การจำแนกในระดับโมเลกุลและการทำแผนที่ของแอนติเจนบริเวณผิวของไวรัสตับอักเสบ บี ในชะนี

นางสาว สุวรรณา นพพรพันธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-0382-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20473485

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND SURFACE ANTIGEN MAPPING OF GIBBON HEPATITIS B VIRUS

Miss Suwanna Noppornpanth

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Medical Microbiology
Inter-Departmental Program in Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2002

ISBN 974-17-0382-1

Thesis Title	MOLECULAR CHARACTERIZATION AND SURFACE ANTIGEN MAPPING OF GIBBON HEPATITIS B VIRUS
By	Miss Suwanna Noppornpanth
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Professor Yong Poovorawan
Thesis Co-advisor	Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol
	Assistant Professor Parntep Ratanakorn

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

Suchada Kiranandana ..... Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Praphan Phanuphak, M.D. ..... Chairman

(Professor Dr. Praphan Phanuphak, M.D. Ph.D.)

Yong Poovorawan ..... Thesis Advisor

(Professor Yong Poovorawan, M.D.)

Parvapan Bhattarakosol ..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

P. M ..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Parntep Ratanakorn, D.V.M)

Chantapong Wasi ..... Member

(Associate Professor Chantapong Wasi, M.D.)

Kanisak Oraveerakul ..... Member

(Associate Professor Dr. Kanisak Oraveerakul, D.V.M. Ph.D.)

Thaweesak Tirawatnapong ..... Member

(Dr. Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุวรรณา นพพรพันธุ์ : การจำแนกในระดับโมเลกุลและการทำแผนที่ของแอนติเจนบริเวณผิวของไวรัสตับอักเสบ บี ในชะนี (MOLECULAR CHARACTERIZATION AND SURFACE ANTIGEN MAPPING OF GIBBON HEPATITIS B VIRUS) อ.ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, ผศ. น.สพ. ปานเทพ รัตนากร, 173 หน้า. ISBN 974-17-0382-1.

