การตรวจหา การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะ และการถอดรหัส ของสารพันธุกรรมของไวรัสพิษสุนัขบ้า

นายจตุรพร พรศิลปทิพย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-297-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17966477

DETECTION, CHARACTERIZATION AND TRANSCRIPTIONAL EVENTS OF RABIES VIRUS GENES

MR. JATURAPORN PORNSILAPATIP

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy
Program of Biological Science
Graduate School
Chulalongkorn University
1995

ISBN 974-632-297-4

Thesis Title	Detection, Characterization and Transcriptional Events of Rabies Virus Genes
By	Mr. Jaturaporn Pornsilapatip
Department	Biological Science
Advisory Committee	Assoc. Prof. Siriporn Sittipraneed, Ph.D. Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D. Ltc. Suwicha Chitpatima, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor of Philosophy 's Degree.

Santi Thoongsuwan
Dean of Graduate School
(Assoc. Prof. Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

Tipaporn Limpaseni
Chairman
(Assist. Prof. Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

Siriporn Sittipraneed
Advisory committee
(Assoc. Prof. Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

Vichien Rimphanitchayakit
Advisory committee
(Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

S. Chitpatima
Advisory committee
(Ltc. Suwicha Chitpatima, Ph.D.)

A. Tassanakajon
Member
(Assist. Prof. Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

Sukathida Ubol
Member
(Sukathida Ubol, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จตุรพร พรศิลปทิพย์ : การตรวจหา การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะ และการถอดรหัสของสารพันธุกรรมของไวรัสพิษสุนัขบ้า (DETECTION CHARACTERIZATION AND TRANSCRIPTIONAL EVENTS OF RABIES VIRUS GENES) คณะกรรมการที่ปรึกษา : รศ. ดร. ศิริพร สิทธิประณีต, อ. ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ และ ดร. สุวิชา จิตรปฏิมา, พ.ท., 90 หน้า. ISBN 974-632-297-4

การสังเคราะห์อาร์เอนเอภายในเซลของไวรัสพิษสุนัขบ้านั้นยังไม่มีการศึกษากันมากนักเนื่องจากความรุนแรงของการติดเชื้อ การวิเคราะห์คุณลักษณะเฉพาะของการถอดรหัสของไวรัสพิษสุนัขบ้าทำให้สามารถอธิบายกลไกการจำลองตนเองของไวรัสได้กระจ่างขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในความเข้าใจการเกิดพยาธิสภาพ การป้องกันและการรักษา ในการที่จะเข้าใจอณูพันธุศาสตร์ของไวรัสพิษสุนัขบ้านั้น จำเป็นต้องมีมาตรการในการตรวจหาที่เหมาะสมเช่น วิธีไฮบริไดเซชันด้วยสารปลอดรังสี และ การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยพัฒนาวิธีการเหล่านี้เพื่อการเฝ้าสังเกตอาร์เอนเอของไวรัสพิษสุนัขบ้าที่เกิดขึ้นในเซลเพาะเลี้ยงบีเอชเค ตลอดจนวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของการถอดรหัสสารพันธุกรรมในขั้นปฐมภูมิ นอกจากนี้เพื่อจะได้ประยุกต์การพัฒนาวิธีไฮบริไดเซชันไปใช้ในการวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าจากตัวอย่างชีวภาพ

โดยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ร่วมกับการออกแบบพรามเมอร์ที่จำเพาะ ทำให้สามารถสร้างโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสมซึ่งประกอบด้วยชิ้นส่วนของยีนโครงสร้างของไวรัสพิษสุนัขบ้าได้สำเร็จ พลาสมิดลูกผสมเหล่านี้ ได้แก่ pRAB-N, pRAB-G, pRAB-NS, pRAB-M และ pRAB-L ซึ่งจำลองมาจากส่วนของยีน N, G, NS, M และ L ตามลำดับ พลาสมิดลูกผสมเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นตัวติดตามเพื่อตรวจหาชิ้นจำเพาะนั้นๆด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน โดยสามารถตรวจหาอาร์เอนเอของไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ในปริมาณต่ำที่ 0.2-1.5 นาโนกรัม ในการศึกษาเบื้องต้นพบว่า วิธีไฮบริไดเซชันสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาไวรัสจากอาร์เอนเอของสมองสุนัขได้ และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจโดยการย้อมไวรัสด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากสารฟลูออเรสเซนต์ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงว่าวิธีไฮบริไดเซชันมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปใช้ในการวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าได้

โดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสทำให้สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์จากการถอดรหัสของยีนโครงสร้างในขั้นปฐมภูมิครบทั้งหมดภายหลังการปลูกเชื้อไวรัสแล้ว 5 ชั่วโมง พบลำดับของการถอดรหัสในขั้นปฐมภูมิเริ่มต้นจากยีน N, L, NS, M และ G ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การสังเคราะห์อาร์เอนเอของไวรัสพิษสุนัขบ้าเริ่มต้นที่บริเวณโปรโมเตอร์ของแต่ละยีนเป็นอิสระจากกัน

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต จตุรพร พรศิลปทิพย์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวเพียงแผ่นเดียว

##C225018 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCE
KEY WORD: RABIES VIRUS GENES / TRANSCRIPTIONAL EVENTS / DETECTION
JATURAPORN PORNSILAPATIP : DETECTION, CHARACTERIZATION AND TRANSCRIPTIONAL EVENTS OF RABIES VIRUS GENES. ADVISORY COMMITTE : ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D. and SUWICHA CHITPATIMA, Ph.D., Ltc., 90 pp.
ISBN 974-632-297-4

In vivo RNA synthesis of rabies virus has been studied on a limit scale due to the virulence of the infectious particle. Characterizaiton of rabies transcription may contribute to the understanding of the mode of viral replication. The knowledge may be a significant information in rabies pathogenesis, prevention and perhaps in antiviral therapy. To understand the molecular basis of rabies virus genes, the detection technique such as non-radioactive dot hybridization and Polymerase chain reation (PCR) were developed in order to use as tools for examining the rabies RNA species in infected-BHK cells and for characterization the primary transcription of rabies virus genome as well. In addition, the use of dot hybridization was preliminarily assessed in diagnosis of street rabies virus in biological specimen.

Each structural gene portions of rabies virus were successfully cloned via PCR technique by specific primer designs and subsequently subcloned into *Sma*I site of pGEM-3Z plasmic vector. The recombinant plasmids named pRAB-N, pRAB-G, pRAB-NS, pRAB-M and pRAB-L, were derived from rabies structural genes: N, G, NS, M and L, respectively and were served as gene-specific probes in dot hybridization. These rabies cDNA probes were able to detect as low as 0.2-1.5 ng of rabies specific RNA. Preliminary studies of dot hybridization for rabies diagnosis of RNA from canine brain showed a paralell correlatcn with the standard fluorescent antibody test. These data indicate that the use of non-radioactive dot hybridization system has great potential for diagnosis of rabies virus.

Primary transcription was complete by presence of 5 viral transcript species within 5 hour postinfection. The order of primary transcription intiated from gene N to L, NS, M, and G respectively. Result suggests that mRNA synthesis start at different promoter sites.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต อุดรพร ทรัพย์ลภาพ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สิริพร สิทธิประสิทธิ์

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิ. ชิ. ชิ

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere and deepest gratitude to my advisory committe: Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed and Dr. Vichien Rimphanitchayakit at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, and Ltc. Dr. Suwicha Chitpatima at Department of Biochemistry, Pramongkutklao College of Medicine; for their excellent supervision, guidance and encouragements throughout this work. Without their virtues, this work would not have been accomplished.

I am very grateful to Asssit. Prof. Dr. Tipaporn Limpaseni and Assist. Prof. Dr. Anchalee Tassanakajorn, at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, and Dr. Sukatida Ubol at Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, for serving as thesis commitee and for their valuable suggestions and criticisms.

I am really indebted to Molecular Biology Unit, Department of Biochemistry, Pramongkutklao College of Medicine, for providing all kinds of laboratory facilities and fundings throughout this work, and to the National Center of Genetic Engineering and Biotechnology for some financial support.

Sincere appreciation is expressed to Research and Development Unit, Oueen Saovabha Memorial Institue, The Thai Red Cross Society, especially Mrs. Pakamas Kaoplod and Ms. Songsri Kasempimolporn, for providing rabies virus strain and kindly suggestion for viral culture technique, and to Rabies unit, Department of Livestock Promotion, Ministry of Agriculture and cooperation, for providing canine brain samples in the current study.

Special thanks are presented to Col. Dr. Dhana Settachan, Department of Biochemistry, Pramonkutklao College of Medicine, for his valuable suggestions, criticisms and technical advices as copreceptor, and to Lt. Unchalee Visawapoka for her friendly collaboration, kindly assistances and valuable suggestions.

Finally, I wish to express my infinite thanks to my mother and my sister for their permanent love, kindness, supports, encouragement and understanding.

TABLE OF CONTENTS

page

Abstract (Thai)..... iv
Abstract (English)..... v
Acknowledgement..... vi
List of tables..... ix
List of figures..... x
Abbreviations..... xii
Chapters
1. Introduction..... 1
Objective..... 4
2. Literature
Classification and morphology of rabies virus..... 5
Propagation and assay in cell culture..... 6
Rabies virus genome..... 8
Structure and function of rabies virus proteins..... 12
Rabies virus membrane..... 19
Replicative cycle of rabies virus..... 19
Transcription of rabies virus..... 20
Detection of rabies virus..... 22
3. Materials and methods
Instruments..... 28
Chemical agents..... 29
Virus and cell culture..... 29
Cytoplasmic RNA isolation from cell grown in tissue culture..... 30
Electrophoresis of RNA through gel containing formaldehyde..... 30
Hybridization and detection of rabies nucleic acids by oligonucleotide probes..... 31
Primers and probes..... 32
PCR amplification of rabies virus genes..... 32
Development of rabies cDNA probes..... 35
DNA transformation..... 37
Restriction digestion of recombinant plasmids..... 37
Prepartion of RNA-DNA dot hybridization..... 38
RNA-DNA dot hybridization of rabies probes..... 38
Preparation of RNA-free rabies virus seed..... 39
Synchronization of BHK-21 cell culture..... 39
Determination of transcriptional events of

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

rabies virus..... 39

4. Results
Isolation of cytoplasmic RNA..... 41
PCR amplification of specific rabies genes..... 41
Construction of rabies cDNA probes..... 45
Characterization of rabies cDNA probes..... 47
Specificity and sensitivity of the probes..... 47
Application of rabies probes for diagnosis..... 54
Synchronization of BHK-21 cells..... 63
Characterization of the transcriptional events of rabies virus..... 63
5. Discussions..... 67
6. Summary..... 74
References..... 76
Appendixes
Appendix A..... 84
Appendix B..... 86
Appendix C..... 89
Bibiography..... 90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table page

1 Location and nucleotide length of rabies mRNA sequences..... 11
2 Primers for PCR amplification..... 33
3 Probes for detection of rabies virus genes..... 34

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		page
1	Drawing of rabies virus and helical nucleocapsid core	7
2	Organization of rabies virus genome	9
3	Comparison of deduced amino acid sequences of rabies virus proteins	14
4	Comparison of rabies viral glycoprotein	17
5	Transcriptional and replicative mechanisms of the rabies virus genome	21
6	Models for Rhabdovirus mRNA synthesis	23
7	pGEM-3Z vector map	36
8	Gel electrophoresis of RNA isolated from BHK-21 cells	42
9	Northern blot analysis of RNA	43
10	PCR amplification of rabies virus RNA	44
11	Southern blot analysis of PCR amplification products	46
12	.PCR screening for transformants carrying rabies M-cDNA sequence	48
13	Dot-hybridization analysis of PCR cloning	49
14	Analysis of rabies recombinant plasmids	50
15	Southern blot analysis of rabies recombinant plasmids	51
16	Dot hybridization of rabies viral RNA detected by chemilluminscent- labelled pRAB-N probe	52
17	Dot hybridization of rabies viral RNA detected by chemilluminscent-labelled pRAB-G probe	53
18	Dot hybridization of rabies viral RNA detected by chemilluminescent-labelled pRAB-NS probe	55
19	Dot hybridization of rabies viral RNA detected by chemilluminscent-labelled pRAB-M probe	56
20	Dot hybridization of rabies viral RNA detected by chemilluminscent-labelled pRAB-L probe	57
21	Dot-hybridization of RNA extract from canine brain samples detected by chemilluminescent-labelled pRAB-N probe	58
22	Dot-hybridization of RNA extract from canine brain samples detected by chemilluminescent-labelled pRAB-G probe	59
23	Dot-hybridization of RNA extract from canine brain samples detected by chemilluminescent-labelled pRAB-NS probe	60

24 Dot-hybridization of RNA extract from canine brain samples detected by chemilluminescent-labelled pRAB-M probe..... 61
25 Dot-hybridization of RNA extract from canine brain samples detected by chemilluminescent-labelled pRAB-L probe..... 62
26 Rate of ^{3}H-uridine incorporation into BHK-21 cells..... 64
27 Transcriptional events of rabies viral genes characterized by RNA-PCR technique..... 65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

µl	microliter (10^{-3} ml)
ml	milliliter (10^{-3} l)
l	liter
pg	picogram (10^{-12} gm)
ng	nanogram (10^{-9} gm)
µg	microgram (10^{-6} gm)
mg	milligram (10^{-3} gm)
gm	gram
sec	second
min	minute
hr	hour
°C	degree Celcius
µM	micromolar (10^{-6} M)
mM	millimolar (10^{-3} M)
M	molar
nm	nanometer
kDa	kilodalton
Da	dalton
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytosine 5'-triphosphate
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
cDNA	complementary DNA
mRNA	messenger RNA
RNase	ribonuclease
ECL	enhance chemilluminescence
$TCID_{50}$	tissue culture infection dose at 50% end point titration
m.o.i.	multiplicity of infection
PCR	polymerase chain reaction
EDTA	ethylenediamine tetra acetic acid
DTT	dithiothreitol
IPTG	isopropylthio-β-D-galactoside
LB	Luria-Bertani media
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PBS	phosphate-buffered saline

PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
POPOP	1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl) benzene
PPO	2,5 diphenyloxazole
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC (1X)	saline sodium citrate (0.15M sodium chloride, 0.15M sodium citrate, pH 7.0)
TCA	trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N' -tetramethylethylene diamine
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย