



0 56 - 1996

CLONING AND SEQUENCING OF HEPATITIS B VIRUS  
GENOME *ADR* SUBTYPE ISOLATED IN THAILAND

PATAMA MONKONGDEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
(MICROBIOLOGY)

With compliments  
of

ศาสตราจารย์ ดร. วชิรพร  
.....

IN  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright by Mahidol University

TH  
P&TAC  
1996

36063

ชื่อวิทยานิพนธ์ การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ *adr* ที่แยกได้ในประเทศไทย

ผู้วิจัย ปัทมา มั่นคงดี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา, Ph.D.

ชินจิตต์ บุญเจิด, Ph.D.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D.Eng.

วันที่สำเร็จการศึกษา 13 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

### บทคัดย่อ

ดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี จาก Dane particle ซึ่งพบในเลือดของผู้ที่บริจาคให้แก่สภากาชาดไทย ได้ถูกโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะ pBS (+SK) ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ถูกนำไป transform เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1B จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า เอนไซม์ *Bss*HII, *Eco*RI, *Not*I, *Pvu*II, *Sac*I ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี ได้ แต่ *Apa*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Hpa*I, *Kpn*I, *Sac*II, *Sph*I, *Xba*I และ *Xho*I สามารถตัดได้ โดยมีบางตำแหน่งซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ *adr* ที่เคยมีผู้รายงานไว้

จากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมี 3,215 bp พบว่าประกอบด้วย 4 open reading frames ได้แก่ 1) Pre-S และ HBsAg มีกรดอะมิโน 174 ตัว และ 226 ตัว ตามลำดับ 2) P มีกรดอะมิโน 843 ตัว 3) HBcAg มีกรดอะมิโน 212 ตัว และ 4) X มีกรดอะมิโน 154 ตัว นอกจากนี้ยังพบว่า การจัดเรียงตัวของยีนมีความคล้ายคลึงกับไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ *adr* ที่มีผู้รายงานไว้แล้ว ในดีเอ็นเอของไวรัสพบว่ามี direct repeat sequence ขนาด 11 นิวคลีโอไทด์ (DR1) ใกล้ปลายด้าน 5' ของทั้งสาย

สั้น (S) และสายยาว (L) และ direct repeat sequence ขนาดเล็ก(DR2 และ DR3) ระหว่างปลาย 5' ของทั้ง 2 สาย ที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะของไวรัสชนิดนี้

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของHBsAg ซึ่งถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า 1) บริเวณที่เป็น antigen determinant  $\alpha$  อันประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 ตัว ที่ตำแหน่ง 139 ถึง 147 ได้แก่ cystein, threonine, lysine, proline, serine, aspartic acid, glycine, asparagine, cystein ตามลำดับ เป็นบริเวณที่ conserved สำหรับไวรัสตับอักเสบบี ทุกสายพันธุ์ 2) มี cystein ที่ตำแหน่ง 124 และ 147 และ proline ที่ตำแหน่ง 142 ซึ่งเป็นจุดที่สำคัญที่ทำให้เกิด antigenicity อย่างสมบูรณ์ 3) มี lysine ที่ตำแหน่ง 122 ( $d$ ) และ arginine ที่ตำแหน่ง 160 ( $r$ ) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *adr* subtype 4) มีกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะเฉพาะของ genotype C และ 5) มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 177 เป็น valine และ 178 เป็น proline ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ  $q$  subtype determinant นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ Pre-S2 พบกรดอะมิโน ซึ่งมีผู้เสนอว่าเป็น immunodeterminant ระหว่างตำแหน่ง 131-144 อันประกอบด้วย leucine, leucine, aspartic acid, proline, arginine, valine, arginine, glycine, leucine, tyrosine, phenylalanine, proline, alanine, glycine และระหว่างตำแหน่ง 162-168 อันประกอบด้วย serine, serine, isoleucine, phenylalanine, serine, arginine, threonine

จากการที่พบว่าโคลนไวรัสตับอักเสบบี ที่ศึกษามีโปรตีน HBsAg และ Pre-S2 ที่มีกรดอะมิโนที่สำคัญสำหรับการทำให้เกิด antigenicity ที่สมบูรณ์ ถึงแม้ว่าจะมีกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่แตกต่างออกไปบ้าง ดังนั้นโคลนนี้จึงน่าจะเหมาะสมที่จะนำไปสร้างโปรตีนส่วนผิวเพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์วัคซีน สำหรับประชากรไทยในอนาคต

Thesis Title                      Cloning and Sequencing of Hepatitis B Virus  
Genome *adr* Subtype Isolated in Thailand.  
Name                                Patama Monkongdee  
Degree                              Master of Science (Microbiology)  
Thesis Supervisory Committee  
   Somsak Panthuwattana, Ph.D.  
   Cheunchit Boonchird, Ph.D.  
   Wattanalai Panbangred, D.Eng.  
Date of Graduation              13 May (B. E. 2539) 1996

### ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) DNA from Dane particle of *adr* subtype isolated from blood specimens donated to the Thai Red Cross was cloned into *Bam*HI site of plasmid pBS (+SK). The recombinant plasmid was transformed into *E coli* XL-1B. Restriction endonuclease analysis showed that the cloned HBV did not have *Bss*HIII, *Eco*RI, *Not*I, *Pvu*II and *Sac*I sites but has *Apa*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Hpa*I, *Kpn*I, *Sac*II, *Sph*I, *Xba*I and *Xho*I sites, which some positions are different from others *adr* subtypes. Its complete nucleotide sequence was determined. The 3,215 bp sequences show the presence of 4 open reading frames (ORF) for Pre-S+HBsAg (174+226 amino acids), P (843 amino acids), HBcAg (212 amino acids) and X (154 amino acids). The gene locus organization was not different from those of the other *adr* clones so far reported. It was found that all of the direct repeat of the undecanucleotide sequence (DR1) near the 5' ends of the short (S) and long (L) strands of HBV DNA

and the two small direct repeat sequences (DR2 and DR3) between both 5' ends were characteristic structures of HBV.

The deduced amino acid sequences of HBsAg was analyzed in detail. The 9 amino acids of antigenic determinant *a*, 139-CTKPSDGNC-147, of this clone were found to be conserved. Furthermore, Cys-124, Cys-147 and Pro-142 required for full antigenicity were also observed. The protein possessed Lys-122 (*d*) and Arg-160 (*r*) which were characteristic of *adr* subtype. Based on the deduced amino acid comparison in HBsAg, the genotype of cloned HBV was classified as group C. The presence of Val-177 and Pro-178 in HBsAg indicated that the clone HBV had *q* subtype determinant. Furthermore, the amino acid sequence which was proposed to be the immunodeterminant of Pre-S2 region, at position 131-LLDPRVRGLYFPAG-144, and position 162-SSIFSRT-168, were found.

Regarding to the conservation of amino acids defined in HBsAg and Pre-S region and some amino acids which are different from others *adr* subtype, the clone HBV *adr* subtype in this study would be suitable to use as a source of HBsAg for the production of recombinant vaccine for Thai population in the future.