ไวรัสตับอักเสบ บี เป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพของประชากรโลก ประมาณว่ามีผู้เป็นพาหะไวรัสตับอักเสบ บี ประมาณ 350 ล้านคนทั่วโลก และในอนาคต 25-30 % ของผู้เป็นพาหะเหล่านี้ จะดำเนินโรคไปสู่ภาวะตับอักเสบเรื้อรังและมะเร็งตับ ไวรัสตับอักเสบ บี ยังพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมกลุ่มที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ เช่น ชิมแปนซี, ชะนี, อุรังอุตัง, กอริลา และ woolly monkey ชะนีเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองที่มีถิ่นกำเนิดในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเคยพบชุกชุมในประเทศไทย ปัจจุบันมีการลักลอบจับชะนีป่าผิดกฎหมายเป็นจำนวนมาก ชะนีที่ได้รับการช่วยเหลือโดยกรมป่าไม้ ได้รับการดูแลอยู่ที่สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่ากระบกคู่ จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยได้มีการจัดตั้งโครงการดูแลสุขภาพและตรวจกรองหาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของโรคก่อนที่จะนำกลับคืนสู่ป่า จากการศึกษาชะนีจำนวนทั้งหมด 101 ตัวพบว่าร้อยละ 38.61 (39/101) เคยได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ในจำนวนนี้ 19 ตัวเป็นพาหะของโรค โดยตรวจพบ HBV DNA, HBsAg และไม่พบแอนติบอดีต่อ S โปรตีน การทำงานของตับวัดจากระดับเอนไซม์อลานีนอะมิโนทรานเฟอร์เรส (ALT) ของชะนีในกลุ่มที่เป็นพาหะ (68.75± 48.12 U/l) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เป็นพาหะ (33.04 ±15.91 U/l) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การศึกษาการแพร่กระจายของไวรัสตับอักเสบ บี จากแม่ไปสู่ลูกชะนี (vertical transmission) จำนวน 2 คู่ โดยตรวจหาลำดับเบสของบริเวณที่มีความแปรปรวนมากที่สุดคือยีน *PreS1* พบว่ามีความคล้ายคลึงกันระหว่างแม่-ลูกชะนี ร้อยละ 98.61 และ 99.45 นอกจากนี้ การศึกษาการแพร่กระจายโรคระหว่างชะนีโดยทางเพศสัมพันธ์ หรือการต่อสู้กันระหว่างชะนีที่อยู่ในกรงเดียวกัน (horizontal transmission) พบว่ามีความเป็นไปได้สูง เนื่องจากตรวจพบ HBsAg และ HBV-DNA ในน้ำลายชะนีที่เป็นพาหะ การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบโครงสร้างลักษณะของไวรัสตับอักเสบ บี ในคนและชะนี มีขนาดและรูปร่างคล้ายคลึงกัน การจำแนกไวรัสตับอักเสบ บี ของชะนีในระดับโมเลกุล พบว่าไม่สามารถจำแนกจีโนทัยป์ของไวรัสได้ โดยวิธี RFLP ตามหลักการเดียวกับการจำแนกไวรัสมนุษย์ได้ การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ 1762/1764 บริเวณ precore promoter ยีน พบได้ในชะนี 4 ตัว ในขณะที่พาหะของเชื้อไวรัส บี 4 ตัว ตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อโปรตีน core ในการจัดจำแนกโดยความเกี่ยวข้องกันทางพันธุ-กรรม (phylogenetic tree) ของ *PreS1* ยีนและพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัส (whole genome) สามารถแยกไวรัสตับอักเสบ บี ของชะนี ออกจากไวรัสตับอักเสบ บี ที่พบในสัตว์อื่นๆ รวมทั้งมนุษย์ได้อย่างชัดเจน การทำแผนที่ของแอนติเจนบริเวณผิวของไวรัสตับอักเสบ บี เปรียบเทียบระหว่างไวรัสที่พบในชะนีและมนุษย์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากในส่วนที่เป็นบริเวณจับจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HBsAg โดยการทดสอบด้วยวิธี ELISA อนุภาคของไวรัสตับอักเสบ บี ชะนีสามารถถูกจับได้โดยแอนติบอดีจากผู้ที่ได้รับวัคซีนแล้ว โดยการทดสอบด้วย inhibition binding assay การแสดงออกของแอนติเจนบริเวณผิวของไวรัสตับอักเสบ บี ที่พบในชะนีและมนุษย์ในเซลล์เพาะเลี้ยง CHO ทำได้โดยการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตโปรตีนนี้ลงในพาหะ (vector) ที่จำเพาะกับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ CHO สามารถวัดได้โดยการย้อมด้วยแอนติบอดี (immunostaining) และพบว่าโปรตีนที่ผลิตออกมามีการหลั่งออกมานอกเซลล์ แต่ไม่สามารถทดสอบการจับของโปรตีนนี้กับบริเวณผิวของเซลล์ตับมนุษย์ได้ การทดสอบการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบ บี ในเซลตับมนุษย์ โดยใช้น้ำเหลืองของชะนีที่เป็นไวรัสตับอักเสบ บี และเซลล์ตับมนุษย์ HepG2 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นเซลล์เป้าหมาย พบว่าไวรัสตับอักเสบ บี ชะนี มีการเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์มนุษย์ โดยตรวจพบไวรัสในรูป cccDNA ได้ภายใน 14 วันหลังการทดลอง โดยสรุป การแพร่กระจายของไวรัสตับอักเสบ บี ในชะนีสามารถเกิดขึ้นได้ และอุบัติการณ์การติดเชื้อไวรัสในชะนีที่ถูกจับเป็นสัตว์เลี้ยงพบได้สูง ถึงแม้ว่าการจัดจำแนกจีโนทัยป์และการแจกแจงความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นว่า ไวรัสตับอักเสบ บี ในชะนี มีความแตกต่างจากไวรัสที่พบในมนุษย์ แต่ในส่วนโครงสร้างและแอนติเจนบริเวณผิวของไวรัสทั้ง 2 ชนิด มีความคล้ายคลึงกันมาก นอกเหนือจากนี้ ไวรัสในชะนียังสามารถถูกยับยั้งได้โดยอิมมูนแอนติบอดีต่อ HBsAg จากคนที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว ถึงแม้ว่า การติดต่อของไวรัสตับอักเสบ บีระหว่างมนุษย์และชะนีในธรรมชาติจะไม่สามารถยืนยันได้ในการศึกษานี้ เนื่องจากการจับกันระหว่างไวรัสของชะนีกับโปรตีนของเซลล์มนุษย์ที่ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ แต่ก็แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ไวรัสตับอักเสบ บี ชะนีสามารถเพิ่มจำนวนในเซลตับเพาะเลี้ยงของมนุษย์ได้ ดังนั้น การฉีดวัคซีนให้กับชะนีที่ไม่มีภูมิต้านทานและคนงานดูแลสัตว์ จึงเป็นแนวทางที่ควรปฏิบัติในการป้องกันการแพร่กระจายของไวรัสตับอักเสบ บี

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

417 54343 30 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : GIBBON / HBV / SEROPREVALENCE / TRANSMISSION / ANTIGEN MAPPING

SUWANNA NOPPORNPANTH : MOLECULAR CHARACTERIZATION AND SURFACE ANTIGEN MAPPING OF GIBBON HEPATITIS B VIRUS. THESIS ADVISOR : PROF.YONG POOVORAWAN, THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. DR. PARVAPAN BHATTARAKOSOL, ASST. PROF. PARNTEP RATANAKORN, 173 pp. ISBN 974-17-0382-1.

Hepatitis B virus (HBV) infection represents a global health burden. There are approximately 350 million chronic carriers worldwide off which 25-30% eventually proceed towards chronic liver disease or liver cancer. HBV is also found in several species of nonhuman primates like chimpanzee, gibbon, orangutan, gorilla and woolly monkey. Since illegal captive gibbons in Thailand were housed in Krabok Koo Wildlife Breeding Center, Cha-Cheng-sao, HBV infection screening were established to prevent viral spread among animals. Seroprevalence studies of 101 captive gibbons revealed that 38.61% (39/101) of the animals were positive for at least one marker of HBV infection and 19 gibbons were chronic carriers as defined by the presence of HBV DNA and HBsAg, in the absence of antibodies to the S protein. Alanine-aminotransferase levels of the carrier animals (68.75± 48.12 U/l) were significantly higher compared to healthy control animals (33.04 ±15.91 U/l , $p<0.05$). Evidence of vertical and horizontal transmission in captive gibbons was obtained by testing HBsAg, HBV-DNA in sera and saliva specimens. The 98.61% and 99.45% sequence similarity of the *PreS1* gene - the most divergent part of HBV genome- isolated from sera of two HBV carrier mothers and their newborn babies further proved the fact that vertical transmission occurred. HBV horizontal spread by saliva contamination was suggested due to the fact that HBV-DNA was detected in saliva of HBV carriers. Although the similarity of gibbon and human viral particles was confirmed by EM study, molecular characterization of gibbon HBV revealed untypable genotype using RFLP profiles of human viruses. Precore promoter 1762/1764 point mutation was determined in four animals while some of the chronic animals were found to be anti-HBc negative (4/19). Phylogenetic tree analysis of *PreS1* and HBV whole genome revealed clustering of the gibbon viruses separate from Hepadnaviruses of the other hosts. Compared to human hepatitis viruses, surface antigen mapping of gibbon HBV indicated similar binding sites of human HBsAg specific antibodies, as detected by ELISA assay. Particles of gibbon HBV was caught by immune anti-HBs from vaccinated patients measured by inhibition binding assay. Gibbon HBV surface protein was cloned and expressed in CHO mammalian cells for testing the attachment between viruses and host cells. Because of low amounts of viral particles produced, binding of gibbon viruses to human host cells could not be confirmed thus far. DMSO treated HepG2 cells used as target cells for infection by human and gibbon HBV positive serum revealed the presence of the HBV replicative form (cccDNA), 14 days after infection. In conclusion, HBV seroprevalence and viral spreading routes in captive gibbons were investigated. Although genotyping and phylogenetic analysis of gibbon viruses clearly revealed a separate group compared to human HBV, with respect to virion morphology and S antigen conformation structure these viruses are quite similar. Additionally, anti-S antibodies from vaccines specifically bound to gibbon HBV and replication of gibbon viruses in human hepatocyte cells was demonstrated. However, specific binding of gibbon viruses to human cells could not be confirmed thus far. Thus, the possibility of HBV cross transmission between gibbon and human should be taken into account. HBV immunization was suggested for animal caretakers and non-immune gibbons to prevent viral transmission.

Department Microbiology — Student's signature Suwanna Nopporpanth

Field of study Medical Microbiology — Advisor's signature Yong Poovorawan

Academic year 2002 — Co-advisor's signature Parvapan Bhattarakosol

Co-advisor's signature P. Ratanakorn

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest appreciation and sincere gratitude to my advisor, Professor Yong Poovorawan, for his valuable advice, expert guidance, supervision, support and encouragement throughout. I am extremely grateful to my thesis co-advisor Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, Assistant Professor Parntep Ratanakorn and Professor A.D.M.E. Osterhaus for their valuable suggestion, support and encouragement for the completeness of this thesis. My sincere appreciation is also expressed to Dr. Bart L. Haagmans for his excellent guidance, valuable advice and support. I am also very grateful to Professor Dr. Praparn Parnupark, Associate Professor Dr. Chantapong Wasi, Associate Professor Kanisak Oraveekul and Dr. Taweesak Teerawatnapong for their constructive comments and kindness in serving as the supervisory committees.

My sincere gratitude is extended to Dr. Schwann Tunhikorn and Ms.Wanida Wongjutatip for their tired effort for specimen collection. I also wish to thank Ms.Apiradee Theamboonlers and Ms. Pojchanad Jantaradsamee for their technical supports throughout the work. My thankful expression also goes to Mr. Pisit Chinchai, Ms. Teeraporn Chinchai and all staffs of Viral Hepatitis research Unit for their assistants and logistic support.

My special appreciation also goes to Dr. Kruavon Balachanda, Ms. Prukswan Chetanachan, Ms. Supang Maneesri and Ms. Penpan Nuanboonma for their helpful guidance upon electron microscope study. In particular, I would like to thank Dr. Bert Niesters, Dr. Ruud A. Heijtink and Mr. Patrick van Bergen for their valuable suggestions, the antibodies providing and technical assistant of ELISA assay techniques. I would like to thank Dr. Suwattana Suwannaketnikom for her great suggestion of statistical analysis.

I am particularly indebted to the Royal Golden Jubilee Ph.D. program, Thailand Research Fund., Senior Research Scholar and Center of Excellent Research Fund., Chulalongkorn University for the scholarship which enabled me to under taken this study successfully. Additional, I would like to thank the Department of microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Hospital for supporting equipment and other utilities.

Finally, I would like to express my infinite grateful to my parents and every member of my family, my dear friends for their unlimited love, understanding and attention all the time.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai)..... IV

Abstract (English)..... V

Acknowledgement..... VI

Table of contents..... VII

List of Tables..... VIII

List of Figures..... X

List of Abbreviation..... XII

Chapter

I. Introduction..... 1

II. Review of Related Literatures..... 8

III. Material and Methods..... 30

IV. Results..... 56

V. Discussion and Conclusion..... 111

References..... 125

Appendices

Appendix A..... 139

Appendix B..... 145

Appendix C..... 149

Appendix D..... 150

Biography..... 173

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Amino acid residues specification determinants of HBsAg.....	19
2	Primer sequences for HBV DNA detection and RFLP study.....	39
3	Primer sequences for HBV whole genome sequencing.....	40
4	Antibodies against HBV surface antigen and their localization.....	43
5	Anti- HBs inhibition binding agents including in this study.....	45
6	Demographic data of the gibbons in the Krabok Koo Wildlife Breeding Center, Royal Forest Department, Cha-Cheng Sao, Thailand.....	58
7	Descriptive data and complete blood count analysis of captive gibbons in Krabok Koo Wildlife Breeding Center, Royal Forest Department, Cha-Cheng Sao, Thailand.....	59
8	Seroprevalence of gibbon HBV in the Krabok Koo Wildlife Breeding Center, Royal Forest Department, Cha-Cheng Sao, Thailand.....	62
9	Blood chemistry analysis of HBV carriers and normal gibbons kept in Krabok Koo Wildlife Breeding Center.....	64
10	HBV serological markers of 2 gibbon HBV carrier families with babies borned in the Krabok Koo Wildlife Breeding Center.....	67
11	*PreS1* sequence similarity (%) comparison between gibbon HBV carrier families and control sequences.....	70
12	HBsAg and HBV DNA detection in sera and saliva of carriers and normal gibbons by ELISA and PCR method.....	72
13	HBV marker detection in serum and saliva of the gibbon HBV carriers and their families in this study.....	73
14	HBV serological study of animal keepers in the Wildlife Breeding Center, Royal Forest Department, Krabok Koo, Cha-Cheng Sao, Thailand.....	75
15	RFLP genotype characterization by action of *Ava* II and *Dpn* II on the segment of *PreS1/PreS2* region of gibbon and human HBV.....	79

Table | Page

16 HBsAg concentration of gibbon and human sample present in this study..... 89
17 Antibodies binding to surface antigen of gibbon and human samples determined by F4-7b ELISA assay plate at $OD_{450/620}$..... 91
18 OD correlation of antibodies binding to human and gibbon HBV surface protein determined by ELISA assay..... 92
19 Antibodies binding to surface antigen of gibbon and human HBV determined by anti-PreS1 and anti-PreS2 antibodies coated ELISA plate..... 93
20 Percentage of inhibition binding of immune anti-S generated from Engerix B, GenHevac B, Hepagene B vaccination to gibbon and human HBsAg comparison to Hepatect HBIg and F4-7b mAb..... 98
21 ELISA assay of secreted HBV surface protein expressed from gibbon and human sLMS/ VR1012/Neo^+ plasmids in supernatant of CHO culture..... 102
22 ELISA assay of secreted HBV surface protein expressed from gibbon and human LMS/ VR1012/Neo^+ plasmids in supernatant of CHO culture..... 104
23 Comparison of secreted HBV surface protein of gibbon and human LMS/ VR1012/Neo^+ plasmids expression in CHO stable cells..... 105

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Schematic diagram of hepadnavirus particles.....	9
2	Structure and organization of the HBV genome.....	10
3	Schematic view of the life cycle of HBV.....	12
4	Course of HBV infection after neonatal or adult exposure.....	14
5	Characteristics of acute hepatitis B with recovery and progression to chronic HBV infection.....	15
6	Geographic distribution of chronic HBV infection.....	17
7	Schematic diagram of secondary structure of the HBsAg.....	24
8	HBV genome organization and amplification regions using for the whole genome sequencing.....	40
9	Diagram of VR1012 plasmid modification for neomycin resistant gene expression.....	48
10	Principles of the procedure of NKNT-3 reversible immortalization.....	52
11	Strategy for the selective detection of repaired cccDNA by PCR.....	55
12	*S* gene amplification of gibbon and human HBV.....	63
13	Alignment of HBV sequences from 2 gibbon carrier's families.....	68
14	Morphology of probable HBV particles purified from sera of gibbon and human samples.....	77
15	HBV genotype characterization by RFLP analysis.....	78
16	Precore promoter 1762/1764 analysis by RFLP.....	80
17	Phylogenetic tree representing an unrooted consensus tree obtained by the neighbor-joining method based on the whole genome sequence of HBV from human and apes.....	82
18	Phylogram based on nucleotide sequences of *PreS1* gene using the Kimura two-parameter matrix and neighbor-joining method.....	83
19	Alignment of PreS1/Pres2 amino acid across six genotypes of human HBV and other nonhuman primate hepadnaviruses.....	85

Figure Page

20 Alignment of S protein among six genotypes of human HBV and other nonhuman primate hepadnaviruses..... 86
21 Standard curve of HBsAg detected by F4-7b ELISA assay plate..... 88
22 Image of HBV surface protein binding sites by a panel of antibodies in present study..... 90
23 Inhibition binding assay of immune anti-S including Engerix-B , GenHevac-B, Hepagene-B, human immunoglobulin : Hepatect and human monoclonal antibody, F4-7b to gibbon and human HBV in a HBsAg ELISA assay..... 95
24 F4-7b mAb staining of surface protein of gibbon and human HBV expressed by sLMS/ VR1012/Neo^{+} plasmids in CHO cells..... 101
25 Anti-PreS2 mAb staining of surface protein of gibbon and human HBV expressed by LMS/ VR1012/Neo^{+} plasmids in CHO cells..... 103
26 Immunobloting of gibbon and human HBV surface protein expressed in CHO cells..... 105
27 Histogram of FACs analysis for HBV protein binding to human hepatocytes cells..... 106
28 Immunostaining of Annexin V expressed in HepG2 cells..... 108
29 cccDNA and rcDNA detection in human hepatocyte (HepG2) cells at 14 days after infection..... 109
30 Anti-PreS2 antibody staining of gibbon HBV infected HepG2 cells and normal HepG2..... 110

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

HBV	=	Hepatitis B virus
HBsAg	=	Hepatitis B surface antigen
HBcAg	=	Hepatitis B core antigen
HBeAg	=	Hepatitis B early antigen
cccDNA	=	covalently closed circular DNA
mAbs	=	monoclonal antibodies
bps	=	base pairs
aa	=	amino acid
Ig	=	Immunoglobulin
AnV	=	Annexin V
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
PEG	=	polyethyleneglycol
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
PCR	=	polymerase chain reaction
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
nm	=	nanometre
µl	=	micrometre
ml	=	milliletre
µg	=	microgram
mg	=	milligram

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย