

ความชุกของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีบริเวณเอ็กซ์และพรีคอร์ซีนของผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งตับ



นางสาววิราภา จันทรสุพิศ

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

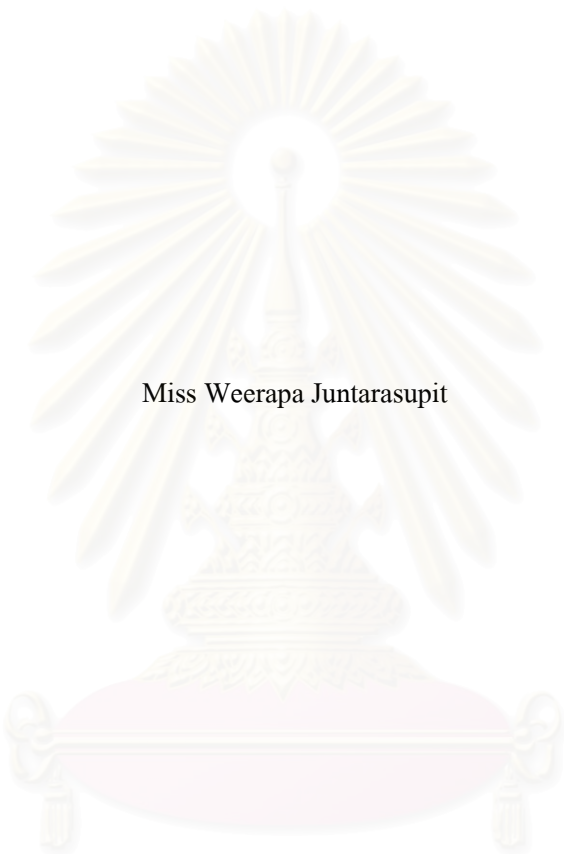
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-5255-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE OF X AND PRECORE GENE MUTATIONS OF HEPATITIS B VIRUS IN THAI PATIENTS
WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA.



Miss Weerapa Juntarasupit

สภามหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master for Science in Medical Biochemistry
Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University


Academic Year 2005

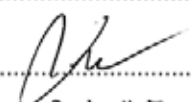
ISBN 974-17-5255-5

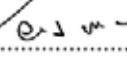
Copyright of Chulalongkorn university

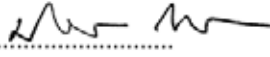
วีรภา จันทรสุนทร : ความชุกของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีบริเวณเอ็กซ์และพรีคอร์เร็นของผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งตับ. (PREVALENCE OF X AND PRECORE GENE MUTATIONS OF HEPATITIS B VIRUS IN THAI PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA)
 อ. ที่ปรึกษา : รศ.นพ. พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ, อ.นพ.ปิยะวัฒน์ โกลมณิศร์, 135 หน้า. ISBN 974-17-5255-5

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) แบบเรื้อรังเป็นสาเหตุหลักของโรคมะเร็งตับ แต่กลไกของการเกิดโรคมะเร็งตับโดย (HBV) นั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก ดังนั้นการศึกษาความเกี่ยวกับสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของ HBV จึงเป็นอีกทางหนึ่งเพื่อความเข้าใจที่มากขึ้น การศึกษานี้เป็นการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของ HBV บริเวณ X gene และ Precore gene กับการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยไทย โดยเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของ HBV จากผู้ป่วยมะเร็งตับ 50 คน และกลุ่มควบคุมที่จับคู่อายุและเพศกับกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับอีก 50 คน ทำ PCR ด้วย primer ที่จำเพาะตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ 1287-2038 และทำ DNA Sequencing ทั้ง 2 กลุ่มนี้มี HBeAg status ใกล้เคียงกัน ผล sequence ที่ได้พบว่า และ genotype มีผู้ป่วยมะเร็งตับกับกลุ่มควบคุมมีจำนวนใกล้เคียงกัน การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A1762T และ G1764A (CP) และ Precore stop codon (PC) ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับพบมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบการกลายพันธุ์ CP ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.028$ OR=5.146 95%CI1.357-19.524) และพบการกลายพันธุ์ CP ในผู้ป่วยมะเร็งตับในกลุ่มที่ติดเชื้อ HBV genotype B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.050$ OR6.667 95%CI1.047-42.431) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ที่ CP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี และติดเชื้อ HBV genotype B อีกด้วย ($P=0.021$ OR4.500 95%CI1.326-15.277) และยังพบการกลายพันธุ์ G1899A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ($P=0.007$ OR. 4.095 95%CI 1.593-10.900). การกลายพันธุ์ของ X gene ที่ตำแหน่งอื่นๆ พบน้อยและไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด แต่อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์แบบ delation และ insertion ยังสามารถพบได้ในการศึกษานี้ ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง CP น่าเป็นอีกปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับในคนไข้ที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี และติดเชื้อ HBV genotype B

ภาควิชา.. ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต..... 

สาขาวิชา. ชีวเคมีทางการแพทย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

4674821830 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEY WORD : HEPATITIS B VIRUS / MUTATION/ HEPATOCELLULAR CARCINOMA / X
GENE / PRECORE GENE

WEERAPA JUNTARASUPIT : PREVALENCE OF X AND PRECORE GENE
MUTATIONS OF HEPATITIS B VIRUS IN THAI PATIENT WITH HEPATOCELLULAR
CARCINOMA.. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. PISIT TANGKIJVANICH, MD.
THESIS COADVISOR PROF. YONG POOVORAWAN, MD. PIYAWAT GOMOLMIT,
MD. 135 pp. ISBN 974-17-5255-5

Chronic hepatitis B infection is a major cause of hepatocellular cancer (HCC). The pathogenesis of the carcinogenesis is not fully understood. In order to investigate whether any mutations within X gene and precore gene of the hepatitis B virus (HBV) genome could be associated with the development of HCC, the 50 HCC patients and 50 match control non-HCC patients were studied. Serum samples were subjected to PCR with specific primers at nucleotide 1287 – 2038 and the HBV DNA sequenced were observed. HBeAg was found 16% in HCC patients and 18% in non-HCC control patients. In the 50 HCC patients, 14 (28%) and 36 (62%) had genotypes B and genotype C. In the 50 non-HCC control patients, 12 (24%) and 38 (76%) had genotypes B and genotype C. Double mutations in core promoter (A1762T/G1764A) (CP) and precore stop codon mutation (PC) were found more frequent in patients with cancer than in control, but not significant. (CP 80% vs 64% ($P=0.119$), PC 48% vs 36% ($P=0.331$)). The prevalence of CP in HCC patients who younger or 50 Yrs was significant higher than control (82% vs 48% $P=0.028$ OR 5.146 95% CI 1.357-19.524). and also with HCC patients who infected with HBV genotype B (57.1% vs 16.7% $P=0.050$ OR 6.667 95% CI 1.047-42.431). The prevalence of CP in HCC patients who younger or 50 Yr and infect with HBV genotype B was significant higher than control ($P=0.021$ OR=4.500 95%CI 1.326-15.277). G1899A mutation was significant higher than control ($P=0.007$ OR. 4.095 95% CI 1.593-10.900). Others of X gene mutation were found at low prevalence, with no difference from control group, however deletion mutation and insertion mutation still found in this study. Thus, double core promoter mutants may one in many factors that contribute to the risk of HCC in patients who younger or 50 Yrs and infect with HBV genotype B.

Department.....Biochemistry..... Student's signature.....
Field of study...Medical Biochemistry..... Advisor's signature.....
Academic year 2005 Co-advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์ ช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรรณ ที่ให้โอกาสในการทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียงพอ ตลอดจนให้ความรู้คำแนะนำตลอดการทำวิจัย และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ อ.นพ.ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญพิเศษหน่วยวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่มีประโยชน์อย่างมาก ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุขวงศ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อปริญญาโท ให้ความรักและกำลังใจ จนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย).....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ).....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	58
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก ก.....	75
ภาคผนวก ข.....	126
ภาคผนวก ค.....	129
ภาคผนวก ง.....	133
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	135

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

๗

ตาราง		หน้า
1	แสดงการกระจายตัวของยีนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบีตามภูมิภาคของโลก.....	20
2	แสดงความแตกต่างของความรุนแรงของโรกระหว่างไวรัสตับอักเสบบี genotype B และ C.....	20
3	แสดงชื่อ ตำแหน่ง ลำดับเบส ความยาวและ Tm° ของ Primer.....	28
4	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสตับอักเสบบี X gene.....	29
5	แสดงเวลาและอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยา PCR.....	29
6	แสดงจำนวน เพศ อายุ HBeAg และ genotype ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม.....	38
7	แสดงอัตราส่วนการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์G1896Aของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม.....	39
8	แสดงอัตราส่วนการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์A1762และG1764Aของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม.....	45
9	แสดงอัตราส่วนการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์G1896AและHBeAgของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม.....	47
10	แสดงอัตราส่วนการกลายพันธุ์บริเวณอื่นๆของ HBx ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม.....	48

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงลักษณะของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	7
2 แสดงภาพวาดแสดงลักษณะของ Dane particle ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	8
3 แสดงลักษณะของโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	9
4 แสดงยีนและโปรตีนทั้งสามชนิดที่สร้างจาก S ORF.....	10
5 แสดงยีนและโปรตีนทั้งสองชนิดที่สร้างจาก C ORF.....	10
6 แสดงยีนและโปรตีนที่สร้างจาก P ORF.....	11
7 แสดงยีนและโปรตีนที่สร้างจาก X ORF.....	12
8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างภูมิภาคของโลกกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	14
9 รูปภาพแสดงกระบวนการเกิดมะเร็งโดยไวรัสตับอักเสบบี.....	16
10 แสดงผลกระทบของ HBx ต่อเซลล์ตับ.....	17
11 แสดงโปรตีนที่สามารถจับกับ HBx.....	18
12 แสดงการกระตุ้นการทำงานของ MAP kinase และ JAK/STAT cellular signalling pathways โดย HBx	19
13 แสดงหลักการ PCR.....	27
14 แสดงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนของ PCR.....	28
15 แสดงขั้นตอนในการแยก PCR product ออกจาก Agarose gel	30
16 แสดงความแตกต่างระหว่าง (dNTP) และ (ddNTP).....	31
17 แสดงหลักการการอ่าน DNA sequencing.....	31
18 แสดงผลการการทำ gel electrophoresis.....	34
19 แสดง chromatogram การทำ DNA sequence.....	35
20 อัตราส่วนของ genotype B และ C.....	36
21 แสดงผลการทำ Phylogenetic tree ของกลุ่มคนไข้มะเร็งตับ.....	37
22 แสดงผลการทำ Phylogenetic tree ของกลุ่มคนไข้กลุ่มควบคุม.....	37
23 แสดงอัตราส่วนระหว่างการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A กับกลุ่มคนไข้มะเร็งตับและกลุ่มควบคุม.....	40
24 แสดงอัตราส่วนระหว่างการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A กับกลุ่มคนไข้มะเร็งตับและกลุ่มควบคุม.....	40

25. แสดง nucleotide sequence alignment ของ Basal core promoter และ บางส่วน
ของ precore gene ของ genotype B..... 41

26. แสดง nucleotide sequence alignment ของ Basal core promoter และ บางส่วน
ของ precore gene ของ genotype C ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ..... 42

27. แสดง nucleotide sequence alignment ของ Basal core promoter และ บางส่วน
ของ precore gene ของ genotype C ของกลุ่มควบคุม..... 43

28. แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่างการกลายพันธุ์ A1762T G1764A ระหว่างกลุ่ม
ผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม..... 46

29. แสดงการกลายพันธุ์ที่ NRE และ Box- α ของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B
ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม..... 49

30. แสดงการกลายพันธุ์ที่ NRE ของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C
ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ..... 50

31. แสดงการกลายพันธุ์ที่ Box- α ของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C
ของกลุ่มควบคุม..... 51

32. แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B ของกลุ่มผู้
ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุมที่พบในการศึกษารุ่นนี้..... 52

33. แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene (ต่อ) เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B ของ
กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุมที่พบในการศึกษารุ่นนี้..... 53

34. แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของกลุ่มผู้
ป่วยมะเร็งตับที่พบในการศึกษารุ่นนี้..... 54

35. แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene (ต่อ) เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของ
กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับที่พบในการศึกษารุ่นนี้..... 55

36. แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของกลุ่ม
ควบคุมที่พบในการศึกษารุ่นนี้..... 56

37. แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene (ต่อ) เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของ
กลุ่มควบคุมที่พบในการศึกษารุ่นนี้..... 56

38. แสดงโครงสร้างที่เปลี่ยนไปบริเวณ DRI ของ pregenomic RNA..... 60

39. แสดงการเกิด hepatocyte nuclear factor binding site จากการกลายพันธุ์ที่
core promoter..... 61

40. แสดงการเพิ่มจำนวน Core RNA จากการกลายพันธุ์ core promoter.....62



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus) เป็นเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis) ซึ่งอาจมีการดำเนินของโรคต่อไปเป็นตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ต่อไป ปัจจุบันมีประชากรทั่วโลกมากกว่า 350 ล้านคนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง หรือเท่ากับประมาณร้อยละ 5 ของประชากรโลกทั้งหมด และในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตเนื่องจากโรคตับแข็ง และมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีประมาณปีละ 1,000,000 คน (1) ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความชุกชุมของไวรัสตับอักเสบบีสูงเช่นเดียวกับประเทศในภูมิภาคแถบเอเชีย (2)

ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ละรายมีการดำเนินโรค (natural history) แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) ที่ไม่เหมือนกัน ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่จะสามารถทำลายเชื้อได้หมดและหายจากโรค ในขณะที่ผู้ติดเชื้อส่วนหนึ่งที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันไม่ดีพอจะเกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งบางรายอาจมีการติดเชื้อแบบเรื้อรังโดยไม่มีอาการผิดปกติแต่ยังคงเป็นพาหะของโรค (carrier) ในขณะที่ผู้ติดเชื้ออีกจำนวนหนึ่งมีการดำเนินของโรครุนแรงกว่าโดยเป็นโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง โรคตับแข็ง หรือมะเร็งตับต่อไปตามลำดับ (3)

ปัจจัยที่อาจมีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความรุนแรงของโรค ได้แก่ ปัจจัยของผู้ป่วยเอง (host factors) เช่น การติดเชื้อตั้งแต่อายุน้อย ผู้ป่วยเพศชาย ผู้ป่วยที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผิดปกติ เช่น ผู้ป่วยที่มีเชื้อ HIV หรือผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสอื่นร่วมด้วย เช่น ผู้ป่วยที่มีเชื้อ HCV ร่วมด้วย เป็นต้น นอกจากนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อไวรัส (viral factors) เช่น การกลายพันธุ์ (mutations) ของ gene ในบางตำแหน่งอาจมีความสำคัญต่อการดำเนินโรคเช่นเดียวกัน เช่น มีรายงานที่แสดงว่าการกลายพันธุ์บริเวณ precore และ core gene ของเชื้อไวรัสอาจทำให้โรคตับอักเสบบีมีความรุนแรงมากขึ้น และการกลายพันธุ์ในบริเวณ X gene อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคมะเร็งตับ (1) เป็นต้น ความแตกต่างของการกลายพันธุ์เชื้อไวรัสที่มีผลต่อการดำเนินของโรคและความรุนแรงของโรคนี้กำลังเป็นที่สนใจกันมาก อย่างไรก็ตามยังคงไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดในปัจจุบัน เนื่องจากรายงานการศึกษาจากต่างประเทศยังมีความขัดแย้งกันอยู่พอสมควร ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความแตกต่างทางลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในแต่ละภูมิภาคของโลก

เนื่องจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นประกอบกับข้อมูลการศึกษาในประเทศไทยในด้านนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก ดังนั้นการศึกษาให้ทราบถึงความสำคัญในทางคลินิกของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในประชากรไทยอย่างเป็นระบบและต่อเนื่อง จึงน่าที่จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทั้งในการก่อ

ให้เกิดความรู้ความเข้าใจในด้านกลไกการเกิดโรค ความรุนแรงของโรค การตอบสนองต่อการรักษา ด้วยยา และลักษณะทางคลินิกอื่นๆ ของผู้ป่วยจากเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

วัตถุประสงค์ของโครงการ (Objective)

ศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์บริเวณ X gene และบางส่วนของ Precore gene ของไวรัสตับอักเสบบีในผู้ป่วยมะเร็งตับ เปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อเรื้อรังกลุ่มอื่นที่ไม่เป็นมะเร็งตับของประเทศไทย

แนวคิดและทฤษฎี

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus) เป็นเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis) ซึ่งอาจมีการดำเนินของโรคต่อไปเป็นตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ละรายมีการดำเนินโรค (natural history) แตกต่างกันจากหลายสาเหตุเช่น การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย อายุขณะติดเชื้อ หรือการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (1)

การศึกษาค้นคว้าความสำคัญในทางคลินิก ของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี จึงเป็นประโยชน์ ในด้านการดูแลรักษาผู้ป่วยโดยก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจมากยิ่งขึ้นทั้งในด้านกลไกการเกิดโรค ความรุนแรงและการดำเนินของโรค การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาและลักษณะทางคลินิกอื่นๆ ของผู้ป่วยตับมะเร็งตับ

ขอบเขตของการวิจัย

ผู้ป่วยที่ผ่านการวินิจฉัยโรคว่าเป็นมะเร็งตับด้วยการตรวจเลือด, การเอ็กซเรย์และการตรวจชิ้นเนื้อตับคือกลุ่มศึกษา (Case) ผู้ป่วยที่ผ่านการวินิจฉัยโรคว่าเป็นตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มอื่นที่ไม่เป็นมะเร็งตับด้วยการตรวจเลือด, การเอ็กซเรย์, และการตรวจชิ้นเนื้อตับคือกลุ่มควบคุม (Control) ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มได้รับการตรวจวินิจฉัยที่แผนกผู้ป่วยนอกโรคทางเดินอาหาร รพ. จุฬาลงกรณ์

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบของเครื่องมืออื่นๆ
2. ตัวอย่างทั้งหมดได้มีการเก็บก่อนหน้านี้อยู่แล้ว และไม่มีการเจาะเลือดผู้ป่วยรายใดใหม่ทั้งสิ้น

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

HCC	Hepatocellular carcinoma
HBV	Hepatitis B Virus
ORF	Open Reading Frame
S ORF	Surface Open Reading Frame
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
C ORF	Core Open Reading Frame
HBcAg	Hepatitis B core antigen
HBeAg	Hepatitis B e antigen
Anti-HBc	Hepatitis B core antibody
Bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

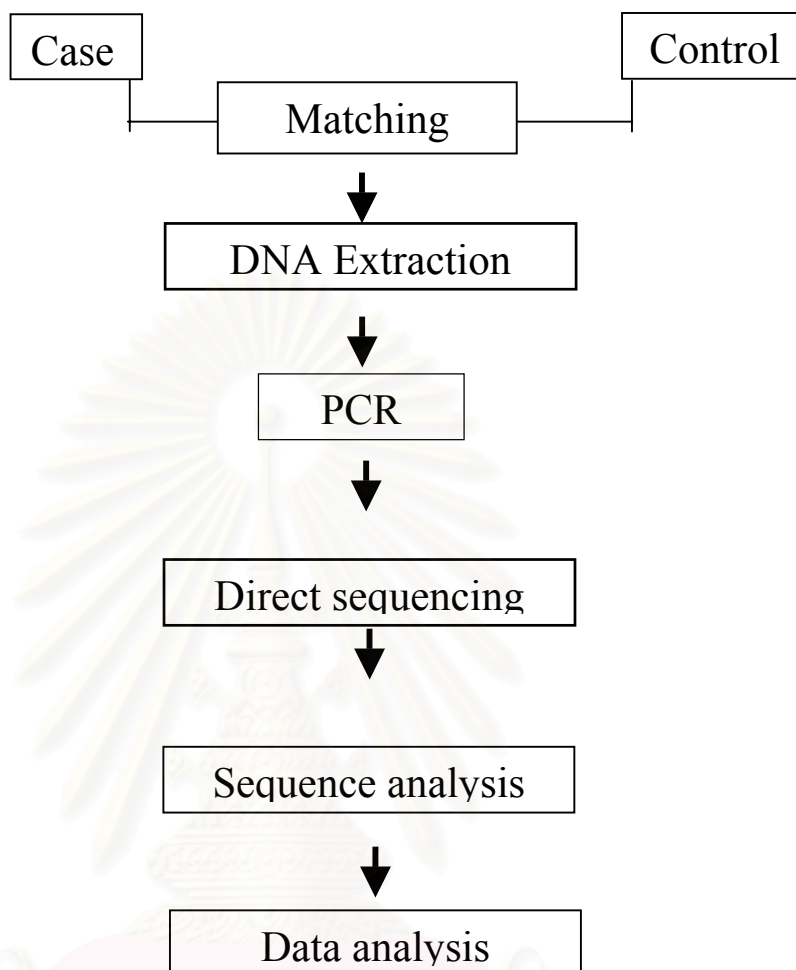
เนื่องจากเป็นงานวิจัยที่มุ่งหาความชุกการกลายพันธุ์ในบริเวณต่างๆ ของไวรัสตับอักเสบบี ในประชากรไทย ผลการวิจัยจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในด้านระบาดวิทยาเพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรต่างๆทั่วโลก การศึกษาหาความสำคัญในทางคลินิกของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีเป็นประโยชน์ในด้านการดูแลรักษาผู้ป่วย โดยก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจมากยิ่งขึ้นทั้งในด้านกลไกการเกิดโรค ความรุนแรงและการดำเนินของโรค การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาและลักษณะทางคลินิกอื่นๆ ของผู้ป่วยตับมะเร็งระดับ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) โดยวิธี Phenol-chloroform extraction
2. เพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอ (DNA) บริเวณเอ็กซ์ยีน (X gene) และ พรีคอร์ยีน (Precore gene) โดยวิธี PCR
3. ตรวจสอบ PCR โดยการทำให้ gel electrophoresis
4. ตรวจสอบการกลายพันธุ์ (mutation) ของดีเอ็นเอ (DNA) ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยการทำ DNA sequencing
5. อ่านผลด้วย ABIPRISM™ 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Cetus Branchburg, New Jersey)
6. นำผล DNA sequence ที่ได้เปรียบเทียบกับ DNA sequence ที่มีการรายงานไว้ใน www.ncbi.nlm.nih.gov โดยใช้ program Clustal X

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติการค้นพบเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1966 โดย Professor Baruch Blumberg โดยบังเอิญขณะปฏิบัติงานที่ National Institutes of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งทำให้ท่านได้รับรางวัลโนเบลสาขาการแพทย์ในปี ค.ศ. 1976

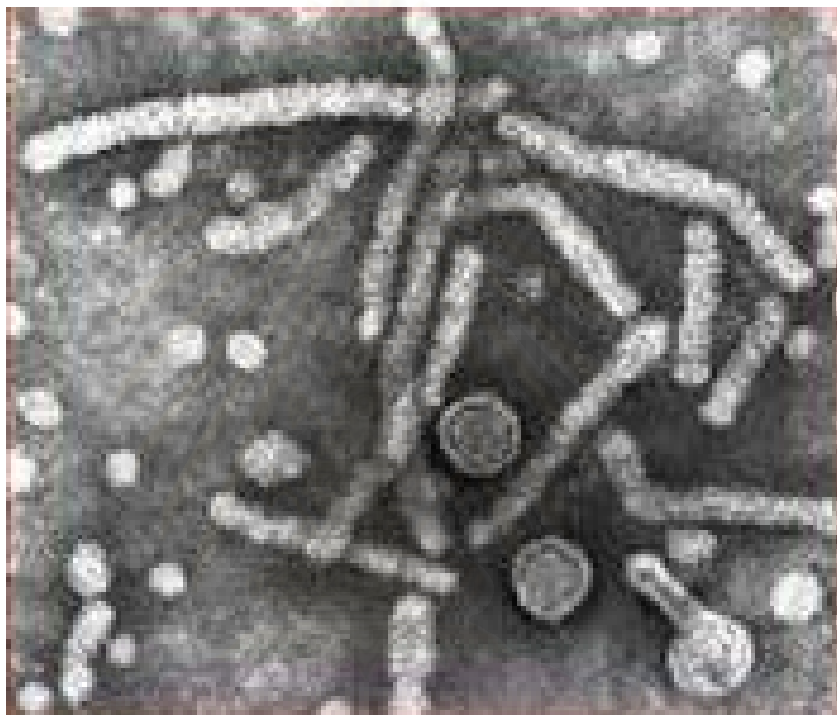
Professor Baruch Blumberg ได้ทำการศึกษาทางวิทยาคู่กันเพื่อหาโปรตีนในเลือดมนุษย์ที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับพันธุกรรม และพบว่าผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียที่ต้องได้รับเลือดบ่อยๆ สามารถทำปฏิกิริยากับเลือดของชนเผ่าพื้นเมืองออสเตรเลีย (Aborigin) จึงตั้งสมมุติฐานว่าในเลือดของผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียมีแอนติบอดีซึ่งทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติเจนในเลือดของชนเผ่าพื้นเมืองออสเตรเลีย (Aborigin) และเรียกแอนติเจนนั้นว่า Australia antigen หรือ Au antigen เมื่อได้ติดตามผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลียต่อเนื่องเป็นเวลานานพบว่าผู้ป่วยรายหนึ่งที่เคยไม่เคยมีแอนติบอดีต่อ Au antigen กลับตรวจพบแอนติบอดีได้ ซึ่งการตรวจพบแอนติบอดีเป็นเวลาเดียวกับที่ผู้ป่วยรายนั้นเป็นโรคตับอักเสบบี ข้อมูลนี้สามารถตั้งสมมุติฐานได้ว่า Au antigen น่าจะเป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบบี (4)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1970 Dr. Dane และ คณะ ได้ทำการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ ทำให้พบอนุภาคสมบูรณ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีตั้งนั้นจึงเรียกว่า Dane particle นอกจากนี้ยังพบอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอื่นๆ ทั้งรูปทรงกลม (small sphere) และรูปแท่ง (rod) (5)

ลักษณะโครงสร้างของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

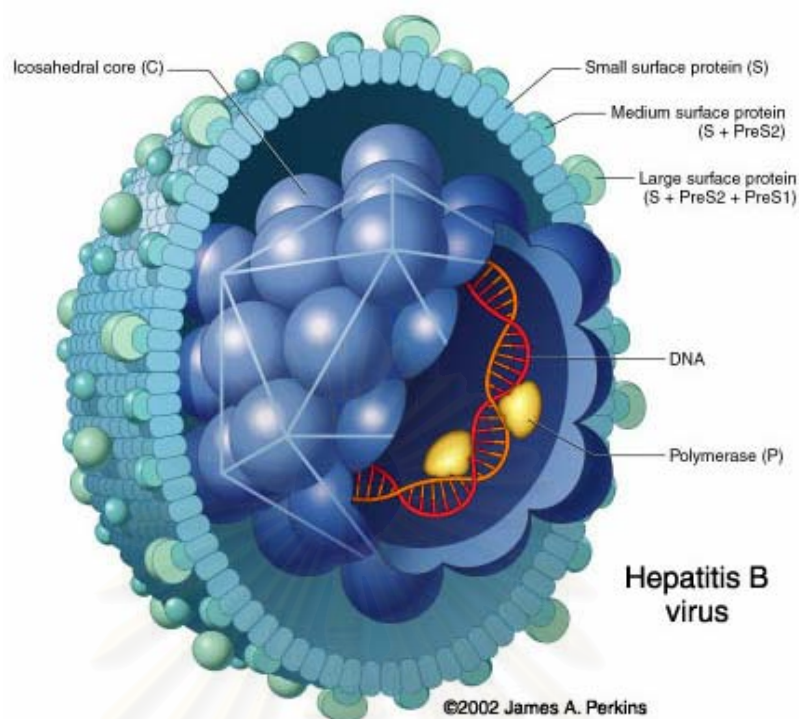
เมื่อศึกษาเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยกล้องจุลทรรศน์ จะพบอนุภาคสมบูรณ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (complete viral particle) เรียกว่า Dane particle ซึ่งมีขนาดเล็กประมาณ 42 นาโนเมตร (รูปที่ 1) โครงสร้างของเชื้อไวรัสประกอบด้วย envelope ซึ่งเป็นโครงสร้างไขมันสองชั้น (lipid bilayer) มี hepatitis B surface antigen (HbsAg) แทรกอยู่ในโครงสร้าง lipid bilayer ภายในมี internal nucleocapsid หรือ hepatitis B core antigen (HbcAg) รวมตัวกันเป็น core particle ภายใน core particle จะพบรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (viral genome) และโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ DNA polymerase และ reverse transcriptase (RNA-dependent-DNA polymerase) (6) (รูปที่ 2) นอกจากนี้เชื้อไวรัสตับอักเสบบียังมีลักษณะพิเศษ คือนอกจากจะพบ Dane particle แล้วยังพบ

อนุภาคของเชื้อไวรัส (viral particle) อื่นๆได้อีก ทั้งแบบรูปกลม (sphere) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 นาโนเมตร และรูปแท่ง (filament) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 นาโนเมตร และมีความยาวประมาณ 50-500 นาโนเมตร ซึ่งอนุภาคของเชื้อไวรัส เหล่านี้จะไม่สมบูรณ์ (incomplete viral particle) ที่มีเฉพาะ envelope และ HbsAg แต่ไม่มีรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (viral genome) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงลักษณะของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่ Dane particle และ Incomplete viral particle ชนิด sphere และ filament (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง 1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



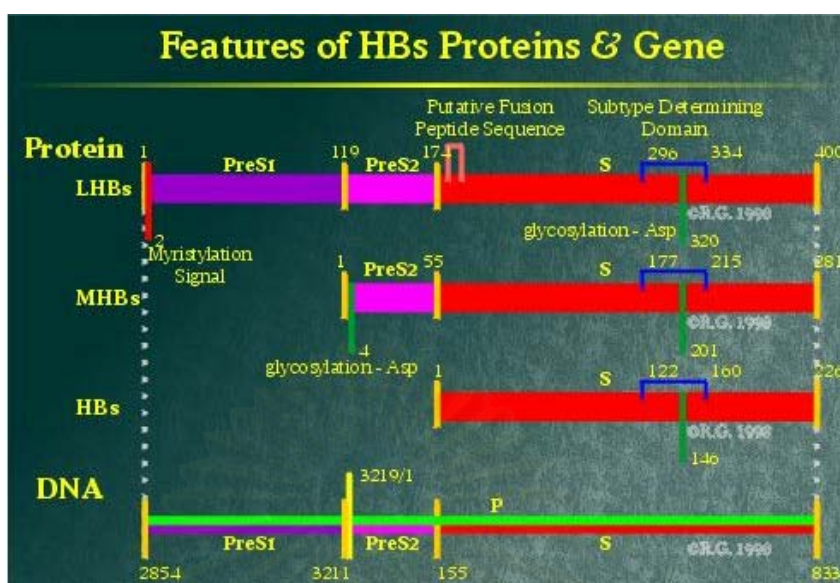
รูปที่ 2 ภาพวาดแสดงลักษณะของ Dane particle ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งประกอบด้วย envelope, HbsAg และ nucleocapsid ที่มี HbcAg และ viral genome (HBV DNA) และ เอนไซม์ DNA polymerase/reverse transcriptase (7)

ลักษณะทางพันธุกรรมและโปรตีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

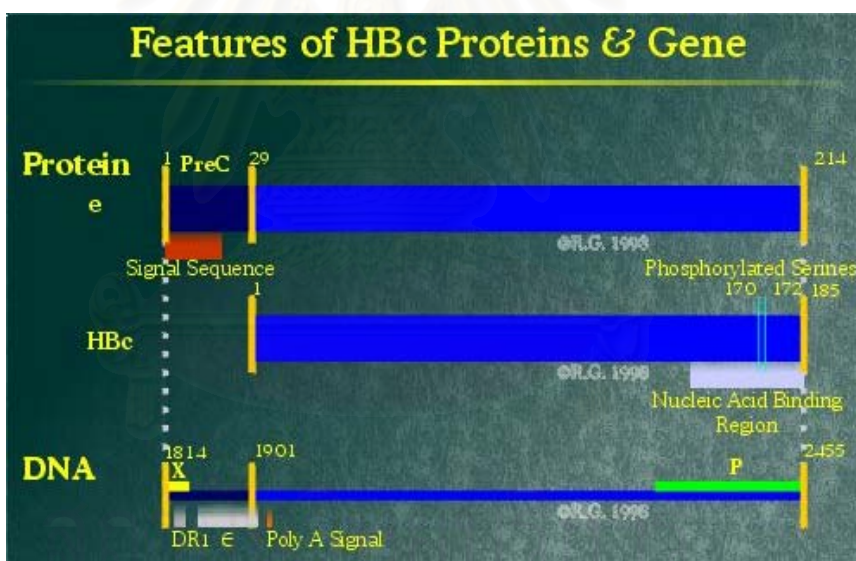
Genome ของเชื้อไวรัส เป็นสายคู่แบบไม่สมบูรณ์ (incomplete double strand) โดยสายลบ หรือ negative strand มีความยาวตลอดสายประมาณ 3200 นิวคลีโอไทด์ แต่สายบวกหรือ positive strand มีความยาวไม่ครบ ซึ่งอาจแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับไวรัสแต่ละตัว ประกอบด้วย 4 open reading frame (ORF) ซ้อนทับกันอยู่ ทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีน 4 ชนิด คือ S ORF ใช้ในการสร้าง surface protein หรือ HBsAg, C ORF ใช้ในการสร้าง nucleocapsid protein หรือ hepatitis B core antigen (HbcAg) และ HBe protein, P ORF ใช้ในการสร้างเอนไซม์ DNA polymerase) และ reverse transcriptase (RNA-dependent-DNA polymerase) และ X ORF ใช้ในการสร้างไวรัสตับอักเสบบี HBx protein (รูปที่ 3) (8)

S ORF

S ORF ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสร้าง HbsAg ซึ่งเดิมเรียกว่า Au antigen ยีนนี้มีบริเวณที่ใช้สร้างโปรตีนได้ 3 บริเวณ ดังนั้นจึงสามารถสร้างโปรตีนได้ 3 ชนิดคือ โปรตีนหลัก (major protein)



รูปที่ 4 ภาพวาดแสดงยีนและโปรตีนทั้งสามชนิดที่สร้างจาก S ORF (12)

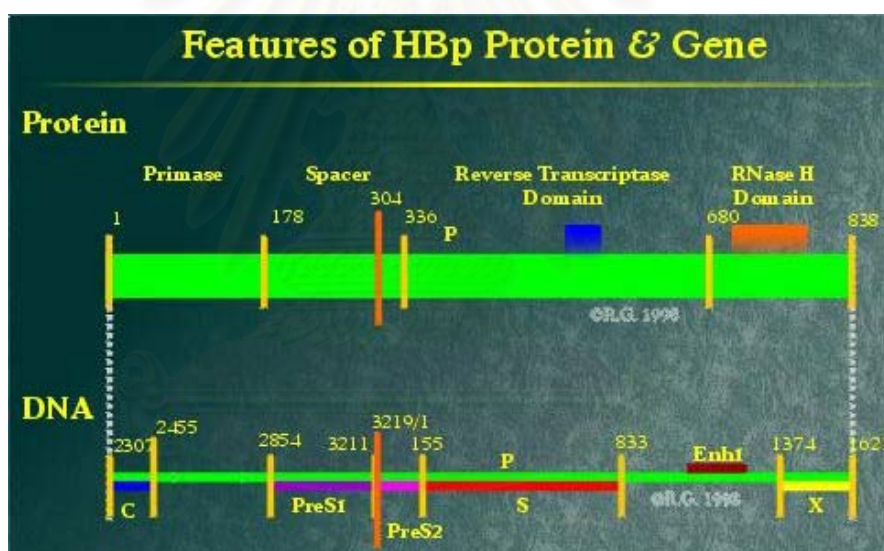


รูปที่ 5 ภาพวาดแสดงยีนและโปรตีนทั้งสองชนิดที่สร้างจาก C ORF (13)

HBcAg เป็น processed product ของ precore protein โดยเกิดจากการย่อยส่วนของ precore protein ที่ปลายด้าน carboxy และ amino HBcAg สามารถตรวจพบได้ในเลือด มีประโยชน์ในทางคลินิก สามารถใช้เป็นตัวบ่งถึงการติดเชื้อในระยะที่เชื้อไวรัสยังคงแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนอยู่ เชื่อว่า HBcAg อาจทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยแอนติบอดีต่อ HBcAg (Anti-HBc) ได้ เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกับ HBcAg ที่เป็นเป้าหมายทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกัน (14)

P ORF

P ORF ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสร้างเอนไซม์ polymerase โดยเป็น open reading frame ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในยีนยาวถึง 2496 นิวคลีโอไทด์ หรือประมาณ 3 ใน 4 ของ genome ทั้งหมด ซ่อนทับอยู่กับ ORF อื่น ทั้ง 3 ORF แต่อยู่กันคนละ reading frame จึงเป็นรหัสที่ใช้สร้างกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน เอนไซม์ที่สร้างจาก P ORF มีขนาดใหญ่มาก ประกอบด้วยกรดอะมิโน 832 ตัวและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 93.2 กิโลดัลตัน เป็นเอนไซม์ที่มีหลายหน้าที่ (multifunctional) โดยอาศัย functional domain ต่างๆ เช่น ปลายทางด้าน amino terminus ทำหน้าที่เป็น protein primer ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จาก RNA pregenome intermediate ถัดมาเป็น domain ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ DNA polymerase และ reverse transcriptase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส ส่วน domain ด้านปลาย carboxyl terminal) เป็น Rnase H (รูปที่6) (15)

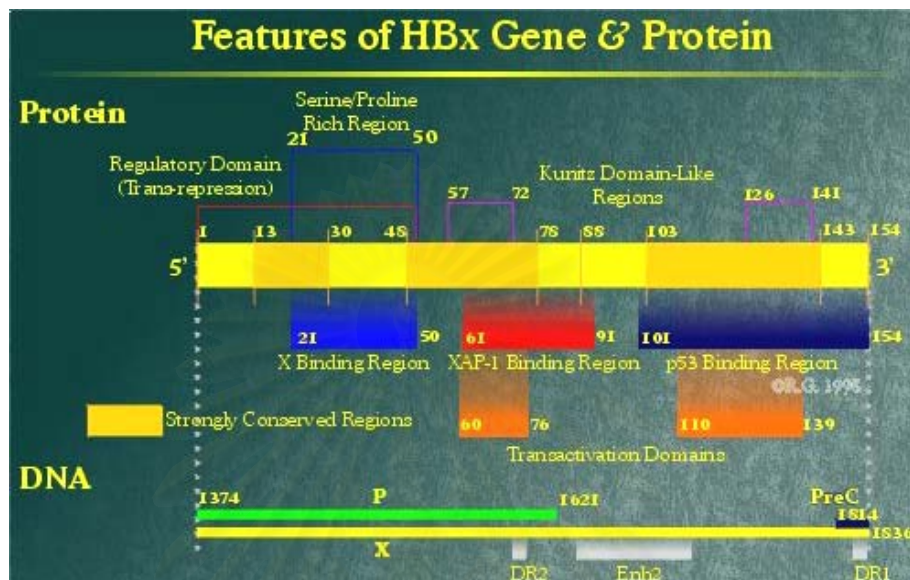


รูปที่ 6 ภาพวาดแสดงยีนและโปรตีนที่สร้างจาก P ORF (16)

X ORF

X ORF ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสร้างโปรตีนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 154 ตัว (รูปที่7) ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการสร้างสายดีเอ็นเอ (transcriptional trans-activator) เรียกว่า X protein (HBx) มีความสำคัญต่อการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต่อต้านการสร้างสาย DNA หรือ transcription ของ gene ต่างๆของเชื้อไวรัสและ gene ของมนุษย์เช่น SV40, c-Fos, C-jun หรือ RNA polymerase II gene Hbx อาจมีบทบาทสำคัญของการทำให้เกิดโรคมะเร็งตับ

หลังจากติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (17) ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไปในหัวข้อโรคมะเร็งตับกับ HBx



รูปที่ 7 ภาพวาดแสดงยีนและโปรตีนที่สร้างจาก X ORF (18)

การดำเนินโรคของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

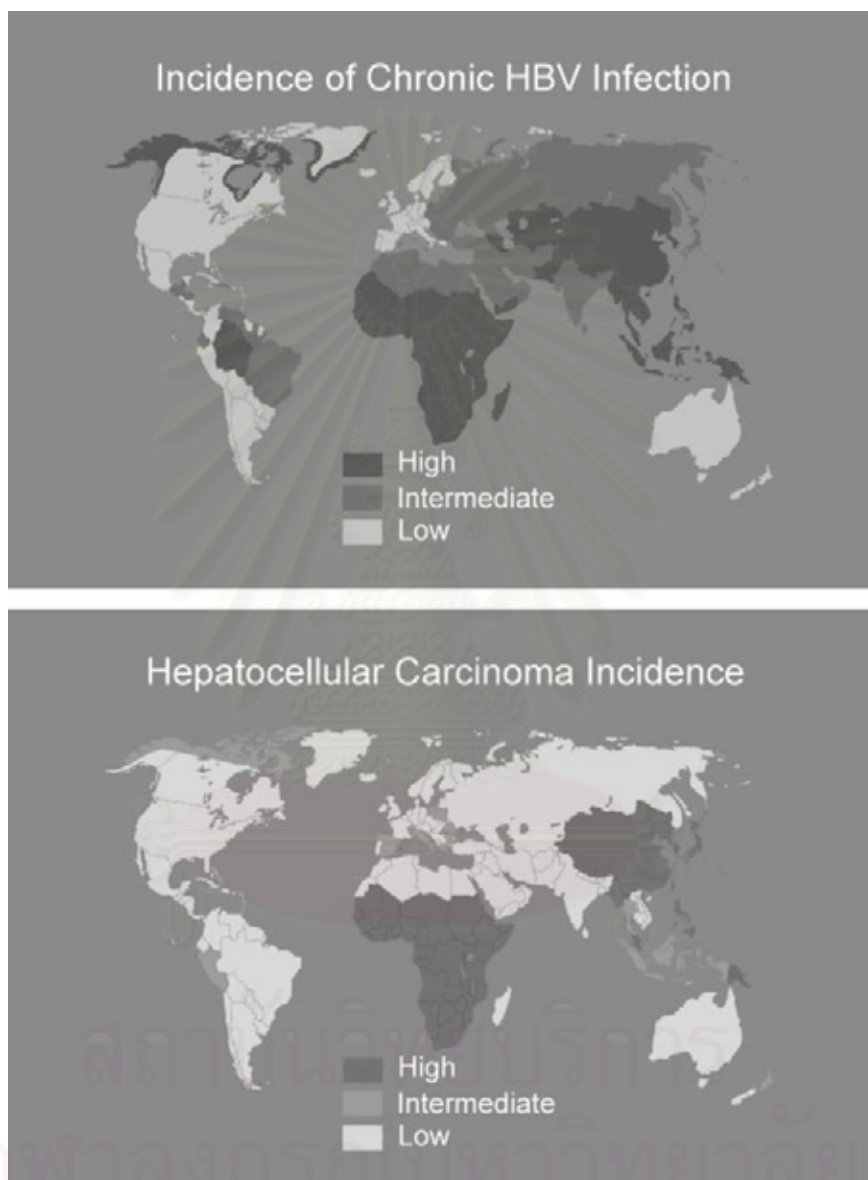
ผู้ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีประมาณร้อยละ 50 จะติดเชื้อแบบไม่มีอาการ ประมาณร้อยละ 45 จะมีอาการของโรคตับอักเสบบีที่ตรวจพบได้หรืออาการทางคลินิก ผู้ป่วยร้อยละ 0.5-1 จะเกิดอาการติดเชื้อแบบรุนแรงจนเสียชีวิต ผู้ป่วยร้อยละ 5-10 จะไม่สามารถกำจัดเชื้อได้และเกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง โดยอาจจะเป็นพาหะของโรคโดยไม่มีอาการ หรือเป็นโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง ผลที่ตามมาของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี คือการเกิดโรคตับแข็ง (cirrhosis) และโรคมะเร็งตับ โดยมักเกิดโรคตับแข็ง ภายใน 10-20 ปีหลังจากติดเชื้อ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีความสำคัญที่สุดในการเกิดโรคมะเร็งตับ โดยมักเกิดหลังจากการติดเชื้อเป็นเวลานานมากกว่า 25-30 ปี และยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัดว่าเกิดจากกลไกใด (1)

โรคมะเร็งตับกับไวรัสตับอักเสบบี

โรคมะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่พบได้บ่อยเป็นอันดับ 5 ของโรคมะเร็งที่พบได้บ่อย ในแต่ละปีจะปรากฏผู้ป่วยใหม่ประมาณ 437,000 รายหรือ 5.4% ของผู้ป่วยใหม่ที่เป็นมะเร็งทั้งหมด มีความรุนแรงอยู่ในอันดับ 4 รองจาก มะเร็งปอด มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นสาเหตุหลักของการตายด้วยโรคมะเร็งของผู้ใหญ่ในเอเชีย และ Sub-Saharan Africa (19)

การระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดโรคมะเร็งตับ มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด พบว่าประเทศในเอเชียตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เกาหลีใต้ ญี่ปุ่น ไต้หวัน และเกาะทางใต้ของทวีปแอฟริกา ที่มีอัตราของพาหะของโรคไวรัสตับอักเสบบี (HBV) สูง (7-15%) ก็จะพบอัตราของโรคมะเร็งตับ (HCC) สูงด้วย (113 คน ต่อ 100,000 คน ของประชากร) ในประเทศที่จัดเป็นประเทศอุตสาหกรรม ที่ซึ่งอัตราพาหะของโรค HBV น้อยกว่า 2% อัตราของโรคมะเร็งตับ (HCC) ก็จะพบไม่บ่อย (3-5 คน ต่อ 100,000 คน ของประชากร) ประเทศที่มีอัตราของพาหะของโรคไวรัสตับอักเสบบี (HBV) กับปานกลาง (2-7%) เช่น ประเทศตะวันออกไกล และประเทศกรีซก็จะพบอัตราของโรคมะเร็งตับ (HCC) ปานกลาง (20)

ความเกี่ยวข้องกันของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการเกิดโรคมะเร็งตับ ถูกรายงานครั้งแรก โดย Sherlock และคณะ เมื่อพบ Hepatitis B surface antigen (HBsAg) ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ 5 คน (21) จนถึงทุกวันนี้มีการพิสูจน์แน่ชัดแล้วว่าการเกิดโรคมะเร็งตับและเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความสัมพันธ์กันอย่างชัดเจน โดยพบว่าในกลุ่มประชากรที่มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งตับสูง (endemic) หรือสูงมาก (hyperendemic) สามารถตรวจพบHBsAg ใน serum ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับถึง 85% แต่จะพบในกลุ่มควบคุมน้อยกว่า 15% อย่างไรก็ตามอัตราการพบ HBsAg ในซีรัม ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ จะต่ำหรือน้อยกว่า 25% ในกลุ่มประชากรที่มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งต่ำโดยปัจจัยเสี่ยงของโรคมะเร็งตับในกลุ่มนี้มักมาจากเชื้อไวรัส HCV หรือ แอลกอฮอล์ (22) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มประชากรที่มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งตับสูงมักพบการติดเชื้อตั้งแต่วัยเด็ก ติดเชื้อตั้งแตอยู่ในครรภ์ ติดเชื้อในวัยทารก หรือ วัยเด็ก จะมีความเสี่ยงถึง 90% ที่จะเป็นพาหะแบบเรื้อรัง (23) ซึ่งจะมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับมากกว่าปกติถึง 100 เท่า และ 40% ของผู้ป่วยพาหะแบบเรื้อรังนี้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งตับ ตับแข็ง หรือทั้งสองอย่าง นอกจากนี้ Lohiya และคณะพบว่าผู้ป่วยเด็กที่ตรวจพบ HBsAg และได้รับการเลี้ยงดูในสิ่งแวดล้อมที่ปราศจาก aflatoxin B1 หรือสารก่อมะเร็งอื่นๆ ก็สามารถเกิดโรคมะเร็งตับได้และเกิดขึ้นโดยปราศจากอาการตับแข็ง (24) และสิ่งสุดท้ายที่ยืนยันถึงการก่อมะเร็ง (oncogenic) ของไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่การลดลงของโรคมะเร็งตับ ตั้งแต่มีการให้วัคซีนต่อไวรัสตับอักเสบบีทั่วโลก พบว่าในไต้หวันตั้งแต่มีการให้วัคซีนเมื่อปี 1986 อัตราการเกิดพาหะในเด็กลดลง 10 เท่า และลดการเกิดโรคมะเร็งตับในเด็กถึง 50% (25)

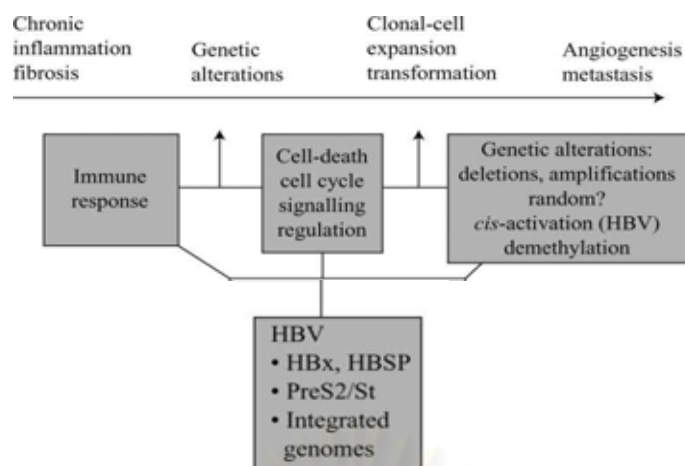


รูปที่ 8 แผนที่ทั่วโลกที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง geographical ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและการเกิดโรคมะเร็งตับ(hepatocellular carcinoma) (20)

เช่นเดียวกับรูปแบบของสารก่อมะเร็งทั่วไป ไวรัสตับอักเสบบีชักนำให้เกิดโรคมะเร็งตับ ผ่านกระบวนการหลากหลายขั้นตอน แบ่งได้เป็นโดยตรงและโดยอ้อม กลไกโดยอ้อมเชื่อว่า เกิดจาก chronic necroinflammatory disease จาก chronic active hepatitis เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะทำให้เซลล์ตับอักเสบบีและการสร้างและหลั่ง cytokine ทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับ (necrosis) และ fibrosis เมื่อเป็นอย่างเรื้อรัง ทำให้เกิดการสร้างใหม่ (regeneration) ของเซลล์ตับเพิ่มขึ้นอย่างผิดปกติ เนื่องจาก cytokine ที่สร้างขึ้นระหว่างการอักเสบบางตัวสามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์ตับ (liver cell proliferation) ได้ และการเกิด fibrosis นั้นได้ทำลาย Lobular architecture ของตับและสร้าง cell to cell และ cell extra cellular matrix interaction ขึ้นมาใหม่ ทำให้เซลล์บริเวณใกล้เคียงได้รับผลกระทบด้วย แต่เนื่องจากเซลล์ตับนั้นจะอยู่ในภาวะ quiescent state ของ cell cycle การเกิด liver cell proliferation ใหม่อีกครั้ง ทำให้เซลล์ตับเข้าสู่ cell cycle อีกครั้ง ส่งผลให้กระบวนการ DNA repair ของเซลล์ผิดปกติ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือ การเปลี่ยนแปลงโครโมโซม (chromosomal rearrangement) ชักนำให้เกิด genetic event อื่นๆ อีกหลายขั้นตอนเช่น angiogenesis จนชักนำไปสู่การเกิดมะเร็งในที่สุด (26)

สำหรับกลไกโดยตรงเชื่อว่าเกิดจากการแทรกตัวของ ไวรัสตับอักเสบบี DNA (HBV DNA integration) การ integration ของ HBV DNA ต่างจากการ integration ของ retrovirus เนื่องจากไม่จำเป็นต้องการ replication ของ HBV แต่อย่างไร แต่ทำให้มี genome ของไวรัสอยู่ในเซลล์ตับอย่างถาวร และทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ chromosome เซลล์ตับ เช่น deletion และ chromosomal translocation ส่งผลให้ cell proliferation ผิดปกติ เกิด necrosis หรือ apoptosis ต่อไป HBV DNA integration นี้พบกว่า 90% ของ tumour cell ของผู้ป่วยตับอักเสบบี เนื่องจากในระยะท้ายๆ ของโรคตับอักเสบบี HBV จะไม่สามารถ replicat ได้ แต่การ integration ของ HBV DNA ทำให้ HBV ยังสามารถสร้างโปรตีนบางชนิด เช่น HBx และ Truncated preS2/S ได้ (20)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 รูปภาพแสดงกระบวนการเกิดมะเร็งโดยไวรัสตับอักเสบบีโปรตีนที่สร้างจากไวรัสตับอักเสบบีกระตุ้นการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันและทำให้เซลล์ตับอักเสบ การแทรกตัวของดีเอ็นเอไวรัสเข้าไปในเซลล์ตับกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (แปลงจากเอกสารอ้างอิง 26)

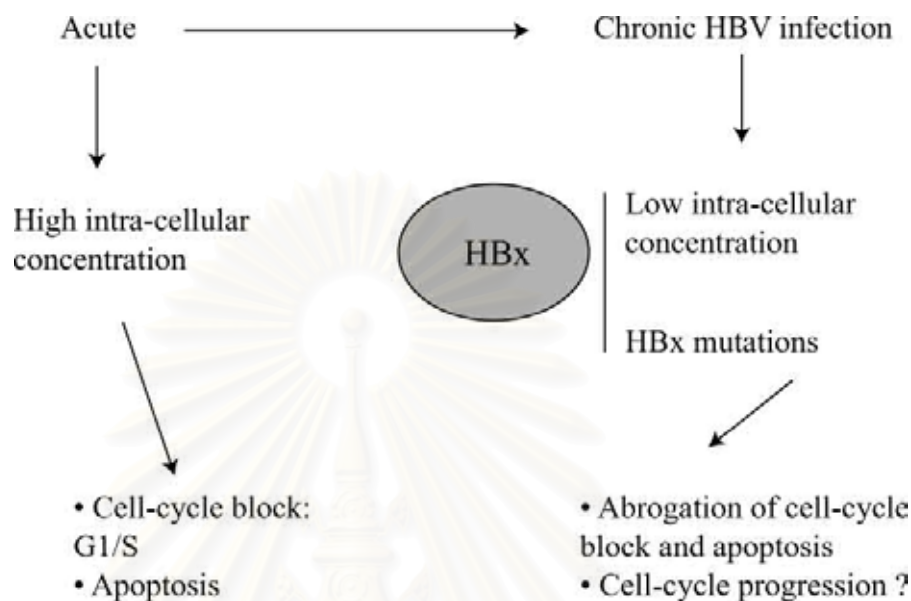
นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆอีก เช่น การกระตุ้นการทำงานของ host gene เช่น growth regulatory genes) การกระตุ้นการตายของเซลล์ (apoptosis) หรือรบกวนการทำงานของโปรตีนนาซลล์ โดยโปรตีนที่สร้างจากไวรัสตับอักเสบบี (HBV-encoded proteins) เช่น HBx protein, หรือการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี(20)

โรคมะเร็งตับกับไวรัสตับอักเสบบี อี็กซ์ โปรตีน

ไวรัสตับอักเสบบี (HBV) X protein (HBx) ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากเชื่อว่ามี ความเกี่ยวข้องอย่างมากกับการเกิดโรคมะเร็งตับ

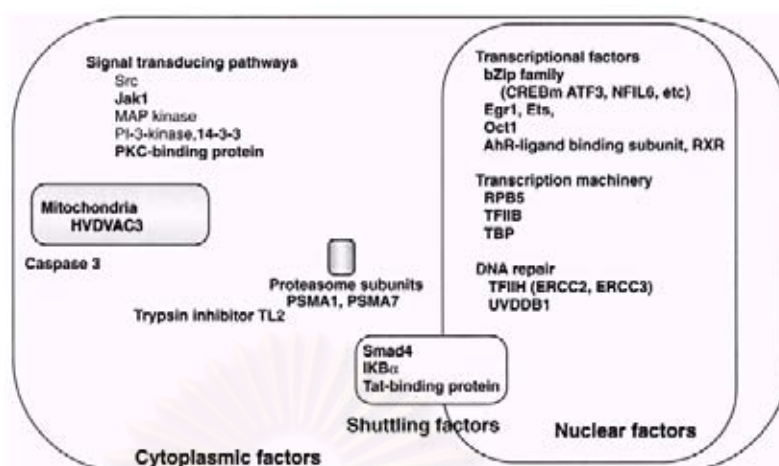
ความสำคัญของไวรัสตับอักเสบบี HBx ต่อวงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบียังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่สันนิษฐานว่าน่าจะเกี่ยวกับการกระตุ้นการสร้างดีเอ็นเอ (transcription) เนื่องจาก X ORF อยู่ที่ปลาย 3' ของ pregenomic RNA ในตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งที่ใช้ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ใช้ในการควบคุมการสร้างดีเอ็นเอ (transcriptional regulating protein) ของ retroviruses เช่น Tat โปรตีนของ HIV (20) และจากการศึกษาพบว่า HBx จำเป็นต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้สันนิษฐานว่า HBx อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ ยิ่งไปกว่านั้น X ORF จะมีความคล้ายคลึงกัน (conserve) ในกลุ่ม mammalian hepadnavirus ที่มีรายงานถึงการเกิดมะเร็งตับ แต่ในกลุ่ม avian

hepadnavirus ที่ไม่พบ X ORF ก็ไม่พบการรายงานถึงมะเร็งตับด้วย (27) นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึง การเกิดมะเร็งตับใน HBx Transgenic mice อีกด้วย (28)



รูปที่ 10 รูปภาพแสดงผลกระทบของ HBx ต่อเซลล์ตับ(26)

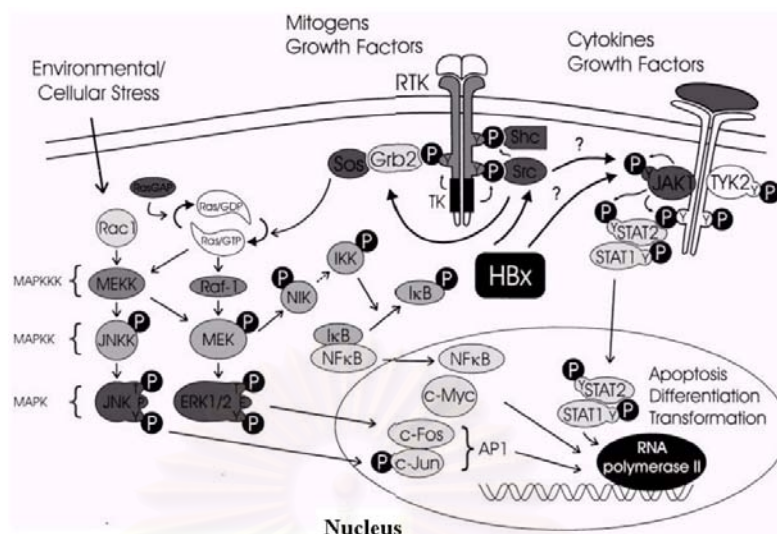
HBx สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนโดยการเพิ่มอัตราของการสร้างสาย DNA แต่ HBx ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนโดยการจับกับ DNA โดยตรงได้ HBx จึงกระตุ้นการแสดงออกของยีนผ่าน transcription factor เช่น RNA polymerase (Pol II), TATA-binding protein หรือ ATF/CREB หรือโปรตีนที่ใช้ในการสื่อสาร (cytosolic signal transduction pathway) เช่น Janus family tyrosine kinase (Jak1) Signal transducer and activator of transcript (STAT) และ Mitogen activate protein kinase (MAPK) (13,14,15) ดังนั้น HBx จึงมีความสามารถในการจับกับ (interact) โปรตีนหลากหลายชนิดทั้ง โปรตีน ในซัยโตพลาสซึม ใน นิวเคลียส และโปรตีนที่เดินทางระหว่างซัยโตพลาสซึมกับนิวเคลียส (29)



รูปที่ 11 รูปภาพแสดงโปรตีนที่สามารถจับกับไวรัสตับอักเสบบี เอ็กซ์ โปรตีน (HBx) ทั้งโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ในนิวเคลียส และในไมโทคอนเดรีย (29)

HBx ยังได้ถูกรายงานถึงความสามารถทั้งการกระตุ้นการตายของเซลล์ (apoptosis) ผ่านกระบวนการหลากหลายเช่น พบว่า HBx สามารถทำให้ Mitochondria ไม่สามารถทำงานได้ เช่น ไม่สามารถทำ electron transport จนทำให้เซลล์ตายในที่สุด (30)

สุดท้ายนี้ยังพบความสัมพันธ์กันระหว่าง HBx กับโปรตีน p53 ซึ่งเป็น Tumor suppressor gene ซึ่งมีหน้าที่หลากหลายในเซลล์ การจับกันระหว่าง HBx กับ p53 ทำให้ p53 ไม่สามารถทำงานได้ เช่น ไม่สามารถการควบคุมการตายของเซลล์ (p53-mediated apoptosis) หรือ ไม่สามารถซ่อมแซม nucleotide ได้ (nucleotide excision repair) (31,32)



รูปที่ 12 รูปภาพแสดงการกระตุ้นการทำงานของ MAP kinase และ JAK/STAT cellular signalling pathways โดย HBx(ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง 20)

สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีและความสำคัญทางคลินิก

เชื้อไวรัสตับอักเสบบีสามารถจำแนกเป็นกลุ่มย่อยๆ หรือ subtype ได้ 4 subtype โดยใช้HBsAg คือ *adr*, *adw*, *ayr*, และ *ayw* การศึกษาหัตถพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ละสายพันธุ์ ทำให้สามารถจำแนกเชื้อออกตามลักษณะทางพันธุกรรมได้เป็น genotype จำนวน 7 genotype คือ A-G ซึ่งระบาดอย่างจำเพาะตามภูมิภาคโลกได้แก่ genotype B และ C พบการระบาดแถบเอเชียในขณะที่ genotype A และ D จะพบบ่อยในตะวันตก และอินเดีย genotype E พบในแอฟริกา genotype F พบในอเมริกากลางและใต้ ส่วน genotype G เพิ่งพบเมื่อไม่นานมานี้ที่ฝรั่งเศสและอเมริกาเหนือ โดยแต่ละ genotype จะมีความแตกต่างกันไม่ถึง 8 % (33,34) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า genotype มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคตับอักเสบบี เช่น HBV genotype C มีความรุนแรงของการเกิดโรคมากกว่า HBV genotype B เนื่องจาก HBV genotype C สามารถตรวจพบ HBeAg นานกว่าและมี immune clearance phase ที่นานกว่า genotype B สามารถตรวจพบระดับของ HBV DNA มากกว่า มีความรุนแรงของการบาดเจ็บของตับมากกว่า และมีการตอบสนองการรักษาด้วย Interferon น้อยกว่า genotype B (35,36) แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่าง genotype ของไวรัสกับการเกิดมะเร็งตับยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาในไต้หวันพบว่า มักพบ genotype C ในผู้ป่วยตับแข็งและมะเร็งตับที่มีอายุมากกว่า 50 ปี เป็นส่วนมาก ส่วน genotype B มักพบในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีอายุน้อยกว่า 50 ปี และกว่า 90% ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีอายุน้อยกว่า 35 ปี สันนิฐานว่าไวรัสตับอักเสบบี genotype (genotype) บี (B) น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วย

อายุน้อย (37) ในทางตรงกันข้ามการศึกษาที่ญี่ปุ่นและจีนแสดงว่าไวรัสตับอักเสบบี genotype C มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งตับแต่ไวรัสตับอักเสบบี genotype B นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งตับน้อยกว่า (38,39) สำหรับประเทศไทยพบว่าการพบ ไวรัสตับอักเสบบี genotype B จะเพิ่มขึ้นตามอายุและไม่พบในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีอายุน้อยกว่า 40 ปีเลย ในทางตรงกันข้ามไวรัสตับอักเสบบี genotype C มักพบในผู้ป่วยอายุน้อย และพบน้อยลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (40)

Genotype	Subtype	Areas of predominance
A	<i>adw2, ayw1</i>	North-western Europe, USA, Central Africa
B	<i>adw2, ayw1</i>	Taiwan, Japan, Indonesia, China, Vietnam
C	<i>adw2, adrq+, adrq-, ayr</i>	East Asia, Taiwan, Korea, China, Japan, Polynesia, Vietnam
D	<i>ayw2, ayw3</i>	Mediterranean area, India
E	<i>ayw4</i>	West Africa
F	<i>adw4q-, adw2, ayw4</i>	Central and South America, Polynesia
G	<i>adw2</i>	France, USA

ตารางที่ 1 แสดงการกระจายตัวของ genotype ของไวรัสตับอักเสบบีตามภูมิภาคของโลก (41)

	Genotype C	Genotype B
Positivity of HBeAg	More	Less
Immune clearance phase	Longer	Shorter
Severity of acute exacerbations	More	Less
Histological activity	Higher	Lower
Serum HBV-DNA level	Higher	Lower
Frequency of precore stop codon mutation	Less	More
Frequency of basal core promoter mutation	More	Less
Response to antiviral treatment	Worse	Better
Clinical outcome (cirrhosis and liver cancer)	Worse	Better (Japan, China), variable (Taiwan)

HBeAg, hepatitis B e antigen; HBV, hepatitis B virus.

ตารางที่ 2 แสดงความแตกต่างของความรุนแรงของโรกระหว่างไวรัสตับอักเสบบี genotype B และ C (41)

นอกจากนี้ genotype ของไวรัสยังมีผลต่อการกลายพันธุ์ของไวรัสอีกด้วย โดยการกลายพันธุ์แบบ missence mutation ที่ nucleotide 1896 จาก G เป็น A หรือ Precore stop codon mutation ที่ส่งผลให้ไม่สามารถ translation ของ precore protein ได้ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบ HBeAg ได้

การกลายพันธุ์นี้พบได้บ่อยใน genotype B, C, และ D ที่พบการระบาดในแถบเมดิเตอร์เรเนียน และเอเชีย ส่วน genotype A และ F ที่พบการระบาดในแถบยุโรปเหนือและอเมริกาเหนือ พบการกลายพันธุ์นี้น้อยมาก ทั้งนี้มาจากชนิดของ nucleotide ที่ 1858 ของแต่ละ genotype เพราะ nucleotide 2 ตำแหน่งนี้จะจับกันเป็น wobble pairing สร้างเป็น stem loop ในกระบวนการ encapsidation ของ pregenomic RNA สำหรับ genotype A และ F ที่ nucleotide 1858 เป็น C การกลายพันธุ์ G1896A จะทำลาย stem loop และความเสถียร ของ pregenomic RNA ทำให้การกลายพันธุ์ไม่ค่อยพบ แต่สำหรับ genotype B, C, และ D ที่ nucleotide 1858 เป็น T การกลายพันธุ์ G1896A นี้ จะเพิ่มความเสถียรให้กับ pregenomic RNA การกลายพันธุ์นี้จึงพบได้บ่อยในแถบเอเชีย นอกจากนี้ระหว่าง genotype B และ C ก็ยังพบการรายงานว่าการกลายพันธุ์นี้มากกว่า genotype C (41,42)

นอกจากการกลายพันธุ์ G1896A แล้ว การกลายพันธุ์ที่ basic core promoter A1762T/G1764A ที่ส่งผลต่อการ transcription ของ Precore protein ส่งผลให้การสร้าง HBeAg ลดลง แต่ไม่มีผลกระทบต่อ replication หรือการสร้าง HBcAg ของไวรัส การกลายพันธุ์นี้มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับภูมิภาคของโลกและ genotype เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ G1896A จะพบมากในแถบเอเชีย เช่น ญี่ปุ่นและฮ่องกง แต่พบน้อยในอเมริกา มากไปกว่านี้ยังพบว่า genotype C มีการกลายพันธุ์ A1762T/G1764A มากกว่า genotype B แต่ปัจจุบันนี้ยังไม่พบเหตุผลที่แน่ชัดว่าทำไมการกลายพันธุ์นี้มีความเกี่ยวข้องกับ genotype B (43)

การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีและความสำคัญทางคลินิก

ไวรัสตับอักเสบบีเป็น DNA ไวรัสที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่า DNA ไวรัสชนิดอื่นๆ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของไวรัส (viral replication) ต้องมีการเปลี่ยน genome จาก DNA เป็น RNA intermediate ก่อน แล้วจึงมีการสร้าง DNA ขึ้นใหม่จาก RNA intermediate ซึ่งต้องอาศัยกลไก reverse transcription โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase (RNA-dependent DNA polymerase) ขึ้นตอนนี้จะมีโอกาสกลายพันธุ์สูงเพราะไม่มี proof-reading mechanisms ในระหว่างการสังเคราะห์ DNA ขึ้นใหม่ เชื่อว่าไวรัสตับอักเสบบีมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่า DNA ไวรัสอื่นๆ โดยพบว่ามีอัตราการกลายพันธุ์ประมาณ 1 nucleotide/10,000 bases/infection year (44) เนื่องจากโรคไวรัสตับอักเสบบี เป็นโรคเรื้อรัง ดังนั้นจึงมีรายงานการพบเชื้อไวรัสที่กลายพันธุ์ได้บ่อย เชื้อไวรัสที่กลายพันธุ์นี้อาจกลายเป็นสายพันธุ์เด่น (dominant strains) ได้ในที่สุดถ้าการกลายพันธุ์ดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อเชื้อไวรัสเอง เช่น ทำให้เชื้อที่กลายพันธุ์สามารถหลีกเลี่ยงการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า หรือเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วกว่าและมีความทนทานต่อยาต้านไวรัสได้ดีกว่า

การกลายพันธุ์ที่ได้รับความสนใจเป็นมากกว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับได้แก่ การกลายพันธุ์บริเวณ Basic core promoter A1762T และ G1764A Kao JH และคณะ ทำการศึกษาการกลายพันธุ์นี้ในผู้ป่วย genotype B และ genotype C 250 คน พบว่าคนไข้ที่เป็นพาหะของ HBV จะมีความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับมากขึ้นหากมีการกลายพันธุ์บริเวณ A1762T และ G1764A (45) Fang ZL และคณะทำการศึกษาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยมะเร็งตับ 14 คน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้พบได้บ่อยในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับแต่พบได้น้อยในกลุ่มควบคุม (46) Takahane K และคณะทำการศึกษา genome ของ HBV ของผู้ป่วยมะเร็งตับพบการกลายพันธุ์นี้ถึง 85% (47) Baptista M และคณะ พบการกลายพันธุ์ที่ A1762T/G1764A ในผู้ป่วยแอฟริกันที่เป็นมะเร็งตับมากกว่ากลุ่ม Asymptomatic carriers อย่างมีนัยสำคัญ (48) Cho SW และคณะ พบการกลายพันธุ์บริเวณ core promoter นี้สูงในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยมะเร็งตับสันนิษฐานว่าอาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วย HBV เป็นมะเร็งตับ (49) และ Yuen MF ทำการศึกษาแบบ case-control study พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งตับ (50) การกลายพันธุ์ในบริเวณ Basic core promoter (BCP) ซึ่งอยู่ในตำแหน่ง nucleotide ที่ 1742-1849 ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของ core และ precore RNA โดยที่ core RNA มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสเนื่องจากเกี่ยวข้องกับการสร้าง nucleocapsid protein และเอนไซม์ polymerase การกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP บริเวณ A1762T และ G1764A ทำให้การทำงานของ precore gene เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่นมีการสร้าง HBeAg ลดลงกว่าปกติ และยังทำให้การ replication ของไวรัสเพิ่มจำนวน (51,52)

แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีรายงานที่ขัดแย้งกัน Blackberg J และ Ljunggren พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ที่ A1762T และ G1764A นี้ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับกับกลุ่มพาหะแต่อย่างใด (53)

การกลายพันธุ์ในบริเวณการกลายพันธุ์ในบริเวณ Precore gene ที่พบได้บ่อยคือการเกิด point mutation ที่ตำแหน่ง nucleotide ที่ 1896 ของ codon ที่ 28 โดยมีการเปลี่ยนจาก G เป็น A (TGG เปลี่ยนเป็น TAG) ซึ่งเป็น stop codon ทำให้ไม่สามารถสร้าง precore protein ได้ เป็นผลทำให้ตรวจไม่พบ HBeAg ในเลือด การกลายพันธุ์ชนิดนี้ก็มักพบได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งตับ (20) จากการศึกษาในจีนและฮ่องกงพบการพันธุกรรมโดย Zhong S และคณะพบการกลายพันธุ์นี้ในผู้ป่วยมะเร็งตับ 22.8% แต่พบในกลุ่ม chronic carrier เพียง 5.6 % (54) Song CH และคณะพบการกลายพันธุ์ชนิดนี้ในผู้ป่วยมะเร็งตับทั้ง 3 คนที่ทำการศึกษาแต่ไม่พบในกลุ่ม asymptomatic carrier ทั้ง 3 คนเลย (55) Cho SW และคณะ นอกจากจะพบการกลายพันธุ์บริเวณ core promoter นี้สูงในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยมะเร็งตับแล้วยังพบการกลายพันธุ์ G1896A สูงในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยมะเร็งตับอีกด้วย (49)

แต่อย่างไรก็ตามเชื่อว่าการกลายพันธุ์นี้ไม่ได้ก่อมะเร็งด้วยตัวมันเองแต่เป็น natural selection ที่เกิดขึ้นระหว่างที่โรคตับอักเสบเรื้อรังพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ (20)

การกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยอีกตำแหน่งหนึ่งคือ nucleotide ที่ 1899 ของ codon ที่ 29 โดยมีการเปลี่ยนจาก G เป็น A (glycine เปลี่ยนเป็น aspartic) และสามารถพบการกลายพันธุ์ในบริเวณ Precore gene ได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งตับเช่นกัน (55,56)

การกลายพันธุ์ในบริเวณ X gene ซึ่งสร้าง HBxAg ซึ่งเชื่อว่าทำหน้าที่เป็น transcriptional trans-activator เชื่อว่ามีความสำคัญในการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส และอาจเกี่ยวข้องกับการกลไกเกิดโรคมะเร็งตับ อย่างไรก็ตามการเกิดมะเร็งตับโดย HBxAg ยังไม่มีข้อพิสูจน์ที่ชัดเจนโดยตรงและไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอนของโปรตีนนี้ (29) การกลายพันธุ์ในบริเวณนี้พบได้ไม่บ่อยนัก อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาที่แสดงว่าการกลายพันธุ์ในบางตำแหน่งของ X gene ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ เช่น การเกิด point mutations ที่ codon 130(K130M) และ 131(V131I) หรือตำแหน่งเดียวกับการกลายพันธุ์บริเวณ Basic core promotor (BCP) ที่ตำแหน่ง nucleotide ที่ 1762 และ 1764 โดยเปลี่ยนจาก A เป็น T และ จาก G เป็น A (45-50) การกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งตับอีกตำแหน่งได้แก่ การกลายพันธุ์ในตำแหน่งของ codon31 (S31A) (57) การกลายพันธุ์หลายตำแหน่งในบริเวณ B cell epitope region (codon 29-48) และ T cell epitope region (codon 116-127) (58) การกลายพันธุ์ที่บริเวณ NRE (negative regulatory element) ที่นิวคลีโอไทด์ที่ 1613 จาก G เป็น A การกลายพันธุ์ที่บริเวณ box α ที่นิวคลีโอไทด์ที่ 1643 จาก C เป็น T หรือ การกลายพันธุ์ที่บริเวณ BCP อีกตำแหน่งหนึ่งได้แก่ นิวคลีโอไทด์ที่ 1753 จาก T เป็น C หรือ A (47)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ผู้ป่วยที่ผ่านการวินิจฉัยโรคว่าเป็นมะเร็งตับด้วยการตรวจเลือด การเอ็กซ์เรย์และการตรวจชิ้นเนื้อตับ คือกลุ่มศึกษา (Case) ผู้ป่วยที่ผ่านการวินิจฉัยโรคว่าเป็นตับอักเสบเรื้อรังกลุ่มอื่นที่ไม่เป็นมะเร็งตับด้วยการตรวจเลือด การเอ็กซ์เรย์และการตรวจชิ้นเนื้อตับ คือกลุ่มควบคุม (Control) ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มได้รับการตรวจวินิจฉัยที่แผนกผู้ป่วยนอกโรคทางเดินอาหาร รพ. จุฬาลงกรณ์

เก็บตัวอย่าง clotted blood จำนวน 10-15 มล.จากผู้ป่วย ปั่นแยกซีรัมออกแล้วแช่แข็งเก็บไว้ที่ -70°C ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางหน่วยปฏิบัติการวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จับคู่ผู้ป่วยมะเร็งตับกับผู้ป่วยโรคตับอักเสบเรื้อรังกลุ่มอื่นๆ โดยให้มีอายุใกล้เคียงกัน และเพศเดียวกันประมาณ 50 คู่

เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1 Micro tube ขนาด 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml
- 1.2 PCR tube ขนาด 100 ul
- 1.3 Automatic adjustable micropipette 0.2-2 ul, 0.5-10 ul, 5-20 ul, 20-100 ul 0.1-1 ml (Eppendorf, germany)
- 1.4 Micropipette Tip ขนาด 2 ul, 20 ul 200 ul 1 ml
- 1.5 เครื่องแก้วขนาดต่างๆ
- 1.6 Vortex
- 1.7 Centrifuge
- 1.8 Micro-centrifuge
- 1.9 Refrigerator-centrifuge
- 1.10 Refrigerator and Freezer
- 1.11 Muti-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- 1.12 Thermal cycle (GeneAmp PCR System 2400.Perkin-Elmer, Boston)
- 1.13 Combs and Electrophoresis chamber set (Bio-Rad, USA)
- 1.14 Electrophoresis

- 1.15 Gel Doc 1000 (Bio-Rad, USA)
- 1.16 ABIPRISM™ 3100 Genetic Analyser (Perkin Elmer Cetus Branchburg, New Jersey)
2. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)
 - 2.1 Lysis buffer ((Tris-HCL(USB, Hong Kong)), (EDTA (USB, Hong Kong)),(SDS (USB, Hong Kong))
 - 2.2 Phenol, Chloroform (CH₃Cl), (Sigma, Singapore)
 - 2.3 Isoamyl alcohol (IAA), (Sigma, Singapore)
 - 2.4 Absolute ethanol (AbEtOH), (Sigma, Singapore)
 - 2.5 2 M Sodium acetate (NaOAc) (USB Hong Kong)
 - 2.6 Glycogen
3. สารเคมีในการทำ PCR
 - 3.1 Eppendrof MasterMix (2.5X)
 - 3.2 Primer
 - 3.3 Molecular grad water
4. สารเคมีในการทำ gel electrophoresis และการถ่ายภาพ gel
 - 4.1 TBE(Tris-base, Boric acid, EDTA)
 - 4.2 Agarose gel
 - 4.3 Bromophenol blue
 - 4.4 100 bp DNA ladder
 - 4.5 Ethidium bromide
5. สารเคมีในการทำ DNA sequencing
 - 5.1 Perfectprep^(R) Gel Cleanup Eppendorf
 - 5.2 BigDye terminator Version 3.0 (PE Biosystems,CA
 - 5.3 TSR
 - 5.4 Isopropanol
 - 5.5 Glycogen

วิธีการดำเนินการวิจัย

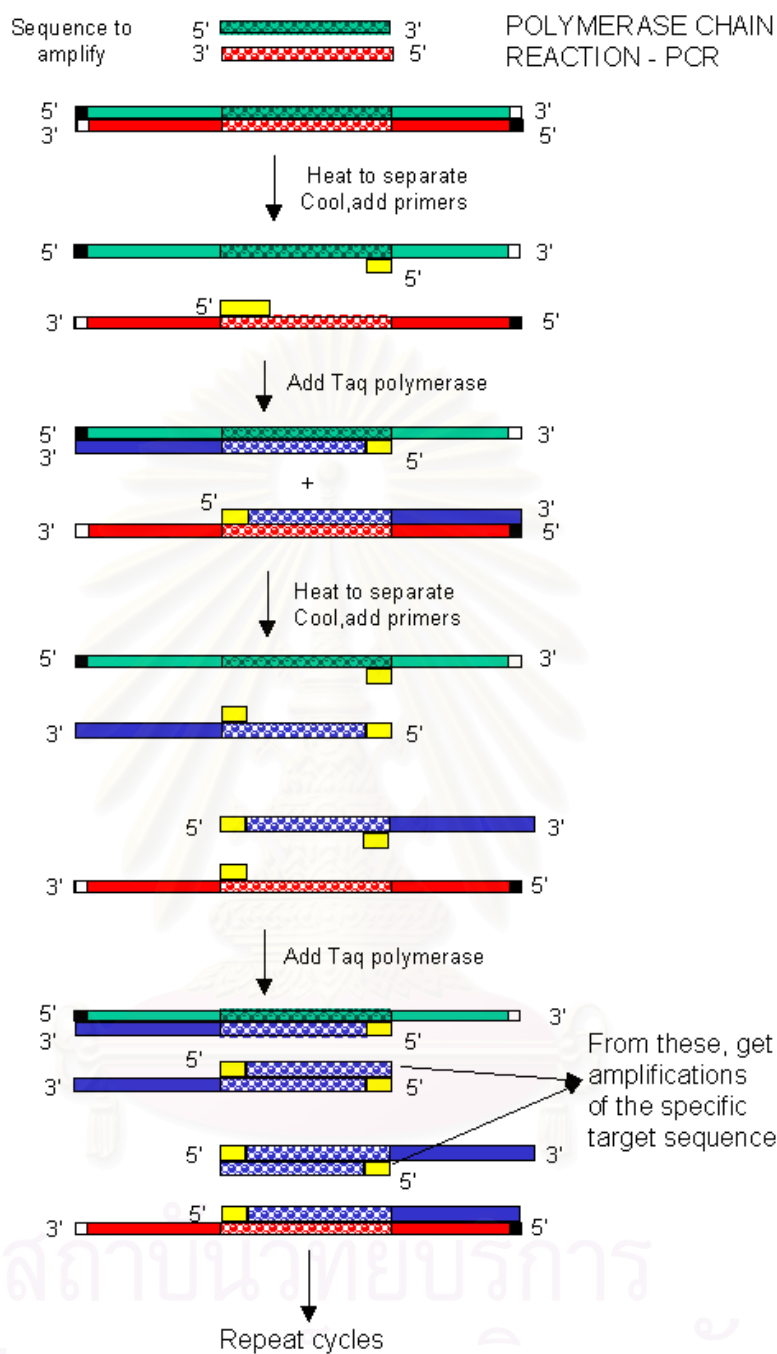
1. สกัด DNA (DNA extraction) โดยวิธี Phenol-chloroform extraction

ผสม 100 μ l Serum , 400 μ l lysis buffer และ Proteinase K 10 μ l เข้าด้วยกันแล้ว incubate ที่ 50 c เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงจากนั้นเติม phenol 250 μ l และ CH_2Cl_2 :IAA(อัตราส่วน 49:1) 250 μ l แล้วนำไป vortex จนเข้ากันดีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 10 นาที นำส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่แล้วเติม CH_2Cl_2 :IAA (อัตราส่วน 49:1) 500 μ l แล้วนำไป vortexจนเข้ากันดีนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 10 นาทีอีกครั้งนำส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่แล้วเติม AbEtOH 800 μ l, NaOAc 40 μ l และ glycogen 4 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่ -70 c นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 รอบต่อนาที 30 นาที ดูด Ab EtOH แล้วล้าง pallet ของ DNA และ glycogen ด้วย 70% EtOH นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 1-2 นาที จากนั้นดูด 70% EtOH ออก แล้วทำให้แห้ง ละลายด้วยน้ำกลั่น 30 μ l เมื่อต้องการใช้

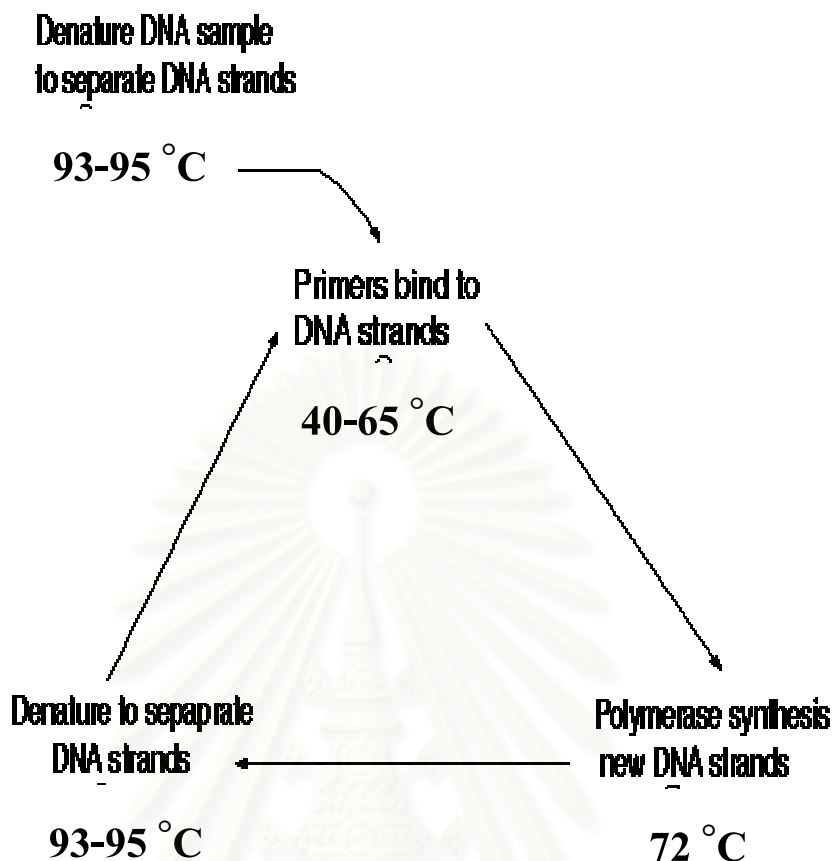
2. เพิ่มจำนวนสาย DNA โดยวิธี Polymerase Chain reaction (PCR)

Polymerase Chain reaction (PCR) คือการเพิ่ม DNA ด้วย Specific primer ในหลอดศึกษา โดยอาศัยความร้อนและเอนไซม์ polymerase ที่ทนความร้อน หลักการในการทำ PCR คือการสร้าง DNA จากต้นแบบโดยอาศัยการต่อสาย oligonucleotide primers 2 เส้น ซึ่งแต่ละเส้นจะ hybridize กับ DNA ต้นแบบเส้นตรงข้ามที่ถูกแยกออกจากกันด้วยความร้อน เอนไซม์ polymerase ที่ทนความร้อนจะสร้าง DNA ขึ้นโดยการต่อจากปลาย primers ทั้ง 2 เส้นตาม DNA ต้นแบบจนกระทั่งสุดปลาย DNA ต้นแบบโดยการสร้าง DNA จะทำได้ทิศทางเดียวคือจาก 5' ไป 3' ผลที่ได้คือ DNA ใหม่ที่สร้าง complementary กับ DNA ต้นแบบ กระบวนการนี้จะถูกทำเป็นรอบๆ ซ้ำๆ กันในที่สุดก็จะได้ DNA เพิ่มแบบเป็นทวีคูณ (59)

ในปัจจุบันรอบการทำ PCR ที่มักใช้กันคือ ขั้นที่ 1. ใช้ความร้อนเพื่อทำให้เกิด DNA สายเดี่ยว ใน ปฏิกิริยาจะมี primer, dNTP, PCR buffer และ Taq polymerase โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ 93-95 °C ขั้นที่ 2 oligonucleotide จะเข้าไป anneal กับ DNA ต้นแบบ โดยการลดอุณหภูมิลงมาที่ 40-65 °C แล้วแต่ primer ที่ใช้ ขั้นที่ 3 คือการต่อ primer และสร้างสาย DNA ด้วย Taq polymerase



รูปที่13 แสดงหลักการเพิ่ม DNA สายคู่อย่างจำเพาะ โดยวิธี Polymerase Chain reaction (60)



รูปที่14 แสดงหลักการของอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนของการทำงาน(ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง

61)

ในการศึกษาครั้งนี้ PCR buffer ที่ใช้ได้แก่ Eppendorf^(R) MasterMIX (2.5X) ซึ่งมีส่วนประกอบของ Taq DNA polymerase (62.5 U/ml), 125mM KCL, Tris-HCl pH 8.3, 3.75 mM Mg(Oac)₂ 0.25% Igepal^(R) -CA630, และ 500 µl ของแต่ละ dNTP

Primer

Primer name	ลำดับเบส	ตำแหน่ง	ความยาว	Tm (°C)
Xi 1	5' AGCTTGTTTTGCTCGCAGC 3'	(1287-1305)	18	58
Ci1	5' TTCCGGAGACTCTAAGGCC 3'	(2020-2038)	19	60

ตารางที่3 แสดงชื่อ ตำแหน่ง ลำดับเบส ความยาวและ Tm° ของ Primer

PCR reaction

สารละลาย	ปริมาณ	หน่วย
Eppendorf MasterMix	10	µl
Distilled water	12	µl
Primer Xi1	0.5	µl
Primer Ci1	0.5	µl
DNA Template	2	µl
Total	25	µl

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสตับอักเสบ บี X gene

PCR cycle

PCR cycle	Temp (C)	Time (min)
Denaturation	94	1.5
Annealing	54	1.5
Extension	72	1.5
	1 Cycle	
Denaturation	94	1
Annealing	54	0.30
Extension	72.	1
	35 Cycles	
Post-extension	72.	10

ตารางที่ 5 แสดงเวลาและอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสตับอักเสบบี X gene และ Precore gene

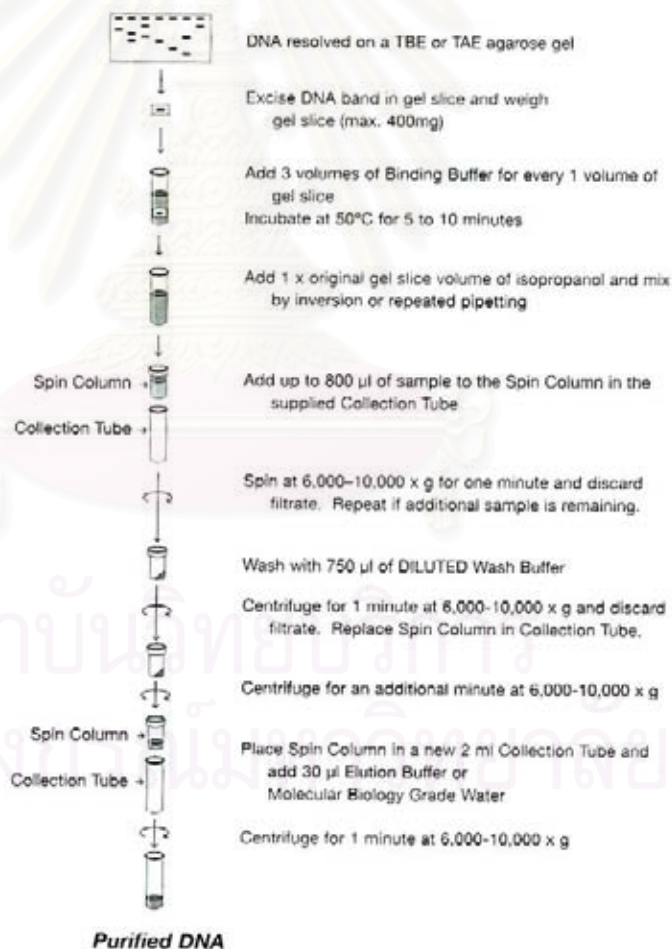
3. ตรวจสอบ PCR โดยการทำให้ gel electrophoresis

ด้วยการนำ PCR product 10 μ l ผสมกับสี bromophenol blue และ 2 % sucrose ไปทำ submarine gel electrophoresis ใน 1.5% agarose gel และต้องใส่ DNA ladder marker ชนิด 100 bp จากนั้นนำ gel ที่ทำ electrophoresis เสร็จแล้วไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 15 นาที แล้วนำมาเข้าเครื่องฉายรังสี UV (Gel Doc™) เพื่อตรวจสอบผลที่ได้ต่อไป

4. แยก PCR product จากการทำให้ gel electrophoresis โดยใช้ Perfectprep^(R) Gel Cleanup Eppendorf ทำ purify DNA ดังขั้นตอนที่อธิบายไว้ในคู่มือการใช้งานดังรูปที่ 15.

Perfectprep Gel Cleanup

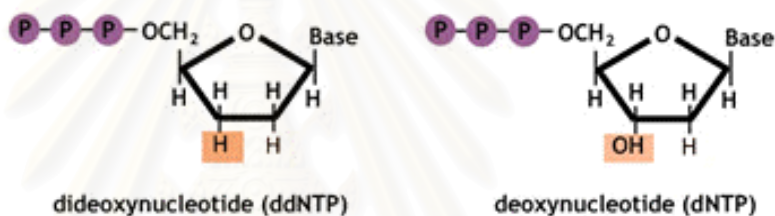
Perfectprep Gel Cleanup procedure



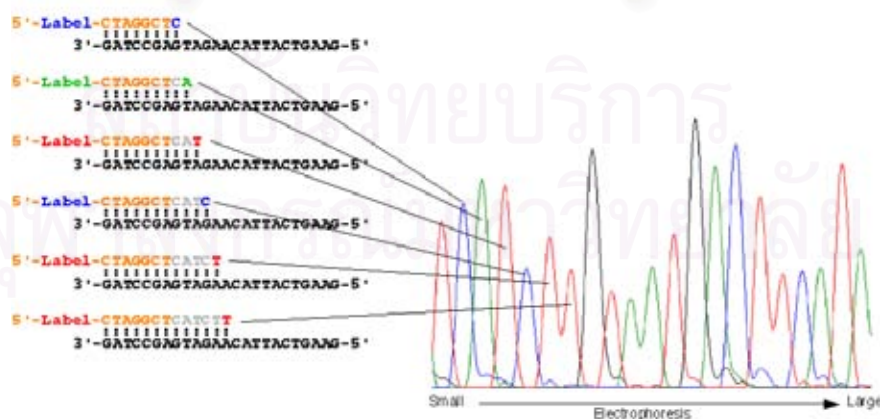
รูปที่ 15 แสดงขั้นตอนในการแยกสายดีเอ็นเอออกจาก Agarose gel (62)

5 ตรวจสอบการกลายพันธุ์ (mutation) ของดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยการทำ DNA sequencing

หลักการในการทำ DNA sequencing คล้ายคลึงกับการทำ PCR แต่ DNA sequencing จะมี ddNTP (dideoxynucleotide) ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescent 4 สี ตามชนิดของ ddNTP (dideoxynucleotide) ผสมไปกับ dNTP (deoxynucleotide) ที่ใช้ เนื่องจากการสาย DNA ต้องอาศัยการสร้างพันธะ phosphodiester ระหว่าง phosphate group ด้าน 5' และ hydroxy group ทางด้าน 3' ถ้าด้าน 3' ขาด hydroxy group การสร้างสาย DNA จะไม่สามารถดำเนินต่อไปได้ ดังนั้นเมื่อเอนไซม์ polymerase นำ ddNTP (dideoxynucleotide) มาใช้จะทำให้สาย DNA เส้นไม่สามารถสร้างต่อไปได้ เกิดเป็นเส้น DNA ขนาดแตกต่างกันที่มี fluorescent 4 สี ต่างกัน เมื่อนำสาย DNA มาเรียงกันตามความยาวก็จะสามารถอ่านชนิดของ nucleotide ตามลำดับได้ (63)



รูปที่ 16 รูปภาพแสดงความแตกต่างระหว่าง deoxynucleotide (dNTP) และ dideoxynucleotide (ddNTP) (64)



รูปที่ 17 รูปภาพแสดงหลักการการอ่าน DNA sequencing ตามความยาวของสาย DNA (65)

DNA sequencing ในการศึกษานี้ใช้ BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, USA) fluorescent ที่ติดอยู่กับชิ้นส่วน DNA จะถูกอ่านด้วยเครื่อง ABIPRISM™ 3100 Genetic Analyser (Perkin Elmer Cetus Branchburg, New Jersey) สัญญาณที่ได้จะถูกส่งเข้าคอมพิวเตอร์และรวบรวมข้อมูลโดย ABI's Data Collection Software จากนั้นแปรข้อมูลโดย ABI's Analysis software.

การเก็บรวบรวมข้อมูล

รวบรวมข้อมูลทั่วไปที่เกี่ยวข้อง เช่น อายุ เพศ ประวัติเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ DNA sequencing ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานไว้ใน GenBank จาก www.ncbi.nlm.nih.gov โดยใช้โปรแกรม BLAST และแก้ไขนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งที่มีอาจปัญหาด้วยโปรแกรม Chromas

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ใน GenBank อีกครั้งเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของ X gene และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Clustal X Version 1.8 จากนั้นจัดรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Bio edit version 5.0.9

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม Statistical Program for Social Science หรือ SPSS (spss11for window) โดย ตัวแปร Continuous variable ใช้ Mann-Whiney U test ตัวแปร ที่มีการกระจายตัวแบบไม่ได้สัดส่วนใช้ Chi-square X^2 test ด้วย Yates' correction และ Fishwer's exact test การคำนวณหาความเกี่ยวข้องระหว่าง factors ต่างๆกับการเกิดโรคมะเร็งตับใช้ Odd ratio ค่าความน่าเชื่อถือ (P value) ใช้ที่มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

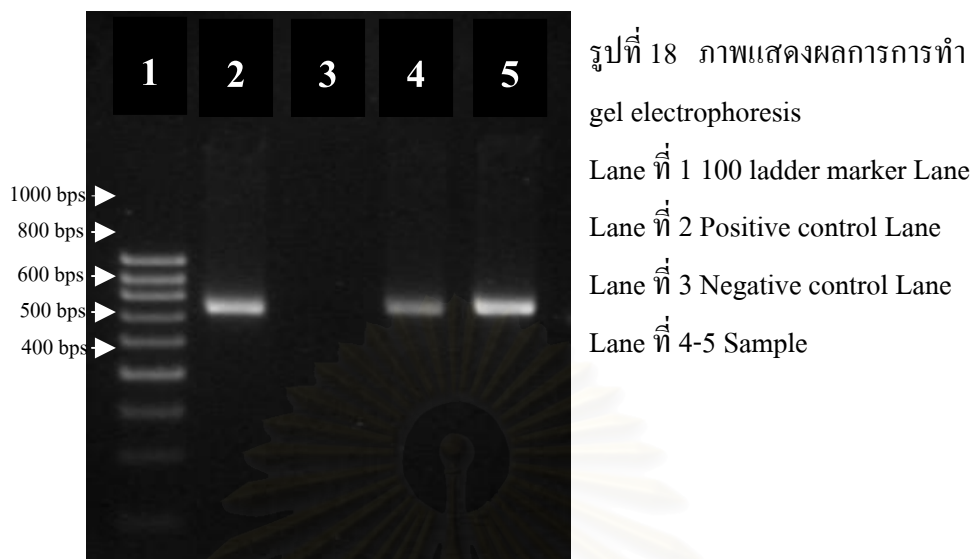
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ประชากรทั้งหมด 100 คน แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับ 50 คน และกลุ่มควบคุม 50 คน กลุ่มควบคุมนั้นได้มาจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อตับอักเสบบีกลุ่มอื่นๆ ที่ไม่เป็นมะเร็งระดับ และมีเพศเดียวกับกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับ และมีอายุใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เพื่อตัดปัจจัย เช่น เพศ หรือระยะเวลาในการติดเชื้อ ที่อาจรบกวนการวิเคราะห์ข้อมูลได้ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับ และกลุ่มควบคุม กลุ่มละ 50 คน แบ่งเป็นเพศชาย 44 คน เพศหญิง 6 คน ค่า Mean ของอายุของผู้ป่วยมะเร็งระดับเท่ากับ 54.20 ปี ค่า Median เท่ากับ 54.50 ปี (มีช่วงอายุตั้งแต่ 34 ถึง 81) ค่า Mean ของอายุของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 50.92 ปี ค่า Median เท่ากับ 50.50 ปี (มีช่วงอายุตั้งแต่ 37 ถึง 82) เพศและอายุของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับและกลุ่มควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน

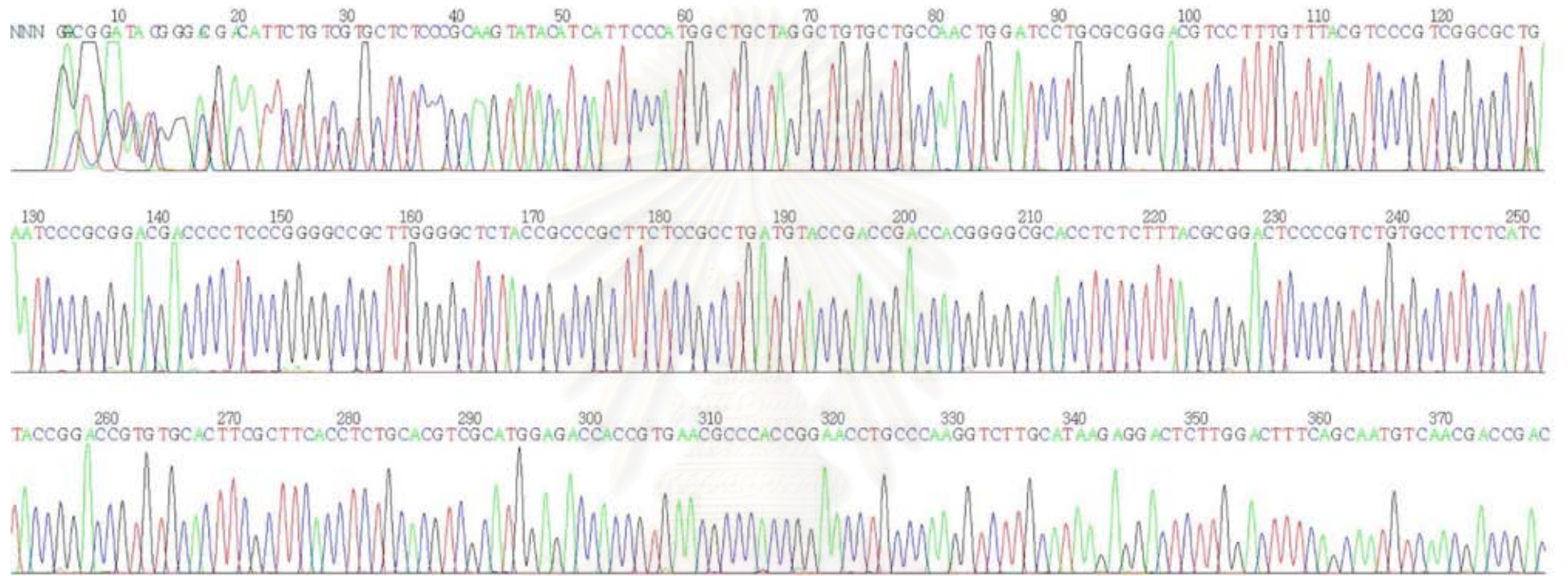
การตรวจพบ HBeAg ก็ใกล้เคียงกันในทั้ง 2 กลุ่ม โดยพบว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับมี HBeAg positive 16 คน และมี HBeAg negative 34 คน กลุ่มควบคุมมี HBeAg positive 18 คน และมี HBeAg negative 32 คน เมื่อเปรียบเทียบ HBeAg ในแต่ละช่วงอายุพบว่า การพบ HBeAg negative นั้นจะพบเพิ่มขึ้นตามอายุ พบว่าในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับพบ HBeAg negative 14 คน (60.9%) จาก 23 คน กลุ่มควบคุมพบ HBeAg negative 11 คน (44.0%) จาก 25 คน ในกลุ่มที่มีอายุ มากกว่า 50 ปี กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับพบ HBeAg negative 20 คน (74.1%) จาก 27 คน กลุ่มควบคุมพบ HBeAg negative 21 คน (84.4%) จาก 25 คน

ผลของการเพิ่มจำนวนสาย DNA โดยวิธี PCR ด้วย Primer Xi1 (1287-1305) และ Ci1 (2020-2038) ที่ครอบคลุมตั้งแต่ ATG ของ X ORF จนถึงบริเวณ precore gene ทำให้ได้ PCR Product ประมาณ 751 bps ดังรูปที่ 18



นำ PCR Product ที่ผ่านการแยกออกจาก agarose gel ไปทำ DNA sequencing โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้ได้ผล chromatogram ดังรูปที่ 19.

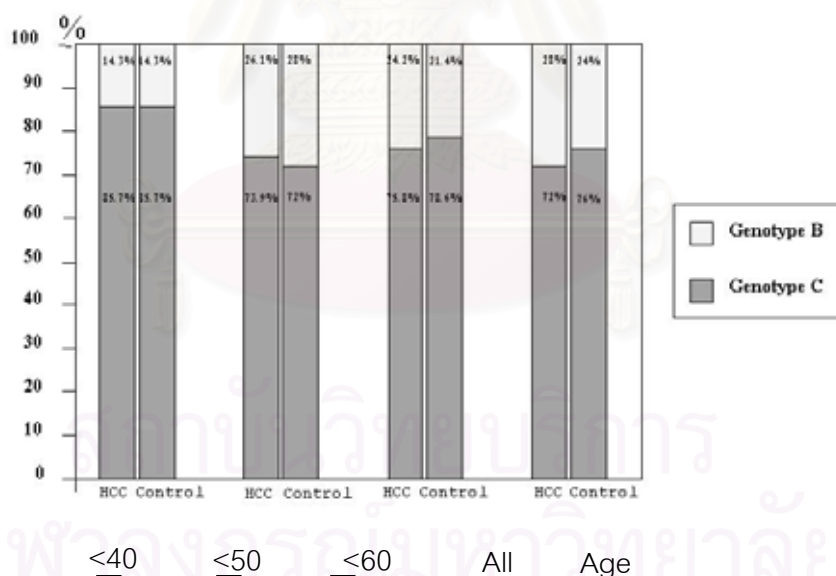
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 แสดงภาพตัวอย่างผล chromatogram ของการทำ DNA sequence

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาแล้ว นำมาทำ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Clustal X พบว่า genotype ที่พบในการศึกษาครั้งนี้เป็น genotype B และ C โดยมีผู้ป่วยมะเร็งระดับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B จำนวน 14 คน (28%) ส่วนอีกคน 36 (72%) ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C (รูปที่20) ส่วนกลุ่มควบคุมมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B 12 คน (24%) และ 38 คน (76%) ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C (รูปที่21) กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับและกลุ่มควบคุมมีภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่ละ genotype ไม่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบ genotype ในแต่ละช่วงอายุพบว่า การพบ genotype B นั้นจะเพิ่มขึ้นตามอายุของผู้ป่วย พบว่าในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับพบ genotype B 1 คน (14.3%) กลุ่มควบคุมพบ genotype B 1 คน (14.3%) ในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับพบ genotype B 6 คน (26.1%) กลุ่มควบคุม genotype B 7 คน (28%) ในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับพบ genotype B 8 คน (24.2%) กลุ่มควบคุมพบ genotype B 9 คน (21.4%) และในกลุ่มประชากรทั้งหมด กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับพบ genotype B 14 คน (28%) genotype C 36 คน (72%) จาก 17 คน กลุ่มควบคุมพบ genotype B 12 คน (24%) (รูปที่22)



รูปที่ 20 แสดงอัตราส่วนของ genotype B และ C ในแต่ละช่วงอายุ เปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับและกลุ่มควบคุม

	Case	Control	<i>P Value</i>
Number of	50	50	
Sex M:F	44 : 6	44 : 6	
Age mean	54.20	50.98	0.152
Age medain	54.50	50.50	0.196
Genotype			
Genotype B	14 (28%)	12 (24%)	
Genotype C	36 (72%)	38 (76%)	0.820
HBeAg Status			
Negative	34 (68%)	32 (64%)	
Positive	16 (32%)	18 (36%)	0.833

ตารางที่ 6 แสดงจำนวน เพศ อายุ HBeAg และ genotype ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ และกลุ่มควบคุม

และเมื่อเปรียบเทียบ HBeAg ของแต่ละ genotype พบว่า กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B มี HBeAg positive 4 คน และ HBeAg negative 10 คน ส่วนกลุ่ม ผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C มี HBeAg positive 12 คน และ HBeAg negative 24 คน ส่วนกลุ่มควบคุม พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B มี HBeAg positive 3 คน และ HBeAg negative 9 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C มี HBeAg positive 15 คน และมี HBeAg negative 23 คน

การกลายพันธุ์บริเวณ precore gene

การกลายพันธุ์ที่ hot spot precore stop codon 28 G1896A ในการศึกษาครั้งนี้พบการกลายพันธุ์นี้ในผู้ป่วยมะเร็งตับมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ พบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A ในผู้ป่วยมะเร็งตับ 24 คน (48%) ในกลุ่มควบคุม 18 คน (36%) ($P=0.311$) และไม่ว่าจะเปรียบเทียบระหว่างอายุ หรือ genotype ก็ไม่พบการกลายพันธุ์นี้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด เช่นในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่า หรือ เท่ากับ 50 ปี พบว่าผู้ป่วยมะเร็งตับมีการกลายพันธุ์ที่ hot spot precore stop codon 28 จำนวน 8 คนจาก 23 คน (34.8%) ส่วนกลุ่มควบคุมพบการกลายพันธุ์นี้ 6 คนจาก 25 คน (24%) ($P=0.615$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง genotype พบผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B มีการกลายพันธุ์ที่ นิวคลีโอไทด์ G1896A นี้ 9 คนจาก 14 คน (64%) และ 10 จาก 12 คน (83.8%) ($P=0.391$) ตามลำดับ ส่วน genotype C มีการ

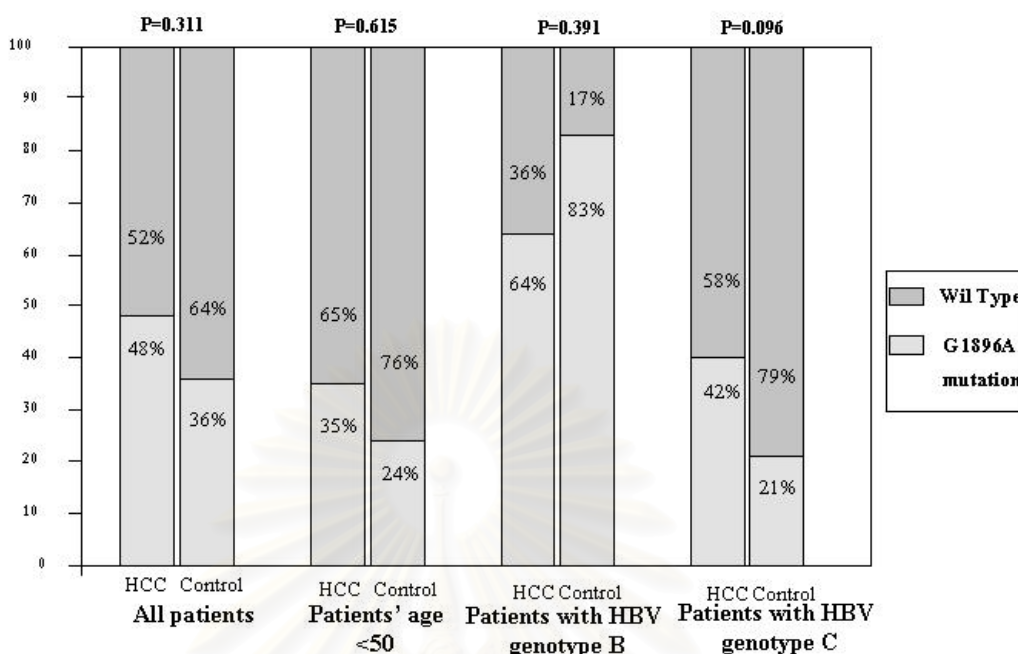
กลายพันธุ์ นี้ในผู้ป่วยมะเร็งตับ 15 คนจาก 34 คน (41.7 %) คนและ 9 คน จาก 38 คนของกลุ่มควบคุม (21.1%) ($P=0.096$) ตามลำดับ

โดยปกติแล้วการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A จะพบได้ก็เมื่อนิวคลีโอไทด์ 1858 เป็น T (genotype B, C และ D) เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่งจะต้องจับกันเพื่อสร้าง stem loop ของ pregenomic RNA การกลายพันธุ์จาก G ไปเป็นจะทำให้ความเสถียรของ pregenomic RNA เพิ่มขึ้น แต่ถ้านิวคลีโอไทด์ 1858 เป็น C (genotype A) แล้ว การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้จะทำลาย stem loop ของ pregenomic RNA ดังนั้น การกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A จึงไม่ค่อยพบใน genotype A ในการศึกษาครั้งนี้ นิวคลีโอไทด์ 1858 เป็น T เป็นส่วนใหญ่ โดยกลุ่มควบคุมเป็น T ทั้งหมด แต่กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B มี 3 คนที่นิวคลีโอไทด์ 1858 เป็น C 2 คนในนี้ไม่มีการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A แต่มี 1 คนที่ นิวคลีโอไทด์ G1897 เปลี่ยนเป็น A เกิดเป็น stop codon TGA ที่ codon 28

การกลายพันธุ์ที่พบอย่างมีนัยสำคัญอีกตำแหน่งที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่การกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง 1899 เปลี่ยนจาก G ไปเป็น A ซึ่งมีผลให้เปลี่ยน Gly ที่ codon 29 ของ precore pretein เป็น Asp พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ ในผู้ป่วยมะเร็งตับ 20 คน (40.0%) ในกลุ่มควบคุม 7 คน (14%) ($P=0.007$ OR4.095 95%CI 1.539-10.900)

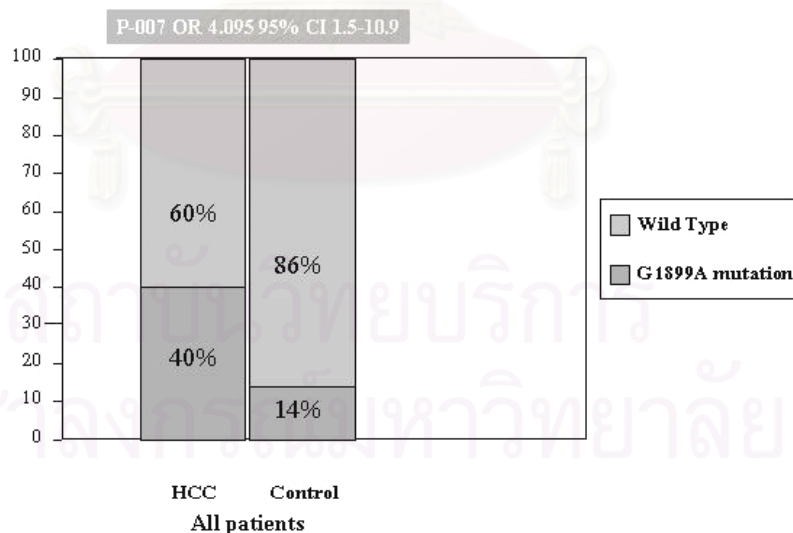
Mutation	Case	Control	<i>P Value</i>	OR.(95% CI)
G1896A (n=50)	24 (48%)	18 (36%)	0.311	1.641 (0.737-6.355)
G1896A Age ≤ 50 yrs (Case n=23, Control n=25)	18 (34.8%)	6 (24%)	0.615	1.689(0.481-5.933)
G1896A Genotype B (Case n=14, Control n=12)	9 (64.3%)	10 (83.3%)	0.391	0.360(0.055-2.338)
G1896A Genotype C (Case n=36, Control n=38)	15 (41.7%)	8 (21.1%)	0.096	2.679(0.963-7.453)
T1858	47 (94%)	50 (100%)	-	-
C1858	3 (6%)			
G1899A (n=50)	20 (40%)	7 (14%)	0.0007	4.095(1.539-10.900)

ตารางที่ 7 แสดงอัตราส่วนการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์G1896A ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม



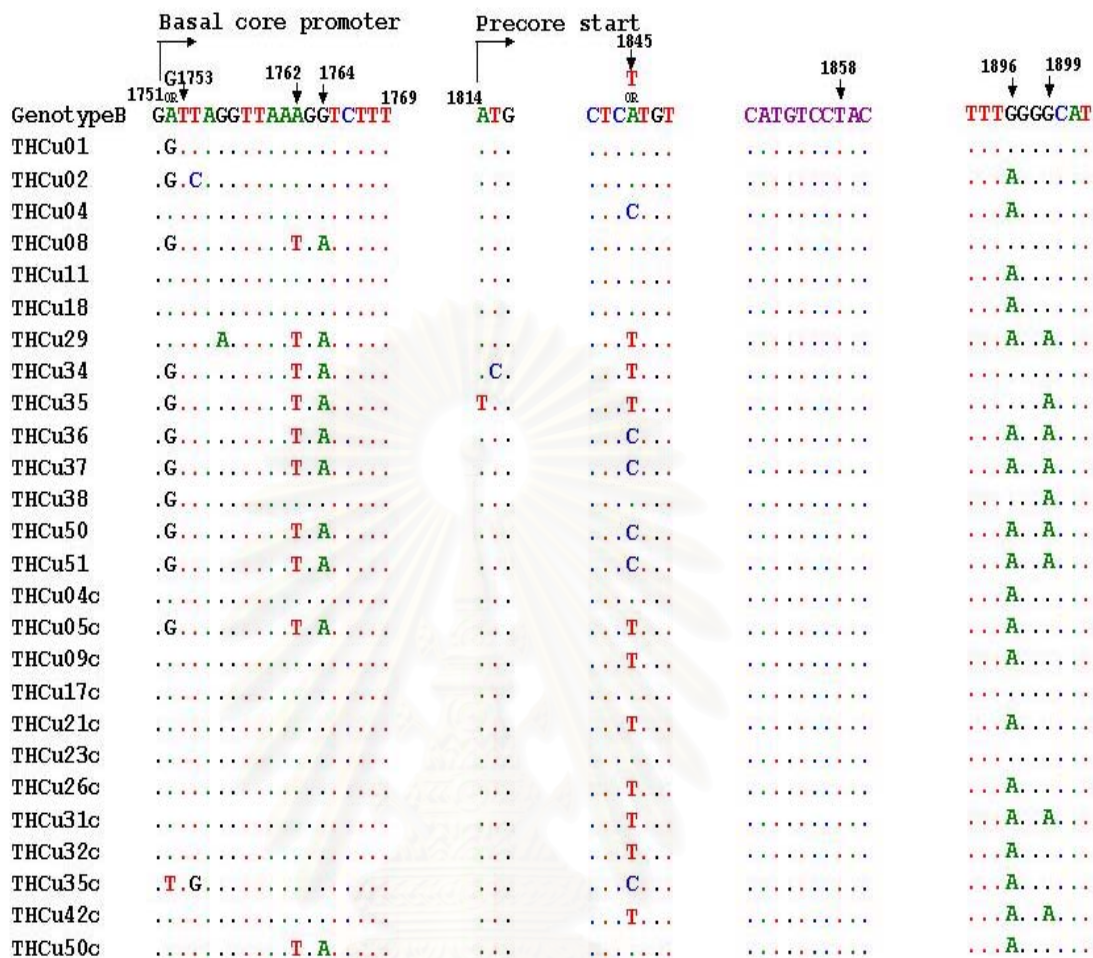
The prevalence of G1896A mutation in patients with HCC and control patients

รูปที่ 23 แผนภูมิแสดงอัตราส่วนการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ และกลุ่มควบคุม

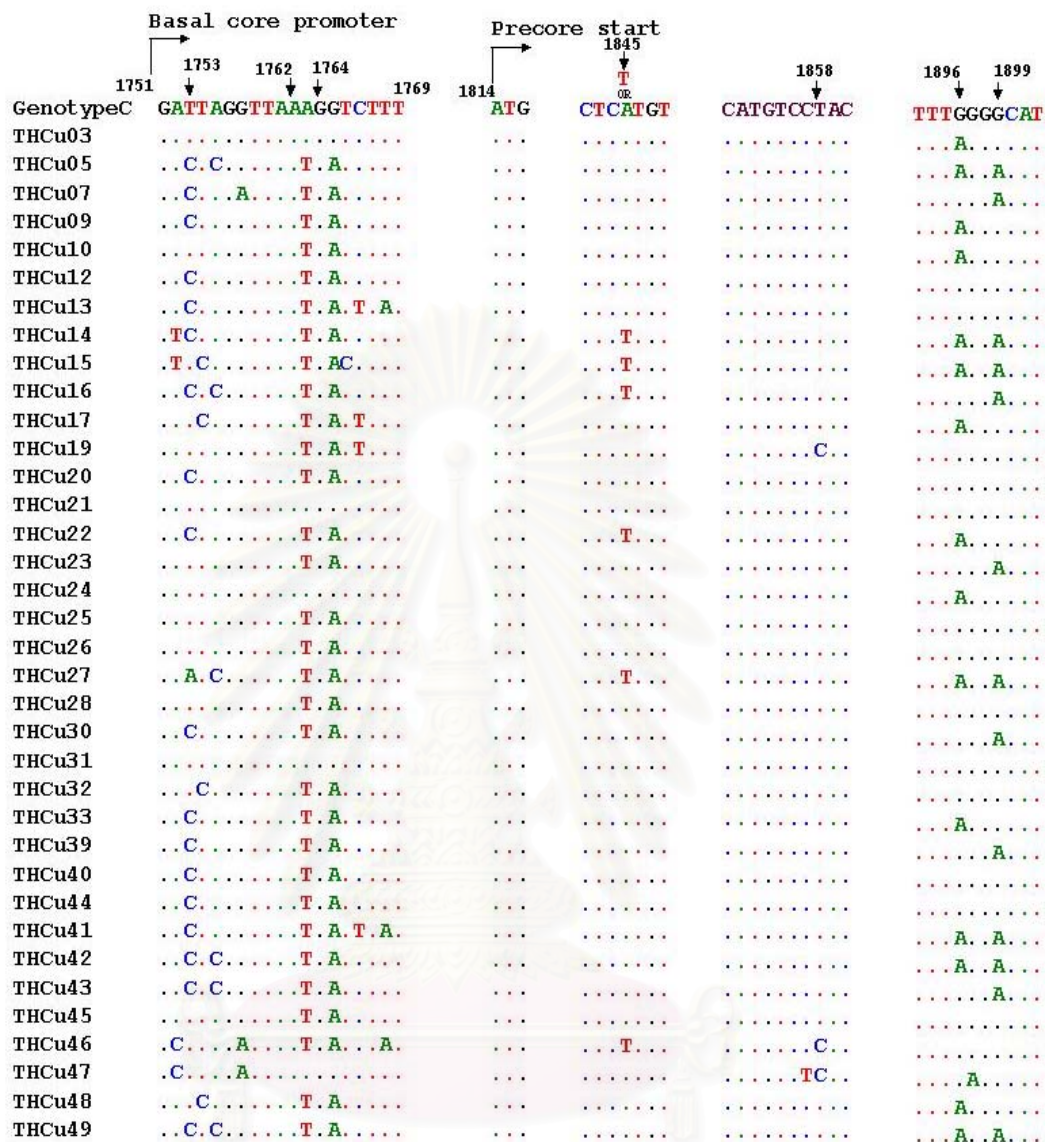


The prevalence of G1899A mutation in patients with HCC and control patients

รูปที่ 24 แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่างการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1899A ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม



รูปที่ 25 แสดง nucleotide sequence alignment ของ Basal core promoter (นิวคลีโอไทด์ 1751-1769) และ บางส่วนของ precore ได้แก่บริเวณ ATG นิวคลีโอไทด์ 1848, 1858, 1896, และ 1899 ของ genotype B



รูปที่ 26 แสดง nucleotide sequence alignment ของ Basal core promoter (นิวคลีโอไทด์ 1751-1769) และ บางส่วนของ precore ได้แก่บริเวณ ATG นิวคลีโอไทด์ 1848, 1858, 1896, และ 1899 ของ genotype C ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ

	Basal core promoter	Precore start				
	1751	1762 1764	1769 1814	1845	1858	1896 1899
Genotype C	GATTAGGTTAAAGGTCCTT		ATG	CTC A TGT	CATGTCCTAC	TTTGGGGCAT
THCu01c
THCu02c	..C.C.....T.A.....	
THCu03c	..C.....T.A.....	
THCu06cT.A.....	A.....
THCu07c	..C.C.....T.A...A.....	
THCu08c	..C.....T.A.....	
THCu10c	..C.....T.A.....	A.....
THCu11c	..C...A...T.A.T.A.....	T...A.....
THCu12c	T.C.C.....T.A.T.A.....	
THCu13c	..CC.....T.A.....	
THCu14cT.A.....	
THCu15c	..C.....T.A.....	T...
THCu16c	..C.....T.A.....	T...A.....
THCu18cT.A.....	
THCu19cT.A.....	T...A.A.....
THCu20c	..C.C.....T.A.....	
THCu22cT.A.....	
THCu24c	..C.....	
THCu25c	..C.....T.A.....	
THCu27cT.A.....	
THCu28c	..C.....	
THCu29cT.A.....	
THCu30c	..C.....T.A.T.....	A.....
THCu33cT.A.....	
THCu34cT.A.....	T...A.....
THCu36c	..C.....	
THCu37cT.A.....	
THCu38c	..C.....T.A.....	
THCu39c	..C.C.....T.A.....	
THCu40c
THCu41c	..C.....T.A.....	
THCu43c	..C.....T.A.....	T...A.....
THCu44c	..C.....TCA.....	T...A.A.....
THCu45c	..C.....T.A.T.A.....	T.....A.A.....
THCu46cT.A.....	
THCu47c
THCu48cT...A.....
THCu49c

รูปที่ 27 แสดง nucleotide sequence alignment ของ Basal core promoter (นิวคลีโอไทด์ 1751-1769) และ บางส่วนของ precore ได้แก่บริเวณ ATG - นิวคลีโอไทด์ 1848, 1858, 1896, และ 1899 ของ genotype C ของกลุ่มควบคุม

การกลายพันธุ์บริเวณ precore gene

ในการศึกษาครั้งนี้ พบการกลายพันธุ์ที่บริเวณ hot spot core promoter A1762T และ G1764A ในผู้ป่วยมะเร็งตับมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบการกลายพันธุ์ที่ basic core promoter นี้ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ 40 คน (80%) และในกลุ่มควบคุม 32 คน (64%) ($P=0.119$)

แต่เมื่อเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ที่ทำให้ HBx protein codon 130 เปลี่ยนจาก lysine เป็น Methionine และ codon 131 เปลี่ยนจาก Valine เป็น Isoluesine นี้ ในผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุมที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี พบว่าผู้ป่วยมะเร็งตับมีการกลายพันธุ์มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบการกลายพันธุ์นี้ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ 19 คนจาก 23 คน (82.6%) ส่วนกลุ่มควบคุมมีการกลายพันธุ์ 12 คนจาก 25 คน (48%) ($P=0.028$ OR = 5.146 95% CI 1.357-19.524)

และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง genotype พบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1764A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน genotype B โดยพบการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ 8 คนจาก 14 คน (57.1%) และ 2 คน จาก 12 คน (16.7%) ในกลุ่มควบคุมตามลำดับ ($P=0.050$ OR6.667 95%CI 1.047-42.431) ส่วนเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ก็พบการกลายพันธุ์นี้ในผู้ป่วยมะเร็งตับมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด โดยพบการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่ hot spot core promoter 32 คนจาก 36 คน (88.9%) และ 31 คน จาก 38 คน (81.6%) ($P=0.579$) ตามลำดับ

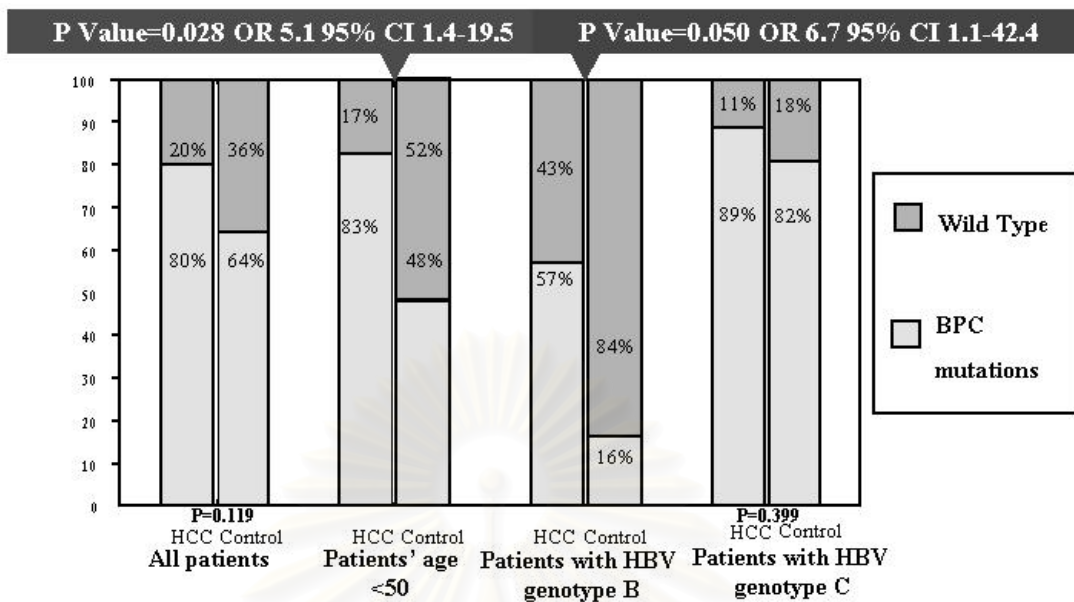
เมื่อพิจารณา 2 ข้อมูลเข้าด้วยกัน พบว่าผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B และที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี พบการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่ hot spot core promoter อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ 4 คนจาก 6 คน (66.7%) และ ไม่พบในกลุ่มควบคุมเลย ($P=0.021$ OR4.500 95%CI 1.326-15.277)

การกลายพันธุ์อีกตำแหน่งหนึ่งใน core promoter ที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งตับและผู้ป่วยที่เป็นตับอักเสบบีเรื้อรัง เช่น filminant hepatitis และมะเร็งตับ ได้แก่การกลายพันธุ์ที่ nucleotide 1753 จาก T เปลี่ยนเป็น C หรือ A เป็นอีกการกลายพันธุ์ที่พบในการศึกษานี้ แต่ก็ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างไร

Mutations	Case	Control	<i>P Value</i>	OR.(95% CI)
A1762T/G1764A (n=50)	40 (80%)	32 (64%)	0.119	2.250 (0.913-5.545)
A1762T/G1764A Age < or 50 yrs (Case n=23, Control n=25)	19 (82.6%)	12 (48%)	0.028	5.146 (1.357-19.524)
A1762T/G1764A Genotype B (Case n=14, Control n=12)	8 (57.1%)	2 (16.7)	0.050	6.667 (1.047-42.431)
A1762T/G1764A Genotype C (Case n=26, Control n=38)	32 (88.9%)	30 (81.6%)	0.399	2.133 (0.582-7.824)
A1762T/G1764A Genotype B & Age < or 50 yrs (Case n=6, Control n=7)	4 (66.7%)	0 (0%)	0.021	4.500 (1.326-15.277)
T1753C/A (n=50)	19 (38%)	16 (32%)	1.000	1.092 (0.480-2.484)

ตารางที่ 8 แสดงอัตราส่วนการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1764A ของกลุ่ม ผู้ป่วย
มะเร็งตับและกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



The prevalence of basic core promoter mutation in patients with HCC and control patients

รูปที่ 28 แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่างการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T G1764A ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม

จากการที่การกลายพันธุ์นิวคลีโอไทด์ G1896A และ basic core promoter นี้ มีผลต่อ HBeAg status ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A และ A1762T และ G1764A นี้กับ HBeAg และพบว่าการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A ที่ทำให้เกิด stop codon ที่ codon 28 ซึ่งทำให้ไม่สามารถสร้าง precore protein ได้ส่งผลให้ไม่สามารถสร้าง HBeAg ได้ มีจำนวนการกลายพันธุ์ที่ต่ำกว่าจำนวนผู้ป่วยที่มี HBeAg negative แต่อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยที่มี HBeAg negative ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ที่ นิวคลีโอไทด์ G1896A จะพบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ T1762A และ G1764A (ตารางที่ 9) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ที่ start codon ATG เปลี่ยนไปเป็น ACT และ TTG อีกด้วย

และเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้พบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1764A อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T/G1764A กับ HBeAg พบว่าในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี มี HBeAg negative 11 (60.9%) คน พบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1764A 19 (82.6%) คน ในผู้ป่วยมะเร็งตับ ส่วนในกลุ่มควบคุมนั้นมี

HBeAg negative 11 (44%) คน มีการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A 6 (24 %) คน และพบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T/G1764A 12 (48%) คน

	Total	HBeAg Positive	HBeAg Negative	1896 Wild Type	G1896A Mutation	BCP Wild Type	BCP Mutations
Case	50	16 (32%)	34 (68%)	26 (52%)	24(48%)	10 (20%)	40 (80%)
Control	50	18 (36%)	32 (64%)	32 (64%)	18 (36%)	18 (36%)	32(64%)

ตารางที่ 9 แสดงอัตราส่วนการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A และ HBeAg ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม

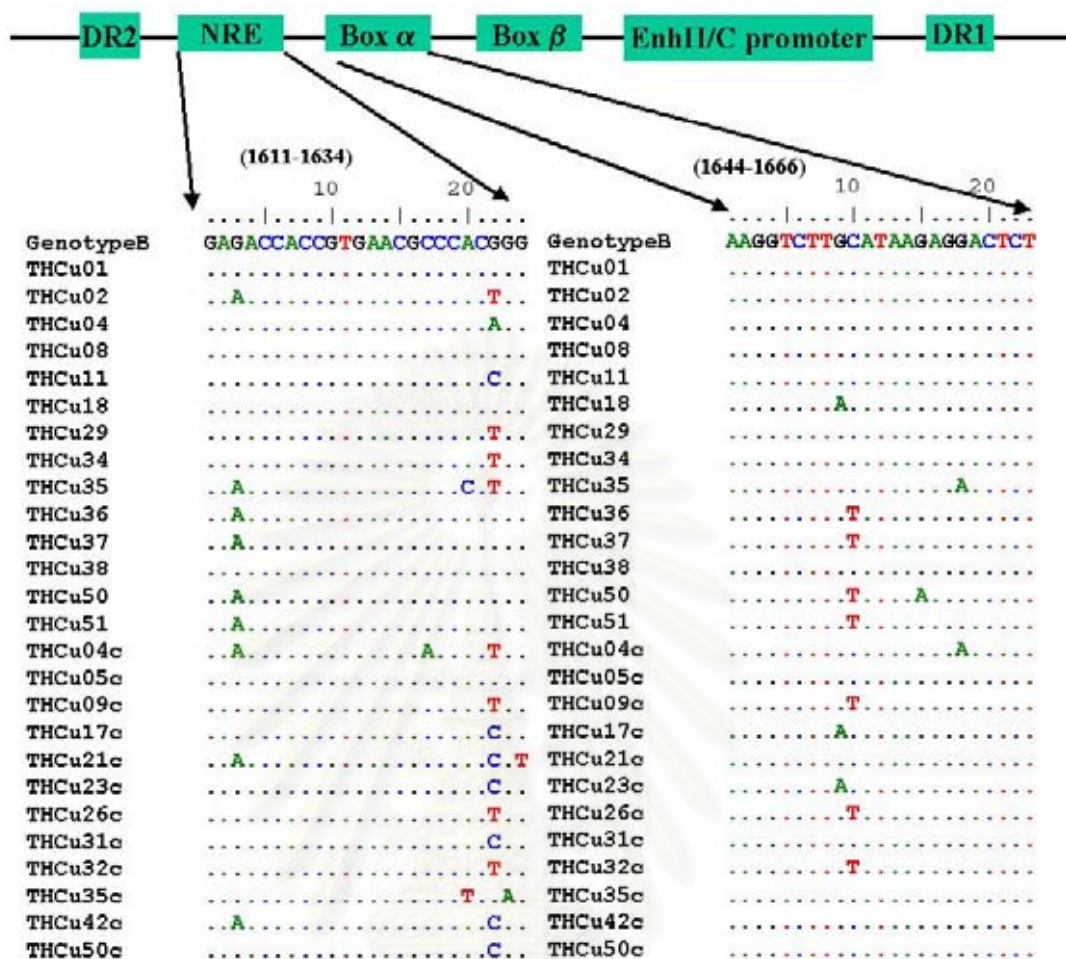
การกลายพันธุ์อื่นๆ ของ X gene ที่เคยถูกรายงานไว้พบได้น้อยในการศึกษาครั้งนี้ ยกตัวอย่างเช่น การกลายพันธุ์ที่ NRE ที่นิวคลีโอไทด์ T1753C/A พบ 19 คนจาก 51 คน (37%) หรือการกลายพันธุ์ที่ C1653T พบ 13 จาก 51 คน (25%) การกลายพันธุ์ที่ G1653A พบเพียง 16 คน (32%) และไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมแต่อย่างไร การกลายพันธุ์ตำแหน่งอื่นๆ พบได้บ้าง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างไร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

X gene mutation (n=50)	Case	Control	P value
C13T	4 (8%)	3 (6%)	1.000
C31T	2 (4%)	0	0.485
T/G/C88A	8 (16%)	16 (32%)	0.101
C/T118G	2 (4%)	0	0.485
T/G/Cnt124A WT : Mu	4 (8%)	0	0.117
Cnt131T WT : Mu	2(4%)	0	0.485
Tnt193C WT : Mu	4 (8%)	0	0.117
Gnt240A (G1613A)	16(32%)	18 (36%)	0.726
C256T	8(16%)	5(10%)	0.552
C/A/G259T	4 (8%)	4 (8%)	1.000
C280T (C1653T)	12 (24%)	9 (18%)	0.623
T426C	8 (16%)	3 (6%)	0.201

ตารางที่ 10 แสดงอัตราส่วนการกลายพันธุ์บริเวณอื่นๆของ X gene ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและ
กลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 แสดงการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ 1613 บริเวณ NRE และ นิวคลีโอไทด์ 1653 บริเวณ Box- α ของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม

DR2		NRE	Box α	Box β	EnhII/C promoter	DR1
(1611-1634)						
GenotypeC	GAGACCACCGTGAACGCCCGCCAG					
THCu03					
THCu05T.....					
THCu07					
THCu09T.....					
THCu10A.....					
THCu12					
THCu13					
THCu14	..A.....					
THCu15	..A.....					
THCu16T.....					
THCu17					
THCu19	..A.....					
THCu20A.....					
THCu21A.....					
THCu22	..A.....A.....					
THCu23					
THCu24	..A.....A..A.TG.					
THCu25					
THCu26					
THCu27	..A.....					
THCu28	..A.....					
THCu30T.....					
THCu31					
THCu32					
THCu33					
THCu39T.....					
THCu40					
THCu41					
THCu42T.....					
THCu43A.....T.A..					
THCu44	..A.....A.....					
THCu45	..A.....					
THCu46					
THCu47	..A.....					
THCu48A.....					
THCu49T.....					
GenotypeC	GAGACCACCGTGAACGCCCGCCAG					
THCu01c					
THCu02c					
THCu03c					
THCu06c	..A.....					
THCu07c					
THCu08c					
THCu10c	..A.....					
THCu11c					
THCu12c	..A.....T.....					
THCu13c					
THCu14c					
THCu15c	..A.....A.....					
THCu16c	..A.....					
THCu18c	..A.....					
THCu19c	..A..G.....T.....					
THCu20c					
THCu22c	..A.....					
THCu24c					
THCu25c	..A.....T.....					
THCu27c					
THCu28c					
THCu29c					
THCu30cT.T.....					
THCu33cA.....					
THCu34c	..A.....					
THCu36c					
THCu37cA.....					
THCu38c					
THCu39c					
THCu40c	..A.....T.....					
THCu41c					
THCu43c	..A.....					
THCu44c	..A.....A.....					
THCu45c					
THCu46c	..A.....					
THCu47c	..C.....					
THCu48cA..G.....					
THCu49c					

รูปที่ 30 แสดงการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ 1613 บริเวณ NRE ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DR2		NRE	Box α	Box β	EnhII/C promoter	DR1
(1644-1666)						
GenotypeC	AAGGTCCTTACATAAGAGGACTCT				GenotypeC	AAGGTCCTTACATAAGAGGACTCT
THCu03	THCu01c
THCu05	THCu02c
THCu07	THCu03c
THCu09	THCu06c
THCu10	THCu07c
THCu12	THCu08c
THCu13	THCu10c
THCu14	THCu11c
THCu15	THCu12c
THCu16	THCu13c
THCu17	THCu14c
THCu19	THCu15c
THCu20	THCu16c
THCu21	THCu18c
THCu22	THCu19c
THCu23	THCu20c
THCu24	THCu22c
THCu25	THCu24c
THCu26	THCu25c
THCu27	THCu27c
THCu28	THCu28c
THCu30	THCu29c
THCu31	THCu30c
THCu32	THCu33c
THCu33	THCu34c
THCu39	THCu36c
THCu40	THCu37c
THCu41	THCu38c
THCu42	THCu39c
THCu43	THCu40c
THCu44	THCu41c
THCu45	THCu43c
THCu46	THCu44c
THCu47	THCu45c
THCu48	THCu46c
THCu49	THCu47c
					THCu48c
					THCu49c

รูปที่ 31 แสดงการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ บริเวณ Box- α ของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ยังสามารถพบการกลายพันธุ์แบบอื่นๆ เช่น insertion mutation (Case02 5'TGCATAAGAGGACTCTTGGACTTT3' ที่นิวคลีโอไทด์ 1674 ซึ่งทำให้เกิด frameshift mutation เพิ่มขึ้นของ amino acid 8 ตัว (LHKRTLGL เริ่มที่ amino acid ที่ 100) ทำให้สร้าง HBx ขนาด 162 amino acid หรือ deletion mutation (Case01 2 bps deletion ที่นิวคลีโอไทด์ 1721-1722) ทำให้สร้าง HBx ขนาดสั้นลงเหลือเพียง 151 amino acid

GenotypeB	ATG	GGCTG	ATCCT	GTACC	TCATC	GGAGA	TTGCA	AGAGG
	13	31	131	193	240	280	285	288
THCu01
Case02T.A.
THCu04
THCu08
THCu11T.
THCu18A.	...
THCu29
THCu34
THCu35A.A
THCu36T.	..T.C.	..A.	..T.	...
THCu37T.C.	..A.	..T.	...
THCu38
THCu50T.	..T.C.	..A.	..T.	..A.
THCu51T.C.	..A.	..T.	...
THCu04CA.A
THCu05C
THCu09CT.	...
THCu17CA.
THCu21cA.
THCu23cT.A.
THCu26cT.	...
THCu31c
THCu32cT.	...
THCu35c
THCu42cA.
THCu50C

รูปที่ 32 แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ และกลุ่มควบคุมที่พบในการศึกษาครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GenotypeB	301	24 bps insertion	302	348	OR380	389	391	426	465
THCu01	T		C	GTGTT	GATTA	AAGGT	TGTGT	TAA	
THCu02					.G...				
THCu04					.G.C.				
THCu08					.G...	.T.A.	.C.		
THCu11							.C.		
THCu18									
THCu29						.T.A.		G..	
THCu34					.G...	.T.A.	.C.		
THCu35					.G...	.T.A.	.C.		
THCu36				.A..	.G...	.T.A.	.C.		
THCu37				.A..	.G...	.T.A.	.C.		
THCu38					.G...				
THCu50				.A..	.G...	.T.A.	.C.		
THCu51					.G...	.T.A.	.C.		
THCu04c							.C.		
THCu05c					.G...	.T.A.	.C.		
THCu09c									
THCu17c							.C.		
THCu21c									
THCu23c							.C.		
THCu26c									
THCu31c									
THCu32c									
THCu35c					.T.G.		.C.		
THCu42c									
THCu50c						.T.A.			

รูปที่ 33 แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene (ต่อ) เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B ของกลุ่มผู้ป่วย มะเร็งตับและกลุ่มควบคุมที่พบในการศึกษาครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GenotypeC	1	13	31	88	118	124	131
THCu03	ATG	GGCTG	ATCCT	CCGTC	CCCCT	CTGCCG	TGCCG
THCu05	T	...	T	...
THCu07	C	...	T	...
THCu09	C	G	T	...
THCu10	A	...
THCu12	A
THCu13	C
THCu14	A
THCu15	C	T	T	...
THCu16	T	...	T	...
THCu17	A	...	T	...
THCu19	T	...
THCu20	T	...
THCu21
THCu22	T	A
THCu23
THCu24	C	G	C	T
THCu25	T	A
THCu26	A	...	T	...
THCu27	T	...
THCu28	A
THCu30	A	...
THCu31	C
THCu32	T	...
THCu33	C	...	A	...
THCu39	C	...	A	...
THCu40	A
THCu41	C
THCu42	T	...	T	...
THCu43	T	...	T	...
THCu44	A	...	T	...
THCu45	A	...	A	...
THCu46	T	...
THCu47	T	...
THCu48	C	...	T	A
THCu49	T	...	T	...

รูปที่ 34 แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ ที่พบในการศึกษาครั้งนี้

GenotypeC	240	256	280	380	389	391	437	465
THCu03	GGAGA	CCCGC	TTACA	GATTA	AAGGT	AGCAC	TAA	
THCu05		T		C.C	T.A			
THCu07				C.	T.A			
THCu09		T		C.	T.A			
THCu10			T		T.A			
THCu12				C.	T.A			
THCu13			T	C.	T.A	T		
THCu14	A			TC.	T.A			
THCu15	A			T.C	T.AC			
THCu16		T		C.C	T.A			
THCu17				C.	T.A			
THCu19	A		T		T.A			
THCu20		A		C.	T.A			
THCu21		A						
THCu22	A		T	C.	T.A			
THCu23					T.A			
THCu24	A	A.A	G					
THCu25					T.A			
THCu26					T.A			
THCu27	A			A.C	T.A			
THCu28	A				T.A	C		
THCu30		T		C.	T.A	G.T		
THCu31								
THCu32				C.	T.A			
THCu33				C.	T.A			
THCu39		T		C.	T.A	G.T		
THCu40				C.	T.A			
THCu44			T	C.	T.A	AT		
THCu41		T		C.C	T.A			
THCu42			T	C.C	T.A			
THCu43	A	A		C.	T.A			
THCu45	A		T		T.A			
THCu46			T	C.	T.A			
THCu47	A		T	C.				
THCu48				C.	T.A			
THCu49		T		C.C	T.A			

รูปที่ 35 แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene (ต่อ) เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของกลุ่มผู้ป่วย
มะเร็งตับที่พบในการศึกษาครั้งนี้

GenotypeC	1	13	31	88	118	124	131
THCu01c	ATG	GGCTG	ATCCT	CCGTC	CCCCT	CTGCCG	TGCCG
THCu02c	T	...	T	...
THCu03c	A
THCu06c	T	...
THCu07c	A	...	T	...
THCu08c
THCu10c	T	...
THCu11c	T	...
THCu12c	A	...	T	...
THCu13c	C	...	T	...
THCu14c	A
THCu15c	T	...
THCu16c	T	...
THCu18c	C
THCu19c	C
THCu20c	...	G	...	C	A	T	...
THCu22c	...	T	...	C	A
THCu24c	T	...	C	...
THCu25c	...	G	...	A	...	T	...
THCu27c	A	...	T	...
THCu28c	A	...	T	...
THCu29c	A	...	T	A
THCu30c	A	...	T	...
THCu33c	A	...	T	...
THCu34c	T	...
THCu36c	...	T	...	C	A	T	...
THCu37c	T	A
THCu38c	A
THCu39c	T	...	T	...
THCu40c	A
THCu41c	A
THCu43c	C
THCu44c	A	...	T	...
THCu45c	T	...	C	...
THCu46c	A	...	T	...
THCu47c	A	...	T	...
THCu48c	C	G	C	GT
THCu49c	A	...	T	...

รูปที่ 36 แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของกลุ่มควบคุมที่พบในการศึกษาครั้งนี้

GenotypeC	240	256	280	380	389	391	437	465
	GGAGA	CCCCG	TTACA	GATTA	AAGGT		AGCAC	TAA
THCu01c
THCu02cC.C	.T.A.
THCu03cC.	.T.A.
THCu06c	...A.T.T.A.
THCu07cC.C	.T.A.
THCu08cC.	.T.A.
THCu10c	...A.C.	.T.A.
THCu11cC.	.T.A.
THCu12c	...A.	..T.	...T.	T.C.C	.T.A.
THCu13cCC.	.T.A.
THCu14cT.A.
THCu15c	...A.	...A.C.	.T.A.
THCu16c	...A.C.	.T.A.
THCu18c	...A.T.T.A.
THCu19c	...A.	..T.	...T.T.A.
THCu20cC.C	.T.A.
THCu22c	...A.T.A.
THCu24cC.
THCu25c	...A.	..T.	...T.	..C.	.T.A.
THCu27cT.A.
THCu28cC.
THCu29cT.A.
THCu30c	T.T.C.	.T.A.
THCu33cT.A.
THCu34c	...A.T.T.A.
THCu36cC.
THCu37cT.A.
THCu38cC.	.T.A.
THCu39cC.C	.T.A.
THCu40c	...A.	..T.
THCu41cC.	.T.A.
THCu43c	...A.C.	.T.A.
THCu44c	...A.	A.C.	.TCA.
THCu45cC.	.T.A.G.
THCu46c	...A.T.A.
THCu47c	..C.G.
THCu48cA.	..G.
THCu49c

รูปที่ 37 แสดงการกลายพันธุ์ที่ X gene (ต่อ) เชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ของกลุ่มควบคุมที่พบในการศึกษาครั้งนี้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาความชุกของการกลายพันธุ์บริเวณ X gene และ precore gene ของผู้ป่วยไทยเป็นมะเร็งตับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับที่ได้รับการจับคู่เพศและอายุกับผู้ป่วยแล้ว ด้วยวิธี PCR โดย primer ที่จำเพาะตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ 1287-2038 และ DNA sequencing พบว่า genotype B และ C เป็น genotype หลักที่พบในการศึกษานี้โดยพบจำนวนใกล้เคียงระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม การกลายพันธุ์ที่ basic core promoter/ X gene enhancerII ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง A1762T และ G1764A และ precore stop codon 28 mutation G1896A ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับมีมากกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี พบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง A1762T และ G1764A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ใน genotype B อย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย และพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้อย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยที่ติดเชื้อตับอักเสบบี genotype B ที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี อีกด้วย นอกจากการกลายพันธุ์ที่ 2 ตำแหน่งนี้แล้ว ยังพบการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง G1899A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย การกลายพันธุ์ที่ ตำแหน่งอื่นของ X gene พบน้อย แต่ก็ยังพบการกลายพันธุ์แบบ insertion และ deletion ในการศึกษานี้

อภิปรายผลการวิจัย

ไวรัสตับอักเสบบี เป็นเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง ซึ่งอาจมีการดำเนินของโรคต่อไปเป็นตับแข็ง และมะเร็งตับต่อไป ปัจจุบันมีประชากรทั่วโลกมากกว่า 300 ล้านคนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตเนื่องจากโรคตับแข็งและมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีไม่น้อยกว่า 1 ล้านคน (1)

การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1764A (Basic core promoter) เป็นสิ่งที่พบได้บ่อยในไวรัสตับอักเสบบี และมักพบการรายงานถึงการกลายพันธุ์นี้ในผู้ป่วยมะเร็งตับ จากผลการศึกษาครั้งนี้พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี ($P=0.028$ OR 5.146 95%CI 1.357-19.524) และพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B ($P=0.05$ OR 6.667 95%CI 1.047-42.431) แต่ไม่พบใน genotype C ($P=0.683$) คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Yuen MF และคณะ ที่พบว่า การกลายพันธุ์ที่ basic core

promoter นี้ เป็นเพียงปัจจัยเดียวที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับ จาก 3 ปัจจัยที่ทำการตรวจสอบได้แก่ genotype การกลายพันธุ์ที่ basic core promoter และการกลายพันธุ์ที่ precore stop codon และพบการกลายพันธุ์นี้อย่างมีนัยสำคัญใน genotype B แต่ไม่พบใน genotype C (50)

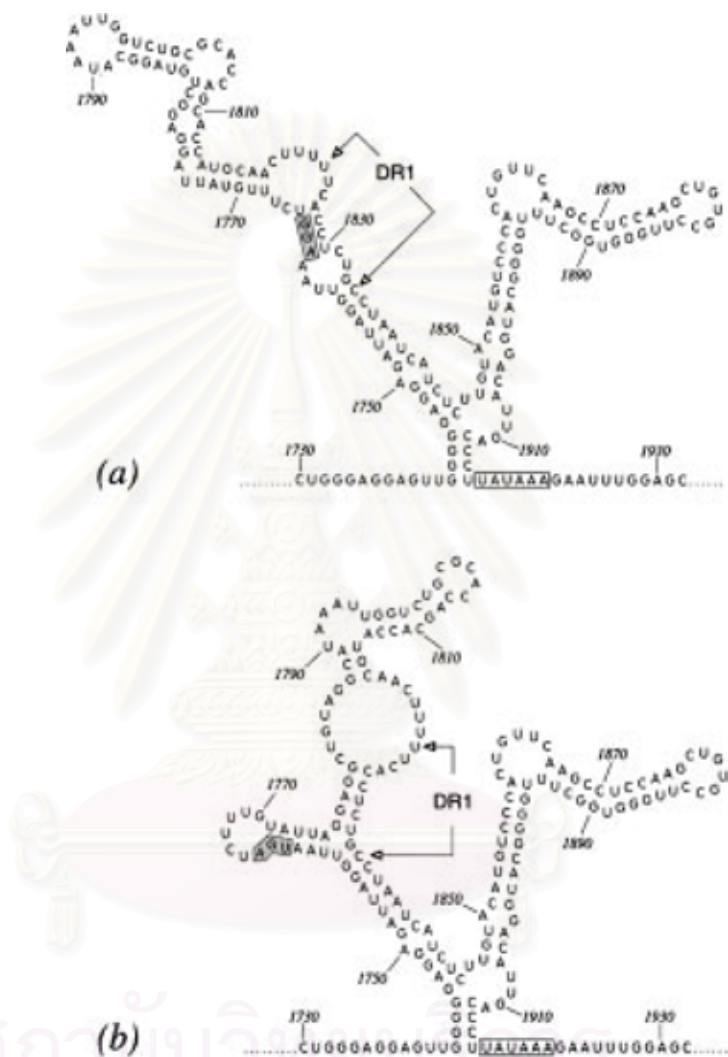
รายงานก่อนหน้านี้เสนอว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับมากกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A1762T และ G1764A มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับมากกว่า ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ไม่มีกลายพันธุ์ที่ ตำแหน่งนี้ แต่จากการที่มีรายงานว่า genotype ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการกลายพันธุ์ และไวรัสตับอักเสบบี genotype C ก็มีอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ที่ core promoter มากกว่า genotype B (41) เป็นไปได้ว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับนั้น คือ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1764A (basic core promoter) ไม่ใช่ genotype C

นอกจากนี้ Kao J.H และ คณะ (45) ยังพบว่าความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B และ genotype C จะสูงขึ้น ถ้ามีการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1764A นอกจากนี้ Kuang SY และคณะ ได้ ทำการศึกษาติดตามรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของผู้ป่วยเป็นเวลานานติดต่อกัน พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A1762T และ G1764A ที่พบได้ในผู้ป่วยที่ยังไม่พบอาการของมะเร็งตับสามารถใช้เป็น bio maker ในการทำนายการเกิดโรคมะเร็งตับได้ และมีความจำเพาะต่อการเกิดมะเร็งตับมากกว่า bio maker ที่พบหรือใช้ปัจจุบันเช่น alpha-feto protein, p16, p15 หรือ GSTP1 promoter เป็นต้น (66)

จากการศึกษาในประเทศไทยพบว่า ไวรัสตับอักเสบบี genotype C มีความรุนแรงมากกว่า genotype B และมักพบในผู้ป่วยมะเร็งตับตั้งแต่อายุยังน้อย ส่วนการพบ genotype B ในผู้ป่วยมะเร็งตับนั้นจะพบเพิ่มขึ้นตามอายุและมักไม่พบในผู้ป่วยที่มีอายุน้อย (40) ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A1762T และ G1764A อาจเป็นปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับให้แก่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B และมีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี

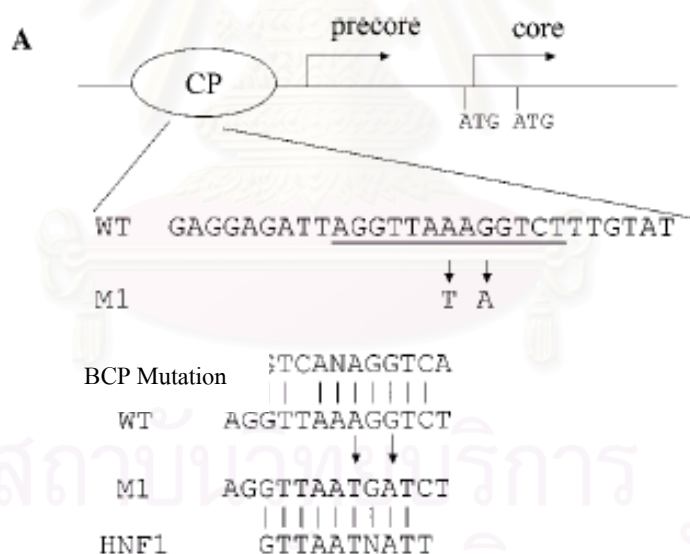
ถึงแม้ว่าการชักนำการเกิดมะเร็งตับ โดยการกลายพันธุ์ที่ basic core promoter ยังไม่แน่ชัด แต่ก็มีรายงานว่า การกลายพันธุ์ที่ basic core promoter สามารถเพิ่มจำนวนการ replication ของไวรัสได้ โดยมีอย่างน้อย 2 แนวคิดที่อธิบายความสามารถนี้ แนวคิดที่ 1. คือการกลายพันธุ์ที่ A1762T และ G1764A ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างระดับ secondary structure ของ pregenomic RNA ของไวรัส มีผลให้ stem loop บริเวณ DRI ของ pregenomic RNA เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีไว้ให้ primer ของ minus stand RNA มาจับในขั้นตอนสร้าง DNA เป็นอิสระมากขึ้น ลดการใช้พลังงานในการเคลื่อนไหวของโมเลกุล เพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์

สำหรับ primer ของ minus stand RNA มาจับให้มากขึ้น จาก (5'-UUC-3') เป็น (5'-UUCA-3') ส่งผลให้สามารถเพิ่มจำนวน viral replication ได้ (67)

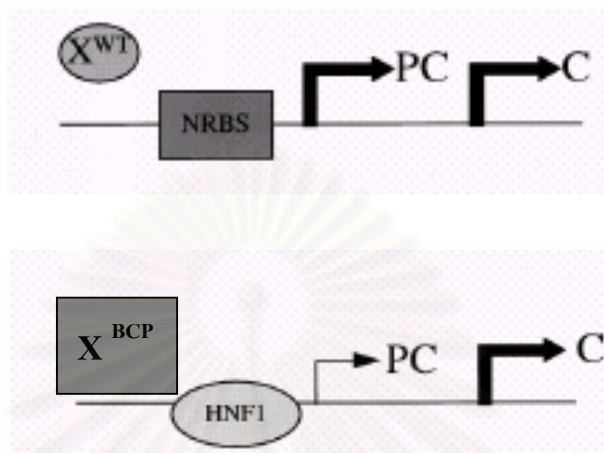


รูปที่ 38 แสดงโครงสร้างที่เปลี่ยนไปบริเวณ DRI ของ secondary structure ของ pregenomic RNA ของไวรัสตับอักเสบบีที่มีการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1764A (a.) Wild-type (b.) A1762T G1764A motation (67)

แนวคิด 2. คือการกลายพันธุ์ที่ A1762T และ G1764A ชักนำให้เกิดการสร้าง pregenomic RNA ของไวรัสมากขึ้น เพราะการกลายพันธุ์ที่ basic core promoter ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีลักษณะเป็น nuclear receptor binding site หายไป และเกิด hepatocyte nuclear factor I binding site ขึ้นมาแทนที่ Hepatocyte nuclear factor I (HNF-I) เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของ gene หลายชนิดในตับและทางเดินอาหาร การเกิด hepatocyte nuclear factor I binding site ที่ basic core promoter ทำให้มีการสร้าง core RNA มากขึ้น และเนื่องจาก core RNA นั้นนอกจากจะมีหน้าที่สร้าง core protein หรือ nucleocapsid protein แล้วยังสร้าง DNA polymerase และทำหน้าที่เป็น pre-genomic RNA อีกด้วย ดังนั้น core RNA ที่มากขึ้น ทำให้มีการสร้าง core protein, DNA polymerase, และ pre-genomic RNA มากขึ้น ส่งผลให้สามารถเพิ่มการ replication ของไวรัสได้ โดยการเพิ่ม RNA packaging แต่การกลายพันธุ์ที่ A1762T และ G1764A จะลดการสร้าง pre-core RNA และลด HBeAg ของไวรัสด้วย สันนิษฐานว่าเนื่องจากการ transcription ของ core RNA และ precore RNA ควบคุมโดย promoter ต่างชนิดกัน 2 promoter แต่ซ้อนทับกันอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกัน (68)



ที่ 39 แสดงการเกิด hepatocyte nuclear factor binding site จากการกลายพันธุ์ที่ core promoter และผลต่อการ replication (คัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง 68)



รูปที่ 40 การเกิด hepatocyte nuclear factor binding site จากการกลายพันธุ์ที่ core promoter จะส่งผลให้มีการ replication ขึ้น (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง 68)

การกลายพันธุ์ที่ basic core promoter ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ HBx ที่ตำแหน่ง K130M และ V131I การเปลี่ยนแปลงของ HBx นี้ยังส่งผลต่อ HNF I อีกด้วย โดยปกติแล้ว HBx wildtype ก็สามารเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ HNF I โดยการเพิ่มความสามารถในการจับกับ DNA ของ HNF I แต่เมื่อมีการกลายพันธุ์ของ HBx ที่ K130M และ V131I แล้วความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ HNF I จะเพิ่มขึ้น โดยพบว่าใช้ mutant HBx ในปริมาณที่น้อยกว่า HBx wildtype กลับทำให้ HNF I มีเพิ่มขึ้นมากกว่า HBx wildtype (69)

สำหรับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G1896A นั้น ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับและกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์นี้ใน genotype B (63.8% ในผู้ป่วย และ 83.8% ในกลุ่มควบคุม) มากกว่า genotype C (38.2% ในผู้ป่วย และ 20.5 %ในกลุ่มควบคุม) ตามที่มีรายงานก่อนหน้านี้ และมีแนวโน้มในการพบการกลายพันธุ์ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับมากกว่ากลุ่มควบคุม (47.1% ในผู้ป่วย ต่อ 35.3%ในกลุ่มควบคุม) แต่การที่กลุ่มควบคุมของการศึกษานี้มีทั้งกลุ่มตับแข็งและกลุ่มติดเชื้อเรื้อรัง ที่มีการรายงานถึงการพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G1896A อยู่บ่อยๆ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G1896A นี้ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับ และกลุ่มควบคุม (70,71) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยว่าการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ G1896A นั้นเป็นเพียง natural selection ระหว่างการเกิดมะเร็งตับอีกด้วย (20) อย่างไรก็ตามความสำคัญทางคลินิกกับ

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G1896A ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ เชื่อว่าการเกิดการกลายพันธุ์นี้ทำให้ความเสถียรระหว่างนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) 1896 กับ 1858 เสียไป ส่งผลกระทบต่อการสร้างไวรัส (viral replication) และความรุนแรงของโรคตับอักเสบ (72) นอกจากนี้มีรายงานการเกิด precore mutations ในผู้ป่วยที่มีตับอักเสบที่รุนแรง เช่นภาวะตับวายอย่างเฉียบพลัน (acute fulminant hepatitis) และตับอักเสบเรื้อรังที่รุนแรง (chronic active hepatitis) (72,73) หรือผู้ป่วยมะเร็งตับ โดยมีแนวคิดว่ากรณีที่ไม่มี HBeAg ซึ่งเชื่อว่าเป็น immune tolerogen ในเลือด อาจทำให้โรคตับมีความรุนแรงมากขึ้น อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ดังกล่าวนี้ยังพบได้ในกลุ่มที่มีการดำเนินของโรคไม่รุนแรง เช่นพบในผู้ป่วยที่เป็นพาหะหรือผู้ป่วยที่มีตับอักเสบไม่รุนแรง (mild hepatitis) (74,75,76) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลบ่งชี้ว่าโรคตับอักเสบเรื้อรังที่รุนแรงมักเกี่ยวข้องกับ การกลายพันธุ์ในหลายๆ ตำแหน่งร่วมกันเช่น precore mutations ร่วมกับ core mutations (77) ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่าง precore mutations และความรุนแรงของโรคตับจึงยังไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังที่มี precore mutations มักไม่ค่อยตอบสนองต่อการรักษาด้วย interferon และมีโอกาสเกิดการกำเริบ (relapse) ของโรคสูงภายหลังการหยุดการรักษาแล้ว (78,79)

การกลายพันธุ์ที่มักพบควบคู่ไปกับการกลายพันธุ์ G1896A คือการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 1899 เปลี่ยนจาก G ไปเป็น A ซึ่งมีผลให้เปลี่ยน Gly ที่ตำแหน่งโปรตีน (codon) ที่ 29 ของ precore protein เป็น Asp เป็นอีกหนึ่งการกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ ในการศึกษาครั้งนี้ จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง G1899A มีผลให้ pre-genomic RNA มีความเสถียรมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มการ replication ของไวรัสแต่อย่างใด (80,81) ความสามารถอื่นๆของการกลายพันธุ์นี้ก็ยังไม่ปรากฏผลแน่ชัด

สำหรับการกลายพันธุ์ของ X gene ที่พบน้อยมากในการศึกษานี้ อาจมาจาก 2 สาเหตุที่แตกต่างกันไปคือ สาเหตุที่ 1. คือ การศึกษาครั้งนี้เป็นการทำจาก serum ซึ่ง Tu H และ คณะ (82) ได้ทำการเพิ่มจำนวนไวรัสตับอักเสบบี X gene ใน serum ในชิ้นเนื้อตับที่ไม่เป็นมะเร็ง (nontumor tissue) และ ในชิ้นเนื้อตับที่เป็นมะเร็ง (tumor tissue) พบว่า DNA sequence ที่ได้จาก ชิ้นเนื้อตับที่ไม่เป็นมะเร็ง กับใน serum แยกไม่มีความแตกต่างหรือไม่แตกต่างกันเลย นอกจากนี้ยังไม่พบการ กลายพันธุ์แบบที่ต้องการจาก DNA sequence ที่ได้จากชิ้นเนื้อตับที่ไม่เป็นมะเร็ง กับใน serum เป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์ของ X gene นั้นน่าจะพบในชิ้นเนื้อตับที่เป็นมะเร็ง มากกว่า ใน serum หรือ สาเหตุที่ 2. ไวรัสตับอักเสบบี X gene มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นน้อย เพราะถึงจะมีรายงานการวิจัยที่รายงานถึงการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆของ X gene แต่ก็มียาการวิจัยจำนวนไม่น้อยที่พบแต่การกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1764A ใน X gene (83)หรือ ไม่พบการกลายพันธุ์ใน X gene (84)

เนื่องจาก core promoter นี้ซ้อนทับกับ Enhancer II ของ X gene ซึ่งจำเป็นต่อการ replication ของไวรัส การกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1794A จึงทำให้ amino acid ของ HBx ที่ codon K130M และ V131I เปลี่ยนไป ทำให้ secondary structure ของ HBx เปลี่ยนไปด้วย เนื่องจาก Lysine เป็น charged amino acid แต่ methionine นั้นเป็น hydrophobic amino acid (48) การเปลี่ยนไปนี้จะส่งผลต่อคุณสมบัติ transactivation อาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เพิ่มความเสี่ยงในเกิดมะเร็งตับ (hepatocarcinogenesis) ของไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้ region ที่เชื่อว่าจะสำคัญต่อกระบวนการ transcription activation ของ HBx ก็อยู่ที่ amino acid ที่ 50-70 และ amino acid ที่ 110-140 (85,86) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่บริเวณนี้จึงน่าจะส่งผลต่อคุณสมบัติ transcription activation ของ HBx ด้วย

โรคมะเร็งตับ (HCC) เป็นโรคที่ใช้เวลาก่อนโรครายานานมีขั้นตอนหลากหลายและยังมีปัจจัยเสี่ยง (environmental risk factor) อื่นๆที่ทั้งเป็นปัจจัยหลักและปัจจัยเสริมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการเกิดโรคมะเร็งตับเช่น Afla toxin B1 (AFB1) การสูบบุหรี่ การดื่มจัด หรือ โรคทางพันธุกรรม เช่น Hemochromatosis, Willson disease, Porphyrin(19) การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีจึงน่าจะเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่น่าจะช่วยเร่งการเกิดมะเร็งตับให้เกิดขึ้นเร็วขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ยังคงต้องการข้อมูลที่มีมากขึ้นในด้าน Biologocal impact ของ HBx ระหว่าง genotype เนื่องจากอาจเป็นสาเหตุของ clinical outcome ต่างกันระหว่าง genotype จากศึกษา พบว่า HBx ระหว่าง genotype B และ C มีแตกต่างกันถึง 16 amino acid และส่งผลให้คุณสมบัติในการ transactvation และ anti-proliferation ต่างกันไปด้วย (87) ดังนั้นการหา function domain ต่างๆ และความแตกต่างของ function domain ระหว่าง genotype B และ C จึงเป็นสิ่งที่น่าทำการศึกษาต่อไป

นอกจากนี้จากการที่การกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1794A ทำให้ amino acid ของ HBx ที่ codon K130M และ V131I เปลี่ยนไป การเปลี่ยนไปนี้จะส่งผลต่อคุณสมบัติ transactvation (88) เนื่องจากเชื่อว่า region ที่สำคัญต่อกระบวนการ transcription activation ของ HBx อยู่ที่ amino acid ที่ 50-70 และ amino acid ที่ 110-140 ดังนั้นการศึกษถึงการเปลี่ยนไปของ function domain จาก HBx K130M และ V131I mutant type และผลที่ตามมา จึงเป็นสิ่งที่น่าทำการศึกษาต่อไป

การศึกษาเหล่านี้ต้องการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาวิทยาที่ลึกซึ้ง กล่าวเป็นขั้นตอนคือ 1. คัดเลือกลักษณะนิวคลีโอไทด์ที่สนใจ ในที่นี้คือการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ A1762T และ G1794A แล้วเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดย primer ที่จำเพาะ 2. Insert ขึ้น DNA ที่ต้องการนี้ลงใน expression plasmid 3.นำไปเพิ่มจำนวนและสร้างโปรตีนใน mamalian cell line เช่น HepG2 cell 4.แยกโปรตีนที่ได้มาทำการศึกษาต่อไป

รายการอ้างอิง

1. สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. ตับอักเสบจากไวรัส. กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัด บางกอกบลิ๊อค, 2543
2. Merican, I.; Guan, R.; Amarapuka, D.; Alexander, MJ.; Chutaputti, A. et al. Chronic hepatitis B virus infection in asain countries. Journal of gastroenterology and hepatology. 15 (2002) : 1356-1361
3. Richard, A. Viral hepatitis, diagnosis, treatment, prevention. America :Marcel Dekker Inc, 1997:
4. Blumberg, BS. Australan antigen and the biology of hepatitis B. Science. 197 (1977):17-25.
5. Dane, D. S., Cameron, C. H. & Briggs, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet i (1970): 695-698.
6. Tiollais, P.; Pourcel. C.; Dejean, A. The hepatitis B Virus. Nature. 317 (1985): 489-495.
7. Perkins, J.; A Medical and Scientific Illustrations. Infection disease ; [cited 2005 sep 8] <http://www.rit.edu/~japfaa/infectious.html>
8. Seeger, C.; Mason, WS. Hepatitis B Virus Biology Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64 (2000) : 51 - 68
9. Ljunggren, KK.; Miyakawa, Y,; Kidd, AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. JGV direct reviwe:Hepatitis B virus genotype. Journal of General Virology. 83 (2002) : 1267-1280.
10. Neurath, AR.; Strick, N.; Sproul, P.; Ralph, HE.; Valinsky, J. Detection of receptors for hepatitis B virus on cell of extrahepatic origin. Virology. 176 (1990):488-457.
11. Konig, S.; Beterams, G.; Nassal, M. Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. J. Virol. 72 (1998):4997–5005.
12. Robert, G. The Hepatitis B Virus Page. Robert’s HBV page Hepatitis B Surface Proteins;[cited 2005 sep 8] <http://www.globalserve.net/~robertg/HBV/hbsags.htm>
13. Rober, G. The Hepatitis B Virus Page. Robert’s HBV page Hepatitis B Core Proteins;[cited 2005 sep 8] <http://www.globalserve.net/~robertg/HBV/hbvcore.htm>
14. Lee, WM. Hepatitis B virus infection New England Journal Medicine. 337 (1997) :1733-1745

15. Wang, GH.; Seeger, C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus act as a protein primer for viral DNA synthesis. Cell. 71 (1992):663-70.
16. Robert G The Hepatitis B Virus Page. Robert's HBV page Hepatitis B Polymerase;[cited 2005 sep 8] <http://www.globalserve.net/~robertg/HBV/hbvpoly.htm>
17. Murakimi, S. Hepatitis B virus X protein: Structure, Function and Biology. Intervirolgy. 42 (1999) 42 81-99
18. Robert G The Hepatitis B Virus Page. Robert's HBV page. Hepatitis B X protein;[cited 2005 sep 8] <http://www.globalserve.net/~robertg/HBV/hbvX.htm>
19. Xin, WW.; Hussain, SP.; Huo, T.; Wu, CG.; Forgues, M. et al Molecular pathogenesis of Human hepatocellular carcinoma. Toxicology. 181 (2002):43-47
20. Arbuthnot, P.; Kew, M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma Internation Journal of Experiment. 82 (2001): 77-100
21. Sherlock, S.; Fox R.A., Niazi, SP.; Scheuer, PJ. Chronic liver disease and primary liver cell cancer with hepatitis associated (Australia) antigen in serum. Lancet. 2 (1970):1243-1247.
22. Kew, MC.; Kassianides, C.; Berger, EL.; Song, E.; Dusheiko, GM. Prevalence of chronic hepatitis B infection in pregnant black women living in Soweto. J. Med. Virol. 22 (1987): 263-269.
23. Beasley, RP.; Hwang, LY.; Lin, CC.; Chien, CS. Hepatocellular carcinoma and HBV. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. Lancet. 2 (1981): 11290-11333.
24. Lohiya, G.; Pirkle, H.; Hoefs, J.; Lohiya, A.; Ngo, VT. Hepatocellular carcinoma in young metally retarded HBsAg carriers without cirrhosis. Hepatology. 5 (1985): 824-826.
25. Chang, MH.; Chen, CJ.; Lai, MS. Universal hepatitis B virus vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. New Englang Journal Medicine. 336 (1997):1855-1889.
26. Brechot, C.; Gozucik, D.; Murakami, Y. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma. Cancer Biology. 10 (2000):211-231
27. Yen, TSB. Hepadnaviral X protein : Reviwe of recent progress. J Biomed Sci. 3 (1996) :20-30

28. Kim, CM.; Koike, K.; Saito, I.; Miyamura, T.; Jay, G. HBx gene of hepatitis B virus induce liver cancer in transgenic mice. Nature. 351 (1991) :317-320
29. Murakami, S, Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator J Gastroenterol. 36 (2001):651–660.
30. Lee, YI.; Hwang, JM.; Im, JH.; Lee, YI.; Kim, NS.; Kim, DG.; et al Human Hepatitis B Virus-X Protein Alters Mitochondrial Function and Physiology in Human Liver Cells Biol. Chem., 279 (2004): 15460 - 15471.
31. Wang, XW.; Forrester, K.; Yeh, H.; Feitelson, MA.; Gu, JR.; Harris, CC .Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding activity and associate with transcription factor ERCC 3. Proc Natl Acad Sci USA. 91(1994): 2230-2234.
32. Wang, XW.; Gibson, MK.; Vermeulen, W.; Yeh, H.; Forrester, K.; Sturzbecher, HW. et al Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. Cancer Res. 55 (1995): 6012-6016.
33. Magnusius, LO.; Norder, H. Subtype, genotype and molecular epidemiology of hepatitis B virus as reflect by sequence variability of the S-gene. Intervirology. 38 (1995):24-34.
34. Stuyver, L.; Gendt, SD.; Geyt, CV.; Zoulim, F.; Fried, M.; Schinazi, RF.; Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. J. Gen. Virol. 81 (2000): 67-81.
35. Sumi, H.; Yokosuka, O.; Seki, K.; Arai, M.; Imazeki, F.; Kurihara, T. et al Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. Hepatology. 37 (2003):19-26
36. Chu, CJ.; Hussain, M.; Lok, A.S.F Hepatitis B virus genotype B is association with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B genotype C. Gastroenterology. 97 (2002): 406-412
37. Kao, JH.; Chen, PJ.; Lai, MY.; Chen DS. Hepatitis B genotype correlate with clinical outcome in patient with chronic hepatitis B .Gastroenterology. 118 (2000): 554-9
38. Ding, X.; Mizokami, M.; Yao, G.; Xu, B.; Orito, E.; Ueda, R.; Nakanishi, M Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. Intervirology. 44 (2001):43-47.

39. Orito, E.; Ichida, T.; Sakugawa, H.; Sata, M.; Horiike, N.; Hino, K.; Okita, K. et al
Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with
chronic HBV infection in Japan. Hepatology. 34 (2001): 590-4.
40. Tangkijvanich, P.; Mahachai, V.; Komolmit, P.; Fongsarun, J.; Theamboonlers, A.;
Poovorawan, Y. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in
Thailand. World J Gastroenterol. 11 (2005):2238-2243.
41. Kao, J. H hepatitis B virus genotype: clinical relevance and molecular characteristics.
Journal of Gastroenterology and Hepatology. 17 (2002):643-50.
42. Rodriguez-Frias, F.; Buti, M.; Jardi, R.; Cotrina, M.; Viladomiu, L.; Esteban, R.; Guardia,
J Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes
and core mutations. Hepatology. 22 (1995):1641-7.
43. Yoo ,BC.; Park, JW.; Kim, HJ.; Lee, DH.; Cha, YJ.; and Park, SM. Precore and core
promoter mutation of hepatitis B virus and hepatitis B e antigen negative chronic
hepatitis B in Korea. Journal of Hepatology. 38 (2003):98-103.
44. Blum, HE. Hepatitis B Virus:Significance of naturally occurring mutant. Intervirolgy.
1993;35:40-50.
45. Kao , JH.; Chen, PJ.; Lai, MY.; and Chen, DS. Basal core promoter mutations of hepatitis
B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis carriers
Gastroenterology 124 (2003) :327-334.
46. Fang, ZL.; Ling, R.; Wang, SS.; Nong, J.; Hung, CS.; et al . HBV core promoter
mutations in pateint with hepatocellular carcinoma from Guangxi, China. Journal
of Medicine Virology. 56 (1998):18-24
47. Takahashi, K.; Akahane, Y.; Hino, K.; Ohta, Y.; and Mishiro, S. Hepatitis B virus
genome sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma pateints :
comparative analysis of 40 full-length isolate. Archives of Virology. 143
(1998):2313-2326.
48. Baptista, M.; Kramvis, A.; and Kew, MC. High prevalence of 1762T 1764A mutations in
basic core promoter of hepatitis B virus isolate from black africans with
hepatocellular carcinoma compared with asyptomptomatic carriers . Hepatology.
29 (1999): 946-953.

49. Cho, WS.; Shin, YJ.; Hahm, KB.; Jin, JH.; Kim, YS.; Kin, JH.; et al Analysis of precore and core promoter DNA sequence in liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma J Korean Med Sci. 14 (1999): 424-430.
50. Yuen, MF.; Tanka, Y.; Mizokami, M.; Yuen, CH.; Wong, DK.; et al Role of hepatitis B virus genotype Ba and C, core promoter and precore mutation on hepatocellular carcinoma : a case control study. Carcinogenesis. 25 (2004):1593-1598
51. Li, J.; Buckwold, VE.; Hon, MW.; and Ou, JH. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. J Virol. 73 (1999):1239-1244.
52. Kramvis, A.; and Kew, MC. The core promoter of hepatitis B virus. J Viral Hepat. 6 (1999): 415-427.
53. Blackberg, J.; and Ljunggren, KK.; Mutationa within the hepatitis B virus genome among chronic hepatitis B pateint with hepatocellular carcinoma. Journal of medical virology. 71 (2003) : 18-23
54. Zhong, S.; Chan, JY.; Yeo, W.; Tam, YM.; and Johnson, PJ.; Frequent integration of precore/core mutants of hepatitis B virus in human hepatocellular carcinoma tissues. Journal of Viral Hepatitis. 7 (2000): 115-23.
55. Song, CH.; Kim, H.; Kim, SH.; Chs, CY.; Kook, YH.; et al. Comparison of full length sequences of hepatitis B virus isolate in hepatocellular carcinoma pateints and asymptomatic carriers of Korea. Journal of Medical virology. 75 (2005):13-19.
56. Huy, TT.; Ushijima, H.;Quang, VX.; Ngoc, TT.; Hayashi, S. et al Charecteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in vietnam . Journal of Medical Virology. 74 (2004) :228-238
57. Yeh, CT.; Shen, CH.; Tai, DI.; Chu, CM.; and Liaw, YF. Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. Oncogene. 19 (2000): 5213-5220.
58. Guang-Yuh, H.; Chao-Jun, H.; Chuang-Yu, L.; Cheng-Chung, W. Dominant mutations of hepatitis B virus variant in hepatoma accumulate in B-cell and T-cell epitopes of the HBx antigen. Viral research. 92 (2003):157-164.
59. อภิวัฒน์ มุทิตรางกูร. อนุชีววิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร.Text juornal publication.

60. Jakubowski, K. CHAPTER 3 - NUCLEIC ACIDS .BC Online 3C Language of DNA;[cited 2005 sep 8] <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/oldnalanguage.html>
61. Cawley, S. Application. ;[cited 2005 sep] <http://www.stat.berkeley.edu/users/terry/Classes/s260.1998/Week9b/week9b/node3.html>
62. Perfectprep® Gel Cleanup ependrof Mannal. New York. Brinkmann Instrument, Inc. 2002
63. DNA Sequencing DNA Sequencing. ;[cited 2005 sep] <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DNAsequencing.html>
64. Khalsa, G. Mama ,it's molecular kitchen.Sequencing;[cited 2005 sep] <http://lsvl.la.asu.edu/resources/mamajis/sequencing/sequencing.html>
65. Formosa, T.Biochem 6090 Notes and Figures for Dr. Tim Formosa's Lectures. ;[cited 2005 sep] <http://medstat.med.utah.edu/block2/biochem/Formosa/menu.html>
66. Kuang, SY.; Jackson, PE.; Wang, JB.; Lu, PX.; Munoz, A.; et al Specific mutation of hepatitis B virus in plasma predict cancer delvelopment. PNAS. 101 (2004) : 3575-80
67. Kidd, AH.; and Ljunggren, A.; A revised secondary structure model for the 3'-end of hepatitis B virus pregenomic RNA. Nucleic acid research. 24 (1996) :3295-301
68. Victor, JL.; Buckwold, E.; Hon, MW.; Ou, JH.; Mechanism of suppression og hepatitis B precore RNA transcription by a frequent double mutation. Journal of Virology. 77 (1999) :1239-44
69. Li, L.; Xu, Z.; Zheng, Y.; Jhonson, DL.; Ou, J. Regulation of hepatocyte nucleasr factor I activity by wild type and mutant hepatitis B virus X protien. Journal of Virology. 76 (2002) 5875-5881.
70. Yoo, BC.; Park, JW.; Kim, HJ.; Lee, DH.; Cha, YJ.; et al Precore and core mutations of hepatitis B virus and hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Korea Journal of hepatoogy. 38 (2003): 98-103
71. Jardi, R.; Rodriguez, F.; Buti, M.; Costa, X;Valdes, A.; et al Mutation in basic core promoter region of hepatitis B virus. Relationship with precore variant and HBV genotype in a spanish popolation of HBV carriers Journal of Hepatology. 40 (2004) :507-14.

72. Omata, M.; Ehata, T.; Yoksuka, O.; Hosoda, K.; and Ohto, M. Mutation in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis New England Journal Medical. 324 (1991)324:1705-1709.
73. Liang, T.; Hasikawa, K.; Rimon, N.; Wands, JR.; and Ben-Porath, E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. N Engl J Med. 324 (1991):1705-1708.
74. Naoumov, NV.; Schneider, R.; Grotzinger, T.; Jung, MC.; Miska, S.; Pape, GR.; and Will, H. Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. Gastroenterology. 102 (1992): 538-543.
75. Hsu, HY.; Chang, MH.; Lee, CY.; Hsieh, KH.; Ni, YH.; Chen, PJ.; and Chen, DS.. Precore mutant of hepatitis B virus in childhood fulminant hepatitis B: an infrequent association. J Infect Dis. 1995; 171:776-81.
76. Lindh, M.; Horal, P, Dhillon, AP.; Furuta, Y.; and Norkrans, G. Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. Hepatology. 24 (1996):494-501.
77. Hur, GM.; Lee, YI.; Suh, DJ.; Lee, JH.; and Lee, YI. Gradual accumulation of mutations in precore core region of HBV in patients with chronic active hepatitis: implications of clustering changes in a small region of the HBV core region. J Med Virol. 48 (1996) :38-46.
78. Fattovich, G.; McIntyre, G.; Thursz, M.; Colman, K.; Giuliano, G.; Alberti, A.; et al Hepatitis B virus precore/core variation and interferon therapy. Hepatology. 22 (1995)22 :1355-1362.
79. Zhang, X.; Zoulim, F.; Habersetzer, F.; Xiong, S.; and Trepo, C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. J Med Virol. 1996;48:8-16.
80. Minami, M.; Poussin, K.; Kew, M.; Okanoue, T.; Brechot, C.; et al Precore/core mutations of hepatitis B virus in hepatocellular carcinomas developed on noncirrhotic livers. Gastroenterology. 111 (1996): 691-700.
81. Yuan, TT.; Faruqi, AH.; Shih, LW.; and Shih, C. The mechanism of natural occurrence of two closely linked HBV precore predominant mutation. Virology. 211 (1995) 144-155

82. Tu, H.; Bonura, C.; Giannini, C.; Mouly H.Sousan P et al Biological impact of natural COOH-Terminal deletion of Hepatitis B virus X protein in hepatocellular tissue Cancer Research. 61 (2001)7803-10.
83. Venard, V.; Corsaro, D.; Kajzer, C.; Bronowick , JP.; and Faou, AL. Hepatitis B virus X gene variability in French-Born patients with Chronic Hepatitis and hepatocellular carcinama. Journal of Medical Virology. 67 (2000):177-184
84. Song, LH.; Duy, DN.; Binh, VQ.; Luty, AJ.; and Kremsner, PG. Low mutation in X gene, core promoter and precore region of hepatitis B virus infect in Vietnamese. Journal of Viral Hepatitis. 12 (2005) :160-167.
85. Levrero, M.; Balsano, C.; Natoli, G.; Avantaggiati, ML.; and Elfassi, E Hepatitis B virus X protein transactivates the long terminal repeats of human immunodeficiency virus types 1 and 2. J. Virol. 64 (1990) :3082-3086.
86. Caselmann, WH. Trans-activation of cellular genes by hepatitis B virus proteins: a possible mechanism of hepatocarcinogenesis. Adv Virus Res. 47 (1996): 253-302.
87. Lin, X.; XU, X.; Huang, QL.; Zheng, DL.; Lin JY. Different in structure and transactivating capacity between X protein of genotype B and C hepatitis B virus. Zhonghua Weishengwuxue He Mianyixue Zazhi. 24 (2004) :559-563
88. Lin, X.; XU, X.; Huang, QL.; Liu, YQ.; Zheng, DL.; Chen, WN.; Lin, JY. Biological impact of hot spot mutation of hepatitis B virus X protein are genotype B and C different. World J Gastroenterology. 11(2005) :4703-4708



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ และทั้งหมดจะนำ submit เข้า
GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

>THCu01

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACGCGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACddT
GTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTAGGGGAGGAGGTTAGGTTAAAGGTCTTTGTA
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu02

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCACTGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGG
ACTCTTGGACTTTTGCATAAGAGGACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACC
TTGAGGCATACTTCAAAGACTGTGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGG
TCAGGTTAAAGGTCTTTGTA
CTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCCG
CACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAG
CCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTAGGGCATGGACATCGACCCGTATAAAGAAT
TTGGAG

>THCu03

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGCCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTA CTG
GGAGGCTGTACGCATAAATTGGTCTGTTCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGAAATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu04

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACAGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTA CT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCCTGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu05

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGACTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTC
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGTAAGTGG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu07

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGACGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCC GCCAGGTCTTGCCCTAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGATTAATGATCTTTGTAAGTGG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu08

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACGGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGGTTAGGTTAATGATCTTTGTAAT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGCGTTCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTGGGGCATGGACATCGACCCGGATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTACT
CTCTTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCTTCGATTCGAGATCTCCTCGACACCGCCTCTG
CTATG

>THCu09

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGCTTGGGACTCTACCGT
CCGCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGGCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGACGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
TGCATGGAGACCACCGTGAACGCCTGCCAGGCCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAAG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCGTACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTCCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu10

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTACGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAAGTATTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCGTACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu11

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTTCCGACCGACCACGGGGCGTACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTACCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCACCGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTACT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGCCTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu12

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGAACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGCCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTAAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu13

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAGGACTGGGAGGAGTTGGGGGATGAGACTAGGTAAATGATTTATGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGTACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu14

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGTCTAGGTTAATGATCTTTGTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGAGTGG
CTTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGC

>THCu15

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCAGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGCTTGGGACTTTACCGT
CCTCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAGGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGTTCAGGTTAATGACCTTTGTATTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGACATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAG

>THCu16

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGACTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGAACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTC
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGACTGG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu17

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCATCTCGGGGCCGCTCTGGGGCTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTC
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATCAGGTTAATGATTTTTGACTAG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu18

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACGGGAACCTGCCCAAGGTCTTACATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu19

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCAGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATTTTTGTATTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu20

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCAGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTAAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGAGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu21

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCAGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCAGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAACAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu22

ATGGCTGCTCGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGCGGGGACGTTTGGGTCTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTACCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACACCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu23

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCC GCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCCCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu24

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGCTTGGGACTCTACCGT
CCGCTTCTCCGTCTGCTGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGACCACTGGGACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
AACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTA
AGGAGGCTGTAGGCATAAATGGGTGTGTTCAACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTC
TGCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGT
GGCTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu25

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGACGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATGGTCTGTTCAACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu26

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTA CTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu27

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGGCTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGAATCGGTTAATGATCTTTGTA CTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGACATGGACATTGACCCATATAAAGAATTTGGAG

>THCu28

ATGGCTGCTCGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTA CTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCACCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
GCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGAACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu29

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGCCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCAACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCACTGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGG
ACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAAGTTAATGATCTTTGTA CTG
GGAGGCTGTACGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CAGAATCATCTCTTGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu30

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTACGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGTACGTC
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TCTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTAG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCGGTACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGC

>THCu31

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGGCTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGCCCACCGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCC GCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCGACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu32

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTC
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGGACTCCCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATCAGGTTAATGATCTTTGTACTGG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu33

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGAGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu34

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCACTGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGGTTAGGTTAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGCGTTACCAGCACCGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu35

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCCCTGGAGCCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGA
ACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTAAACGAGTGGGAGGAATTGGGGGAGGAGGTTAGGTTAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGCGTTACCAGCACCTTGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGC

>THCu36

ATGGCTGCTAGGTTGTGCTGCCAACTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCCCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCACCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCACGGGAACCTGCCCAAGGTCTTGTATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTATTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGGTTAGGTTAATGATCTTTGTA
AGGAGGCTGCAGGCATAAATTGGTGCGTTCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTC
TGCCTAATCATCTCCTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGT
GGCTTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu37

ATGGCTGCTAGGTTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCACCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCGTGGAAACCACCGTGAACGCCACGGGAACCTGCCCAAGGTCTTGTATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTATTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGGTTAGGTTAATGATCTTTGTA
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGCGTTCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCCTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu38

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGTCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACGGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTAGGGGAGGAGTTAGGTTAAAGGTCTTTGTACT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTTACT
CTCTTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCC

>THCu39

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTACGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGTACGTC
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TCTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTAG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGGTACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu40

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTAAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu41

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAGGACTGGGAGGAGTTGGGGGATGAGACTAGGTAAATGATTTATGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAATACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu42

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGACTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTC
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGACTGG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAG

>THCu43

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGACTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTC
GCATGGAGACCACCGAGAACGCCTGACAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAATAAGA
ATCTTGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGACTGG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu44

ATGGCTGCTCGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGTACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCACCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTAAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu45

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTACGTCTGCCGTTCCGCCCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCTGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu46

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGCTTAGATTAATGATCTATGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCCACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCACTATAAA
GAATTTGGAG

>THCu47

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTACAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGCTTAGATTAAGGTCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTCACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGAGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu48

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTACCGTTCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTT
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAAGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATCAGGTTAATGATCTTTGTA CTGG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu49

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCT
ACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCT
ACCGTCCCCTTCTTCGACTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGC
GGTCTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGC
ACGTTCGCATGGAGACCACCGTGAACGCCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAA
GAGGACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGA
CTGTGTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGT
ACTGGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCC
TCTGCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGG
GTGGCTTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu50

ATGGCTGCTAGGTTGTGCTGCCAACTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCACCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCACGGGAACCTGCCCAAGGTCTTGTATAAAAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTATTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGGTTAGGTTAATGATCTTTGTA
AGGAGGCTGCAGGCATAAATTGGTGCCTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTC
TGCCTAATCATCTCCTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGT
GGCTTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu51

ATTCTGTCGTGCTCTCCCGCAAGTATACATCATTTCATGGCTGCTAG
GTTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGCGCT
GAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGCCCGCTTCTCCG
CCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCCGTCTGTG
CCTTCTCACCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTGCGCATGGAAAC
CACCGTGAACGCCACGGGAACCTGCCCAAGGTCTTGTATAAGAGGACTCTTGGACT
TTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTGTGTTTACTGA
GTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGGTTAGGTTAATGATCTTTGTA
ACTAGGAGGCTGTAG
GCATAAATTGGTGCCTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCT
CCTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTAGAGACA
TGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTTAATCTCTTTTTGCC
TTCTGACTTTTTTCTTCTATTTCGAGATCTCCTCGACACCGCCACTGCTTTGTATCGGG
AGGCCTTAGAG

>THCu01c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGCCTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCGTACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTA CTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu02c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGTCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCAGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGTA CTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu03c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTGCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCTAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu04c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGCTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGACCACTGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
AACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATGGGTGCGTTCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTC
TGCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGT
GGCTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu05c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACGGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGGTTAGGTTAATGATCTTTGTAAT
AGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTGCGTTCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGGCATGGACATCGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu06c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGCTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGTTCAACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
CTTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu07c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTATGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu08c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGCCCCGACCGGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTT
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu09c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGGCCGACCACGGGGCGTACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTACCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCACTGGAACCTGCCCAAGGTCTTGTATAAGAGG
ACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCTACTTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu10c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGCCTCTATCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCCCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTAAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCT
CTTTTTGCCTTCTGAATTCTTCCGTCTATTCGGGATCTCCTCGACACCGCCTCTGCT
CTGTATCGGGAGGCCTTGAAGCTCC

>THCu11c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCC GCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGATGAGACTAGATTAATGATTTATGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTTCACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCT
CTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCTTCTATTTCGTGATCTCCTCGACACCGCCTCTGCTC
TGATCGGGAGGCCTTAGAGTCTCCGGAACATT

>THCu12c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCC GCGGACGACCCATCTCGAGGCCGTTTGGGAATCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCTGCCAAGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGATGATACTCGGTTAATGATTTATGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTTCACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATCGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu13c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTT
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACCAGGTTAATGATCTTTGACTGG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu14c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGGCTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAG

>THCu15c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCCGAGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGGCTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGTACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCACCAGGCCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCGTACTTCAAAGACTGT
GTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATCGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu16c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAGGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATTGACACCTATAAAGAATTTGGAG

>THCu17c

ATGGATGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGACGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACCGGAACCTGCCCAAGGTCTTACATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTATT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTCCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu18c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGCCCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTCCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu19c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGCTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCGCCGTGAACGCCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu20c

ATGGCTGCTAGGGTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCAGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGCCTCTACCGT
CCACTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCC GCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAACAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu21c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGGTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCACCGTAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGG
ACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu22c

ATGGCTGCTAGGTTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCAGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCACTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAACAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTAAAACTGGGAGGAGTTGTGGGAGGAGATTAGGTAAATGATCTTTGTACTG
AGAGACTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACACCTATAAAGAATTTGGAG

>THCu23c

ATGGCTGCTAGGTTGTGCTGCCAACTGGATCCTACGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCC GCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGAATGGAGACCACCGTGAACGCCACCGGAACCTGCCCAAGGTCTTACATAAGAG
GACTCTTGGA CTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTATT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTCAACAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu24c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCC GCGGACGACCCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTCCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTC
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGGA CTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATCAGGTAAAGGTCTTTGTACTGG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTCAACAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu25c

ATGGCTGCTAGGGTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTCGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu26c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGGCCGACCACGGGGCGTACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTACCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCACTGGAACCTGCCCAAGGTCTTGTATAAGAGG
ACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu27c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu28c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTCGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAGGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATCAGGTTAAAGGTCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu29c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGACGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTA CTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCT
CTTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCGTCTATTCCGGGATCTCCTCGACACCGCCTCAGCT
CTGTATCGAGAGGCCTTAGAGTCTCCGGAACATTGT

>THCu30c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGTCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTCGGTTAATGATTTTTGTA CTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGA
CTTTGGGGAATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu31c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGATGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTACCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACCGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTGAAGGTCTTTGTACT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu32c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGGCCGACCACGGGGCGTACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTACCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACTGGAACCTGCCCAAGGTCTTGTATAAGAGG
ACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu33c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAAGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTCGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAGGACTGGGAGGAGTCGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGAACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAC

>THCu34c

ATGGCTGCTCGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGCCGATTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu35c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTGTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CACATGGAGACCACCGTGAACGCCCTCGAGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGG
ACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGTTGAGGTTAAAGGTCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGCGTTCACCAGCACCATGTAACTTTTTCACCTCTG
CCTAATCATCTCCTGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATCGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu36c

ATGGCTGCTAGGTTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCAGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGCCTCTACCGT
CCACTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTCGGTTAAAGGTCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTTCACCAGCACCATGCAACTTTTTTCACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu37c

ATGGCTGCTCGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCAGCGCTGAATCCC GCGGACGACCCGTCGCGGGGCGGTTTGGGTCTCTACCGT
CCCCTTCTTCATCTGCCGTT CAGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACACCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu38c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCC GCGGACGACCCATCTCGGGGCGGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCC GCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCCCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTACAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu39c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGTCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCAGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCTTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu40C

ATGGTGCCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGCCCACCGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCTGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu41c

ATGGCTGCTCGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGCCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCCCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu42c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGGAGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGAC
TCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCACCGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTGAAGGTCTTTGTACT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGACATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu43c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTACGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTGCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCCCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTAGGTTAATGATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu44c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGGGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGACCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTACAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATCAGGTTAATCATCTTTGTACTA
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCTTGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAGGACATGGACATTGACACCTATAAAGAATTTGGAG

>THCu45c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCTTCTCGGGGCCGTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTCCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTC
GCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGA
CTCTTGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTG
TATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGATGAGACTAGGTTAATGATTTATGTACTAG
GAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC
CTGATCATCTCATGTTTCATGTCTTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC
TTTAGGACATGGACATTGACCCATATAAAGAATTTGGAG

>THCu46c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCAGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAAACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAATGATCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu47c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCC GCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGCGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTGATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu48c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC
CCGTGCGCGCTGAATCCC GCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGATTGGGGCTCTACCGC
CCGCTTCTCCGCCTGGTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACCGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAG
GACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTG
TGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTACT
AGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCT
GCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGGCATGGACATCGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTTACT
CTCTTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCTTCTGTTTCGAGATCTCCTCGACACCGCCTCTGC
TCTGTATCGGGAGGGCTTAGAGTCTCCGGAACATTGTTACCTCA

>THCu49c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTACGTC
CCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCATCTCGGGGCCGTTTGGGACTCTACCGT
CCCCTTCTTCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCT
CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT
CGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGG
ACTCTTGGACTCTCAGCGATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT
GTATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAAGGTCTTTGTACTG
GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTG
CCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGG
CTTTAvGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

>THCu50c

ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGT
CCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGTTTGGGGCTCTAC
CGCCCGCTTCTCCGCCTGTTGTACCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGC
GGACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTG
CACGTCGCATGGAGACCACCGTGAACGCCACCGGAACCTGCCCAAGGTCTTGCAT
AAGAGGACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAG
ACTGTGTGTTTACTGAGTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTAAATGATCTTTGT
ACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGTGTTACCAGCACCATGCAACTTTTTACC
TCTGCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGG
TGGCTTTAGGGCATGGACATCGACCCGTATAAAGAATTTGGAG

ภาคผนวก ข

แสดง Accession Number. ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ใน GenBank ที่ใช้ทำ Phylogenic tree



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	Genotype.	Accession Number.
1	Genotype A	>AY934774 >AY934773 >AY934772 >AY934771 >AY934770
2.	Genotype B	>AB205120 >AB205119 >AY217368 >AY217365 >AY217361
3.	Genotype C	>AB112472 >AB112348 >AB112065 >DQ089804 >DQ089802
4.	GenotypeD	>AY902772 >AY902770 >AY902769 >AY902768 >AY902773
5.	Genotype F	>DQ060830 >DQ060829 >DQ060828 >DQ060827 >DQ060826

No.	Genotype	Accession Number.
6.	Genotype F	>AB214516 >AB166850 >AB036914 >AB036919 >AB036920



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารเคมี



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. Lysis Buffer

Tris-HCL	0.105	g.
EDTA	0.1245	g.
SDS	0.335	g.

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 20 mg/ml Protinase K

Protinase K	2	ml
น้ำกลั่น	1	ml

ผสมจนเข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 C°

3. 25:4:1 (V/V) Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol

Phenol	25	Volume
Chloroform	24	Volume
Isoamyl alcohol	1	Volume

ผสมจนเข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 C°

4. 20 $\mu\text{g/ml}$ Glycogen

Glycogen	4	g.
น้ำกลั่น	1	ml

ผสมจนเข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 C°

5. 2 M Sodium acetate

Sodium acetate	8.203	g
น้ำกลั่น	50	ml

ผสมจนเข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 C°

6. 70% Ethanol

Absolute ethanal	70	ml
น้ำกลั่น	30	ml

ผสมจนเข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 C°

7. 5 X Tris Borate Bufer (5 X TBE)

Tris-Base	54	g.
Boric acid	27.5	g.
EDTA (pH 8)	20	ml

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. 1 X Tris Borate Bufer (1 X TBE)

5 X TBE	200	ml
น้ำกลั่น	800	ml

ผสมจนเข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. 2% (W/V) Agrose gel

Agrose gel	4	g
1 X TBE	200	ml

เขย่าจนเข้ากันแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า Agrose gel จะละลายหมด

10. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	μl
น้ำกลั่น	300	ml

ผสมจนเข้ากัน ใช้ที่อุณหภูมิห้อง

11. Loading dye

0.25% Brophenol blue

40% (W/V) surose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °

12. Sequencing Mixture

Distilled water	5.33	μl
5 X bufer	2	μl
Big dyeRR-100	4	μl
Primer Xi1	0.67	μl
PCR Product	8	μl

นำไปใช้ทันที

13. 75% Isopropanal

Isopropanal	7.5	ml
น้ำกลั่น	2.5	ml

ทำใหม่ทุกครั้งที่ใช้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
บันทึกข้อความ ผ่านการพิจารณาจริยธรรม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร 4456, 4493
 ที่ วจ 319/2547 วันที่ 23 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547
 เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

เรียน หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี

จากการประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ครั้งที่ 16/2547 ในวันจันทร์ ที่ 22 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547 ได้พิจารณา เอกสารการอนุมัติการใช้ซีรัมของผู้ป่วยเพื่อการวิจัย ดังรายละเอียดต่อไปนี้

โครงการวิจัย เรื่อง "ความชุกของการกลายพันธุ์ ของไวรัสตับอักเสบบีบริเวณเอ็กซ์และพีคอรีน ของผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งตับ"

หัวหน้าโครงการวิจัย น.ส.วีรนาภา จันทร์สุทิศ

ที่ประชุมมีมติให้ ผ่านการรับรองปัญหาจริยธรรมได้

โดย ไม่มีเงื่อนไข
 มีเงื่อนไขดังนี้

จึงเรียนมาเพื่อทราบ และโปรดแจ้งหัวหน้าโครงการวิจัยทราบด้วย จักเป็นพระคุณยิ่ง

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจิลโด ชินเนต)

รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ปฏิบัติราชการแทนคณบดี คณะแพทยศาสตร์

สถาบันวิจัยประชากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้วิจัยหลัก

(ภาษาไทย) นางสาววีราภา จันทรสุพิศ

ตำแหน่งทางวิชาการ ไม่มี

(ภาษาอังกฤษ) Ms. Weerapa Juntarasupit

ตำแหน่ง

นิสิตวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตหลักสูตร สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0-1558-0035, 0-2252-4986 (ที่ทำงาน)

ที่อยู่ปัจจุบัน

51/32 หมู่บ้านมิตรประชา ตำบลเสาธงหิน อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี 10400

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่สำเร็จการศึกษา
จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)	เทคนิคการแพทย์	2544

ผลงานวิจัยในอดีต (ในระยะเวลา 3 ปี)

Nopponpunnth V, Changrad S, Rakyuu A, Nertsawange J, Chansupit W, Poovorawan Y. Design of degenerate primers for multiplex nested-PCR detection of human lymphotropic herpesviruses. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003 Mar;34(1):120-5.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย