** 11: 1515–21.
- _____. 2007. Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR): towards a unified nomenclature system for the highly patho-genic H5N1 avian influenza viruses (<http://www.who.int/csr/disease/influenza/nomen.ppt>).

- Ye, Z., T. Liu, D. P. Offringa, J. McInnis and R. A. Levandowski. 1999. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. **J Virol.** 73(9):7467-73.
- Yin C., Khan J., Swapna G, Ertekin A., Krug R., Tong L., and Montelione G. 2007. Conserved Surface Features Form the Double-stranded RNA Binding Site of Non-structural Protein 1 (NS1) from Influenza A and B Viruses. **J. Biol. Chem.**, Vol. 282, Issue 28, 20584-20592.
- Yoshikawa, M., F. Xu, S. Nakamura, T. Wang, H. Matsuda, G. Tanabe and O. Muraoka. 2008. Salaprinol and ponkoranol with thiosugar sulfonium sulfate structure from *Salacia prinoidea* and α -glucosidase inhibitory activity of ponkoranol and kotalanol desulfate. **Heterocycles.** 75 (6), 1397–1405.
- Yuan, P., M. Bartlam, Z. Lou, S. Chen, J. Zhou, X. He, Z. Lv, R. Ge, X. Li and T. Deng. 2009. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA (N) reveals an endonuclease active site. **Nature.** 458:909-913.
- Zhirnov, O. P., T. E. Konakova, T. Wolff and H. D. Klenk. 2002. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. **J Virol.** 76 (4): 1617-25.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นาย กรภพ คล้ายวงษ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	นนทบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สัตวศาสตร์ และเทคโนโลยีการเกษตร) นิสิต
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.