

การตรวจหา การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะ และการถอดรหัส  
ของสารพันธุกรรมของไวรัสพิษสุนัขบ้า



นายจตุพร พรศิลป์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-297-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION, CHARACTERIZATION AND TRANSCRIPTIONAL  
EVENTS OF RABIES VIRUS GENES



MR. JATURAPORN PORNSILAPATIP

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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.

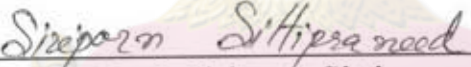
---

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

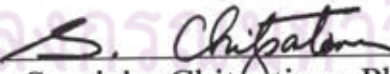
  
\_\_\_\_\_  
(Assoc. Prof. Santi Thoongsuwan, Ph.D.)            Dean of Graduate School

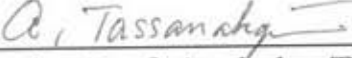
Thesis Committee

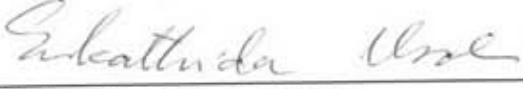
  
\_\_\_\_\_  
(Assist. Prof. Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)            Chairman

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

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

  
\_\_\_\_\_  
(Ltc. Suwicha Chitpatima, Ph.D.)            Advisory committee

  
\_\_\_\_\_  
(Assist. Prof. Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)            Member

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

จตุรพร พรศิลป์ทิพย์ : การตรวจหา การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะ และการถอดรหัสของ  
สารพันธุกรรมของไวรัสพิษสุนัขบ้า (DETECTION CHARACTERIZATION AND  
TRANSCRIPTIONAL EVENTS OF RABIES VIRUS GENES) คณะกรรมการที่  
ปรึกษา : รศ. ดร. ศิริพร สิทธิประณีต, อ. ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ และ ดร. สุวิชา  
จิตรปฎิมา, พ.ท., 90 หน้า. ISBN 974-632-297-4

การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอภายในเซลล์ของไวรัสพิษสุนัขบ้านั้นยังไม่มีการศึกษากันมากนักเนื่อง  
จากความรุนแรงของการติดเชื้อ การวิเคราะห์คุณลักษณะเฉพาะของการถอดรหัสของไวรัสพิษสุนัขบ้า  
ทำให้สามารถอธิบายกลไกการจำลองตนเองของไวรัสได้กระจ่างขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในความเข้าใจ  
การเกิดพยาธิสภาพ การป้องกันและการรักษา ในการที่จะเข้าใจอนุพันธุศาสตร์ของไวรัสพิษสุนัขบ้า  
นั้น จำเป็นต้องมีมาตรการในการตรวจหาที่เหมาะสมเช่น วิธีไฮบริไดเซชันด้วยสารปลดครึ่งสี่ และ การ  
ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยพัฒนาวิธีการเหล่านี้เพื่อการเฝ้าสังเกตอาร์เอ็นเอของไวรัสพิษสุนัขบ้า  
ที่เกิดขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงบีเอชเค ตลอดจนวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของการถอดรหัสสารพันธุกรรมใน  
ชั้นปฐมภูมิ นอกจากนี้เพื่อจะได้ประยุกต์การพัฒนาวิธีไฮบริไดเซชันไปใช้ในการวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า  
จากตัวอย่างชีวภาพ

โดยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ร่วมกับการออกแบบพรามเมอร์ที่จำเพาะ ทำให้  
สามารถสร้างโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสมซึ่งประกอบด้วยชิ้นส่วนของยีนโครงสร้างของไวรัสพิษสุนัขบ้าได้  
สำเร็จ พลาสมิดลูกผสมเหล่านี้ ได้แก่ pRAB-N, pRAB-G, pRAB-NS, pRAB-M และ pRAB-L  
ซึ่งจำลองมาจากส่วนของยีน N, G, NS, M และ L ตามลำดับ พลาสมิดลูกผสมเหล่านี้สามารถนำไปใช้  
เป็นตัวติดตามเพื่อตรวจหาชิ้นจำเพาะนั้น ๆ ด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน โดยสามารถตรวจหาอาร์เอ็นเอของ  
ไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ในปริมาณต่ำที่ 0.2-1.5 นาโนกรัม ในการศึกษาเบื้องต้นพบว่า วิธีไฮบริไดเซชัน  
สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาไวรัสจากอาร์เอ็นเอของสมองสุนัขได้ และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจ  
โดยการย้อมไวรัสด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากสารฟลูออเรสเซนต์ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงว่าวิธี  
ไฮบริไดเซชันมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปใช้ในการวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าได้

โดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสทำให้สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์จากการถอด  
รหัสของยีนโครงสร้างในชั้นปฐมภูมิครบทั้งหมดภายหลังจากปลูกเชื้อไวรัสแล้ว 5 ชั่วโมง พบลำดับของ  
การถอดรหัสในชั้นปฐมภูมิเริ่มต้นจากยีน N, L, NS, M และ G ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็น  
ว่า การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของไวรัสพิษสุนัขบ้าเริ่มต้นที่บริเวณโปรโมเตอร์ของแต่ละยีนเป็นอิสระจาก  
กัน

ภาควิชา ..... วิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
สาขาวิชา ..... วิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
ปีการศึกษา ..... 2537

ลายมือชื่อนิสิต ..... จตุรพร พรศิลป์ทิพย์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... ศิริพร สิทธิประณีต  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... อ. ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ

##C225018 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCE

KEY WORD: RABIES VIRUS GENES / TRANSCRIPTIONAL EVENTS / DETECTION

JATURAPORN PORNSILAPATIP : DETECTION, CHARACTERIZATION AND TRANSCRIPTIONAL EVENTS OF RABIES VIRUS GENES. ADVISORY COMMITTEE : ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., VICHIEEN 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. Characterization 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 reaction (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 parallel correlation 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 initiated from gene N to L, NS, M, and G respectively. Result suggests that mRNA synthesis start at different promoter sites.

ภาควิชา..... วิทยาศาสตร์ชีวภาพ.....

สาขาวิชา..... วิทยาศาสตร์ชีวภาพ.....

ปีการศึกษา..... 2537.....

ลายมือชื่อนิสิต..... อรุณพร ทวีลาวัณย์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.วิเศษ สิตทิพรานี.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... พ.ศ. น. อรุณพร.....



## ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere and deepest gratitude to my advisory committee: Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed and Dr. Vichien Rimphanitchayakit at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, and Lt. 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 committee 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, Queen Saovabha Memorial Institute, 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, Pramongkutklao 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
Preparation 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	

rabies virus.....	39
	viii
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
Bibliography.....	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 chemilluminiscent- labelled pRAB-N probe.....	52
17 Dot hybridization of rabies viral RNA detected by chemilluminiscent-labelled pRAB-G probe.....	53
18 Dot hybridization of rabies viral RNA detected by chemilluminiscent-labelled pRAB-NS probe.....	55
19 Dot hybridization of rabies viral RNA detected by chemilluminiscent-labelled pRAB-M probe.....	56
20 Dot hybridization of rabies viral RNA detected by chemilluminiscent-labelled pRAB-L probe.....	57
21 Dot-hybridization of RNA extract from canine brain samples detected by chemilluminiscent-labelled pRAB-N probe.....	58
22 Dot-hybridization of RNA extract from canine brain samples detected by chemilluminiscent-labelled pRAB-G probe.....	59
23 Dot-hybridization of RNA extract from canine brain samples detected by chemilluminiscent-labelled pRAB-NS probe.....	60

	xi
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 <sup>3</sup> H-uridine incorporation into BHK-21 cells.....	64
27 Transcriptional events of rabies viral genes characterized by RNA-PCR technique.....	65



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBREVIATIONS

$\mu$ l	microliter ( $10^{-3}$ ml)
ml	milliliter ( $10^{-3}$ l)
l	liter
pg	picogram ( $10^{-12}$ gm)
ng	nanogram ( $10^{-9}$ gm)
$\mu$ g	microgram ( $10^{-6}$ gm)
mg	milligram ( $10^{-3}$ gm)
gm	gram
sec	second
min	minute
hr	hour
$^{\circ}$ C	degree Celcius
$\mu$ M	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 <sub>50</sub>	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- $\beta$ -D-galactoside
LB	Luria-Bertani media
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

PBS	phosphate-buffered saline	xiii
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- $\beta$ -D-galactoside	



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย