

การโคลนนิ่งดีเอ็นเอแคปซิดของไวรัสเดงกี โดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม

Cloning of Dengue Virus Capsid DNA by using recombinant DNA technology

เจนจูรี เนตรสว่าง^{1,2} ปรัชญา หาญเสือเหลือง¹ ปิยวดี จุฑากาญจน์¹ สำออง มุระภา¹ สุภาพร คำพา¹
และ อุดมศิลป์ สุทธิสม¹

¹ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี 12000

² หน่วยอนุชีววิทยาทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

บทคัดย่อ

ไข้เลือดออกเดงกีจัดเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขในประเทศไทย ซึ่งเกิดมาจากเชื้อไวรัสเดงกี และมีุงเป็นพาหะ โปรตีนแคปซิดของไวรัสเดงกี (DENV C) มีหน้าที่ประกอบเป็นโครงสร้างของไวรัส สามารถพบได้ทั้งในไซโทพลาสซึม และนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ คณะผู้วิจัยได้พบว่า โปรตีนแคปซิดของเดงกีกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) นอกจากนี้ การเข้านิวเคลียสของเซลล์ของโปรตีนแคปซิดชนิดดั้งเดิม (WT DENV C) ส่งผลให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสด้วย ในขณะที่โปรตีนแคปซิดชนิดมิวเตชัน (mutant DENV C) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของยีนที่นำเข้านิวเคลียส ทำให้โปรตีนแคปซิดส่วนใหญ่คงอยู่ในไซโทพลาสซึม และส่งผลให้การตายแบบอะพอพโทซิสลดลง จากงานวิจัยที่ผ่านมาประสบปัญหาการนำยีนแคปซิดเข้าสู่เซลล์ได้น้อย เนื่องจากผนังเซลล์มีความหนา ดังนั้นคณะผู้วิจัยมีความมุ่งหมายเพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีนแคปซิด ที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาเทคนิคการถ่ายทอดพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ โดยอาศัยความสามารถของ retrovirus ซึ่งจะเข้าสู่เซลล์คล้ายกับการติดเชื้อไวรัส โดยสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีนแคปซิดกับ retroviral vector ซึ่งอาศัยวิธีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant technology) และทำการตรวจสอบลำดับเบส ผลการทดลองพบว่า คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างพลาสมิดลูกผสมทั้ง WT DENV C และ mutant DENV C โดย WT DENV C มีลำดับเบสถูกต้อง เมื่อเทียบกับต้นแบบ ส่วน mutant DENV C มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ จาก 47 Tyrosine ไปเป็น Phenylalanine ซึ่งอยู่ในกลุ่ม aromatic R group เหมือนกัน ทำให้อาจถูกจับอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยต้องทำการทดสอบต่อไปในระดับโปรตีน และตำแหน่งที่อยู่ในเซลล์ตัวเลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งจะต้องสอดคล้องกับยีนแคปซิดต้นแบบทั้งชนิดดั้งเดิม และชนิดที่มีมิวเตชัน

คำสำคัญ: โปรตีนแคปซิดของไวรัสเดงกี Retrovirus เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม

Abstract

Dengue virus infection has been classified into major health problems in Thailand. It is caused by the dengue virus, which is a mosquito-borne virus. Dengue virus capsid protein (DENV C) forms a structural component of the virus and locates in both cytoplasm and nucleus of infected cells. Our research group reported that DENV C triggered apoptosis in hepatocytic cells. Moreover, entering to nucleus of wild-type DENV C (WT DENV C) resulted in apoptosis. In contrast, mutant DENV C, a substitution mutation in nuclear localizing signal, mostly exhibited the cytoplasmic localization and led to reduction of apoptosis. The problem from previous study was the low efficiency in DENV C gene delivery into hepatocytic cells because of the rigid of their cells wall. The aim of this study was to generate the DENV C gene containing recombinant plasmid, which would be employed to increase the efficiency of DENV C gene delivery into hepatocytic cells by using the ability of retrovirus as well as viral infection. Consequently, the researcher generated the recombinant retroviral plasmid and DENV C gene by using recombinant DNA technology following with DNA sequencing. The result demonstrated the achievement in recombinant plasmid construction both WT DENV C and mutant DENV C. Recombinant plasmid containing WT DENV C showed completely correct sequence in comparison with template. Conversely, mutant DENV C received the missence mutation, leading to the alteration of amino acid position 47 from Tyrosine to Phenylalanine, which belonged to the same aromatic R group; therefore, it could be accounted for acceptable criteria. However, verification at protein level and mammalian cellular localization would be studied further as it should be compatible with the original DENV C, both WT and mutant.

Keywords: Dengue Virus Capsid Protein, Retrovirus, Recombinant DNA technology

1. บทนำ

ไข้เลือดออกเด็งก็จัดเป็นโรคสำคัญที่เป็นสาเหตุของการตายในเด็ก และพบได้ทั่วโลก โดยเกิดจากเชื้อไวรัสเด็งก็ และมีผู้ตายเป็นพาหะ (Gubler, 1998) โปรตีนแคปซิดของเด็งก็ (DENV C) มีขนาดเล็กประมาณ 12 KDa และมีประจุบวกจำนวนมาก เมื่อโปรตีนแคปซิดอาศัยอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ มีหน้าที่ประกอบเป็นโครงสร้างของไวรัส แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนแคปซิดสามารถพบได้ในนิวเคลียส

ของเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย ซึ่งโดยขณะนี้ที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (Ma et al., 2004)

นอกจาก DENV C มีหน้าที่ในการช่วยประกอบ virion particle แต่อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า การเข้าสู่นิวเคลียสของ DENV C น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับหน้าที่ทางชีวภาพของแคปซิด เนื่องจากไม่มีความจำเพาะใดๆ ที่ RNA virus จะต้องเข้าสู่นิวเคลียส ในปี 2007 คณะผู้วิจัยได้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงบทบาททางชีวภาพของ DENV C โดยเกี่ยวข้องกับการมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Daxx ในขณะที่

ที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ตับ และ DENV C สามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) เมื่อเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ตับ (Limjindaporn et al., 2007) ในทางตรงข้ามเมื่อทำมิวเตชันที่ Nuclear Localizing Signal (NLS) ในตำแหน่ง R85A และ K86A ของ DENV C (mutant DENV C, R85) ส่งผลให้แคปซิดอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับเท่านั้น และยังสูญเสียปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Daxx และที่สำคัญไปกว่านั้นคือส่งผลให้การตายแบบ apoptosis ลดลง เมื่อเทียบกับ DENV C ชนิดดั้งเดิม (Netsawang et al., 2010) โดยสรุปคือ DENV C จับกับ DAXX protein และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง Fas-mediated apoptosis จนนำไปสู่การ apoptosis ของเซลล์ ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ และมีอาการรุนแรงอันเนื่องจากพยาธิสภาพที่ตับ เป็นต้น

การโคลนนิ่งโดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA technology) เป็นเทคนิคที่นิยมอย่างมากในการสร้าง พลาสมิดลูกผสมที่สนใจ (recombinant plasmid) เนื่องจากสามารถทำได้โดยทั่วไป และค่าใช้จ่ายที่ไม่แพง (Copeland et al., 2001)

แต่เนื่องด้วยงานวิจัยที่ผ่านมา ประสบปัญหาในการนำพลาสมิดลูกผสมของ DENV C เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี Transient transfection (Limjindaporn et al., 2007; Netsawang et al., 2010) สืบเนื่องมาจากผนังเซลล์ที่หนา รวมถึงการแสดงออกของโปรตีนที่มีประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาเทคนิคการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยอาศัย retrovirus ที่มีความสามารถในการถ่ายทอด พลาสมิดเข้าสู่เซลล์มะเร็งตับ เสมือนการทำให้เซลล์เกิดการติดเชื้อของไวรัส โดยไม่คำนึงถึงลักษณะ

ของเซลล์นั้นๆ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ค่อนข้างเป็นเทคนิคที่ใหม่ และต้องอาศัยบุคคลากรที่มีความชำนาญเฉพาะทางประกอบกับต้องใช้เวลาค่อนข้างนาน

2. วัตถุประสงค์

เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีนแคปซิด ที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาเทคนิคการถ่ายทอดพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เป้าหมายที่มีผนังหนา เช่น เซลล์ตับ ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

3. อุปกรณ์และวิธีการ

ยีนแคปซิดของไวรัสแดงที่ได้รับการเพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR, ลำดับเบสของไพรเมอร์ (DENV C BamHI_F 5'-gta gga tcc atg aat gac caa cgg aaa aag-3' และ DENV C XhoI_R 5'- gca ctc gag cta tct gcg tct cct at-3') (Limjindaporn et al., 2007) และใช้พลาสมิดต้นแบบ คือ pcDNA 3.1 His C/WT DENV C และ pcDNA 3.1 His C/Mutant DENV C (Limjindaporn et al., 2007; Netsawang et al., 2010) ทั้งนี้ PCR reaction cycle เริ่มต้นจาก Hot start ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที และประกอบด้วย Denaturing ที่ 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที, Annealing 59 °C เป็นเวลา 1 นาที และ Extension 72 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 30 cycle และสุดท้ายคือ Final Extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที (Limjindaporn et al., 2007)

พลาสมิดของ retrovirus (pFB-Neo retroviral vector Stratagene, Canada) และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนข้างต้น ได้รับการตัดด้วย restriction enzyme คือ BamHI และ XhoI จากนั้น นำมาเชื่อมต่อกับเอนไซม์ T4 DNA Ligase และนำเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน คือ

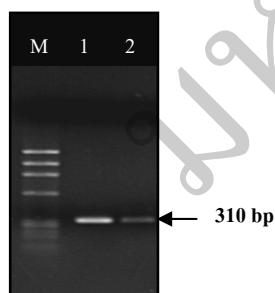
E. Coli สายพันธุ์ *DH5α* พร้อมทั้งทำการคัดเลือกโคโลนี ที่มีพลาสมิดลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Ampicilin (Netsawang, 2010)

การตรวจคัดกรองพลาสมิดลูกผสม เริ่มต้นจากการนำโคโลนีแบคทีเรียมาผสมกัน และทำ PCR (Pool Colony PCR Matrix) (Netsawang, 2010) โดยใช้สภาวะเดียวกันกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ดังข้างต้น และทำการตรวจสอบต่อ โดยการสกัดพลาสมิดลูกผสมที่ผ่านขั้นแรก มาทำการตัดด้วย restriction enzyme คือ *Bam*HI กับ *Xho*I และขั้นตอนสุดท้าย คือ การตรวจเพื่อยืนยัน โดยใช้การตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) (Netsawang, 2010)

4. ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

4. 1 การเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดของไวรัสแดง

ตรวจพบ band ขนาด 310 bp เมื่อเทียบกับ DNA marker ทั้ง WT DENV C และ Mutant DENV C (R85) และ band ขนาดดังกล่าวสอดคล้องกับขนาดของ DENV capsid (DENV C) แสดงดังรูปที่ 1



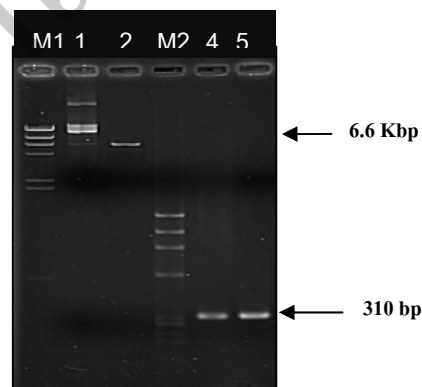
รูปภาพที่ 1 PCR product ขนาด 310 bp ของ WT DENV C และ Mutant DENV C
Lane M แสดง Φ x 174 DNA/Hae III DNA marker

Lane 1 แสดง PCR product ของ WT DENV C

Lane 2 แสดง PCR product ของ mutant DENV C

4. 2 การตัดพลาสมิด retrovirus และชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแคปซิดแดง

การตัดแบบ double digestion เพื่อป้องกันการเกิด self-ligation จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ 2 ชนิดด้วยกัน คือ *Xho*I และ *Bam*HI โดยพลาสมิด pFB-Neo เมื่อถูกตัดโดยสมบูรณ์ จะพบ band ขนาด 6.6 Kbp เท่านั้น (รูปภาพที่ 2, Lane 2) เมื่อเทียบกับพลาสมิดที่ยังไม่ได้ตัด (รูปภาพที่ 2, Lane 1) และชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง WT DENV C และ Mutant DENV C จะพบขนาดที่ 310 bp เท่าเดิม (รูปภาพที่ 2, Lane 4 และ 5) ตามลำดับ



รูปภาพที่ 2 การตัดแบบ double digestion ด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Bam*HI ของ pFB-Neo และชิ้นดีเอ็นเอ (WT DENV C และ Mutant DENV C)

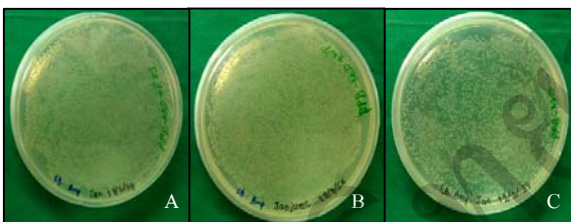
Lane M1 และ M2 แสดง λ DNA/Hind III DNA marker และ Φ X174 DNA/Hae III DNA marker ตามลำดับ

Lane 1 และ 2 แสดง pFB-Neo vector uncut และ pFB-Neo Vector/*Xho*I/*Bam*HI ตามลำดับ

Lane 3 และ 4 แสดง WT DENV C/*Xho*I/*Bam*HI และ mutant DENV C/*Xho*I/*Bam*HI ตามลำดับ

4.3 การนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน และการคัดเลือก พลาสมิดลูกผสม

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมสามารถทำได้โดยใช้ LB agar ที่มี ampicillin โดย plate ที่ 1 และ 2 จะเป็น test late ซึ่งประกอบด้วย plasmid และ insert ทั้ง mutant DENV C (รูปที่ 3, A) และ WT DENV C (รูปภาพที่ 3, B) มีจำนวนโคโลนีที่ขึ้นมากกว่า plate ที่ 3 ซึ่งเป็น control plate โดยจะมีเฉพาะ pFB-Neo ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์แล้วเท่านั้น (รูปภาพที่ 3, C) คณะผู้วิจัยจึงจะทำการคัดพลาสมิดดังกล่าวด้วยเอนไซม์ได้ก่อนข้างสมบูรณ์ เพราะสามารถลด background จากการเชื่อมกลับเป็นวงของพลาสมิดได้

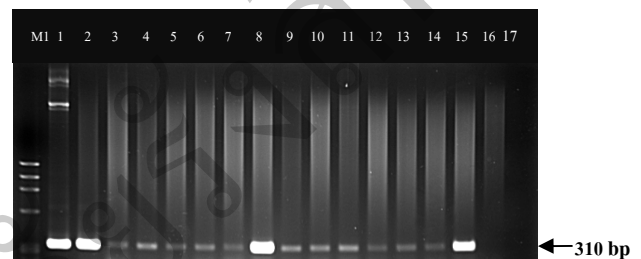


รูปภาพที่ 3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมบน LB agar ที่มี ampicillin โดยแต่ละ plate ประกอบด้วย pFB-Neo กับ mutant DENV C (รูป A), pFB-Neo กับ WT DENV C (รูป B) และ pFB-Neo/*Xho I/BamHI* เท่านั้น (control plate) (รูป C)

4.4 การตรวจคัดกรองพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิค Pool Colony-PCR matrix

ผลจากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกับที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนแคลสิดของ Dengue ทำให้พบ band ขนาด 310 bp ในทุก lane สอดคล้องกับขนาดของ positive control (รูปที่ 4, Lane 1) และไม่พบ band ทั้งสองชนิด negative control ใดๆ เลยใน (รูปที่ 4, Lane

17 และ 16) ส่วน band ที่มีขนาดหนา (รูปภาพที่ 4, Lane ที่ 2, 8 และ 15) บ่งชี้ถึงโอกาสที่จะพบโคลนที่ต้องการเป็นอย่างมาก เนื่องจากโคโลนีแบคทีเรียที่ผสมรวมกันกลุ่มนั้นๆ น่าจะประกอบด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มี insert DNA ที่เราต้องการรวมอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการเลือกกลุ่มที่มี band หนาเป็นหลัก



รูปภาพที่ 4 การตรวจคัดพลาสมิดลูกผสมโดยเทคนิค Pool Colony-PCR matrix

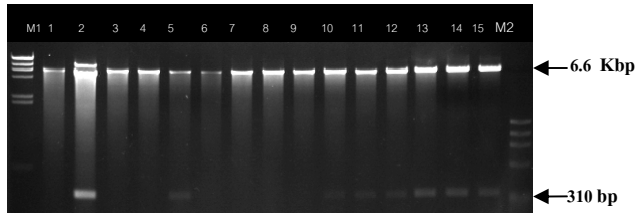
Lane M แสดง Φ X 174 DNA/Hae III DNA marker

Lane 1, 16 และ 17 แสดง positive control, negative control (พลาสมิดเปล่า) หรือ SDW ที่ใช้ทำ PCR ตามลำดับ

Lane 2-15 แสดง pool colony แบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม

4.5 การตรวจคัดกรองพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วย restriction endonuclease enzyme

พลาสมิดลูกผสมที่มี insert DNA ของทั้ง WT และ Mutant DENV C เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ *XhoI* และ *BamHI* พร้อมกัน ทำให้ได้ DNA ออกมา 2 ชิ้น ที่มีขนาดคือ 6.6 Kbp และ 310 bp ซึ่งเป็นพลาสมิด pFB-Neo และ DENV C ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม ถ้าเป็นพลาสมิดที่ไม่มี insert DNA จะพบ DNA เพียงชิ้นเดียวเท่านั้นคือที่ 6.6 kbp ดังแสดงในรูปภาพที่ 5



รูปภาพที่ 5 การตรวจคัดกรองโดยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ *XhoI* และ *BamHI*

Lane M1 และ M2 แสดง λ DNA/Hind III marker และ ϕ X174 DNA/Hae III marker ตามลำดับ

Lane 1 และ 2 แสดง vector control (pFB-Neo/*Xho I/BamHI*) และ positive control ตามลำดับ

Lane 3-15 แสดงผลการคัดพลาสมิดลูกผสมโคลนต่างๆ ด้วยเอนไซม์ *XhoI* และ *BamHI*

4.6 การตรวจยืนยันลำดับเบสของพลาสมิดลูกผสม

ผลการตรวจสอบลำดับเบสด้วยวิธี sequencing โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสด้วย EBI-Pairwise Sequence Alignment พบว่าพลาสมิดลูกผสมของ WT DENV C โคลนที่ 85 มีลำดับเบสที่สอดคล้องกับ WT DENV C ต้นแบบทุกประการ ส่วน Mutant DENV C โคลนที่ 29 และ 68 พบว่าเกิดการ mutation แบบ point mutation ชนิด missense mutation ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน จาก Tyrosine ไปเป็น Phenylalanine ซึ่งอยู่ในกลุ่ม aromatic R group ทำให้อาจถูกจัดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

5. การอภิปรายผล

พลาสมิดลูกผสมของ WT DENV C มีความสอดคล้องกับต้นแบบทุกประการจึงสามารถนำไปใช้ได้ ในทางกลับกัน พลาสมิดลูกผสมของ Mutant DENV

C เกิด missense mutation ซึ่งอาจจัดว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกัน น่าจะไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างระดับโปรตีน และหน้าที่มาก แต่อาจมีข้อบกพร่องของการเปลี่ยนแปลงในกลุ่ม aromatic R group อาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างที่ซับซ้อนของ ring form ภายใน และ secondary structure ได้ (Serrano et al., 1991) แต่อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยต้องทำการทดสอบต่อไปในระดับโปรตีน และตำแหน่งที่อยู่ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งจะต้องสอดคล้องกับขึ้นแคลสิดต้นแบบชนิดที่มีไว้แต่ชั้นทุกประการ จึงสามารถนำไปใช้ได้ (Limjindaporn et al., 2007; Netsawang et al., 2010)

ผลงานวิจัยที่ได้นั้น เป็นเพียงขั้นตอนเริ่มต้นของการทดสอบประสิทธิภาพของ retrovirus ในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ตับ อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนต่อไป คือการสร้าง retrovirus ที่นำขึ้น WT DENV C และ Mutant DENV C เข้าสู่เซลล์มะเร็งเรื้อรัง (HepG2) รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพการนำเข้าสู่เซลล์ HepG2 โดยดูระดับการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว และตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีนแคลสิดแดงที่ ซึ่งจะต้องสอดคล้องกับต้นแบบทุกประการ จึงสามารถนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไปได้ เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม (Limjindaporn et al., 2007; Netsawang et al., 2010)

6. บทสรุป

เทคโนโลยีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA technology) เป็นเทคนิคที่นิยมอย่างมากในการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่สนใจ (recombinant plasmid) เนื่องจากสามารถทำได้โดยทั่วไป และค่าใช้จ่ายที่ไม่แพง

คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ retroviral plasmid ที่มี WT DENV C หรือ mutant DENV C เชื่อมอยู่สำหรับการทดลองในอนาคตจะเป็นการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน ตำแหน่งที่อยู่ของ DENV C และประสิทธิภาพการนำเข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น เซลล์ตับ เป็นต้น

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นพ. อารักษ์ ลิมจินดาพร, ศ.ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส, Dr. Emmanuelle Cordat, อาจารย์ณัฐดี วงษ์ดีไทย และหน่วยอนุชีวิวิทยาทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

8. เอกสารอ้างอิง

- Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Court, D. L. (2001). Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, 2(10), 769-779. doi: 10.1038/35093556 35093556 [pii]
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, 11(3), 480-496.
- Limjindaporn, T., Netsawang, J., Noisakran, S., Thiemmecca, S., Wongwiwat, W., Sudsaward, S., et al. (2007). Sensitization to Fas-mediated apoptosis by dengue virus capsid protein.

Biochem Biophys Res Commun, 362(2), 334-339. DOI: S0006-291X(07)01649-X [pii] 10.1016/j.bbrc.2007.07.194

- Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), 3414-3419.
- Netsawang, J. (2010). The Role of Dengue Virus Capsid Protein in Apoptosis. Ph.D. (Immunology), Mahidol, Thailand.
- Netsawang, J., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Kasinrer, W., Wongwiwat, W., Malasit, P., et al. (2010). Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Res*, 147(2), 275-283. DOI: S0168-1702(09)00413-4 [pii] 10.1016/j.virusres.2009.11.012
- Serrano, L., Bycroft, M., & Fersht, A. R. (1991). Aromatic-aromatic interactions and protein stability. Investigation by double-mutant cycles. *J Mol Biol*, 218(2), 465-475. DOI: 0022-2836(91)90725-L [pii]