บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาใน *E.coli* การวิจัยศึกษาการแสดงออกของโปรตีนผิวไวรัสตับอักเสบ บี โดยใช้พลาสมิดที่เหมาะสม การแสดงออกในระบบ *E.coli* พลาสมิดที่ใช้เป็นพลาสมิดที่เอื้ออำนวยต่อการแสดงออกของยีน เช่น pGEX4T-1เป็นพลาสมิดที่ใช้ในการผลิตวัคซีน เมื่อนำโคโลนีที่ต้านยาแอมพิซิลินซึ่งควรจะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี การตรวจสอบหลังทำการโคลนโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR พบว่ามีบางโคโลนีให้ผลเป็นบวก

โปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี (HBsAg) ที่ฝากถ่ายสู่ *E.coli* เป็นส่วนยีนที่มีความสำคัญในการกระตุ้นร่างกาย การผลิตวัคซีนใช้ยีนที่สร้างโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี ตำแหน่งที่มีความสำคัญ อยู่ในส่วน "a" determinant มีรายงานว่าเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ใน "a" determinant อาจมีผลต่อการป้องกันโรคสามารถทำให้มีผลต่อการกระตุ้นภูมิร่างกาย พบว่าอาจจะมีการติดเชื้อเกิดขึ้นในเด็กที่ได้รับวัคซีนแล้ว การกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในตำแหน่งกรดอะมิโนตัวที่ 145 โคลนที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ถึงว่าจะมีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์แต่ไม่ใช่ตำแหน่งที่สำคัญ และการเปลี่ยนกรดอะมิโนเกิดในตำแหน่งนอก "a" determinant จึงได้นำโคลนที่ได้นำมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนต่อไป เมื่อได้โคลนที่ผ่านการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ทำการตรวจสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี โดยการนำเซลล์ที่ได้รับการฝากถ่ายยีน และกระตุ้นการสร้างโปรตีนเป็นระยะเวลาต่างกัน โปรตีนที่ได้หลังจากทำให้เซลล์แตกแล้วนำโปรตีนมาทำการแยกบน SDS PAGE ซึ่งจะเห็นว่าได้แถบแบนที่แตกต่างออกไปจากตัวควบคุมที่เป็นลบจาก *E.coli* ที่ได้รับการฝากถ่ายเฉพาะพลาสมิดเท่านั้น ในปี1980 Patric Charnay และคณะได้ทำการผลิตโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี ใน *E.coli* นำมาทดสอบการแสดงออกของโปรตีนที่ได้ โดยทำให้เซลล์แตกแล้วนำมาทำ polyacrylamide SDS gel โปรตีนที่ได้เป็นผลรวมระหว่างโปรตีนเชื่อมต่อกับส่วน HBsAg ได้เหมือนการทดลองที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ ผลจากการทำ SDS PAGE เพื่อทดสอบว่าโปรตีน S ที่ทำการโคลนมีการแสดงออกหลังจากกระตุ้นการสร้างโปรตีน พบว่าชั่วโมงที่เห็นว่ามีการสร้างโปรตีนคือชั่วโมงที่ 4,5,6 ในชั่วโมงที่ 3 และ 7 เห็นว่าการสร้างโปรตีนน้อยมาก โปรตีนที่ได้มีขนาดเป็นผลรวมระหว่างโปรตีนเชื่อม GST กับ HBsAg โดยมีขนาดประมาณ 53 kDa โปรตีนมีการแสดงออกของโปรตีนน้อยอาจจะเป็นเพราะเมื่อมีการเลี้ยงเซลล์ไปหลายชั่วโมง ความหนาแน่นของเซลล์ *E.coli* มากเซลล์เกิดความเครียดทำให้การสร้างโปรตีนน้อย ในปี 1980 jeffreyและคณะ ได้ทำการผลิตโปรตีนส่วน HBsAg ใน *E.coli* ได้ผลผลิตเป็นโปรตีน HBsAg และโปรตีนเชื่อม

คือ β-lac[40] นอกจากโปรตีนผิวส่วน S แล้ว ในปี 1985 Wolf และคณะได้ทำการผลิตโปรตีนผิวส่วน PreS2 โปรตีนที่ผลิตใน *E.coli* ทำการแยกบน SDS PAGE[41] การศึกษาของ Fujisawa และคณะในปี 1983 พบว่าปริมาณของโปรตีน HBsAg ที่ได้ชั่วโมงที่ผลิตมากที่สุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 7-8 เนื่องจากพลาสมิดที่ใช้แตกต่างกัน ช่วงเวลาที่มีการสร้างโปรตีนไม่แตกต่างกันมากนัก

ในชั่วโมงที่ 4,5,6 หลังจากตัดโปรตีนเชื่อมออกไปแล้ว ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีน ผิวด้วยวิธี Western blot การตรวจสอบคุณสมบัติจะทำให้รู้ถึงขนาดของโปรตีน ในการทำ western blot มีตัวควบคุมที่เป็นลบคือ *E.coli* ที่ได้รับการฝากถ่ายเฉพาะพลาสมิดเท่านั้น และเพื่อตรวจสอบว่าในการผลิตโปรตีนได้หลั่งออกมานอกเซลล์หรืออยู่ในเซลล์ นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่แยกหลังจากการกระตุ้นการสร้างโปรตีนของเซลล์ *E.coli* ปั่นแยกออกมาตรวจสอบ ผลของ western blot พบว่าในชั่วโมงที่ 5,6 เห็นแถบของโปรตีนในขนาดประมาณ 24 kDa ใกล้เคียงกับตัวควบคุมที่เป็นบวก เห็นโปรตีนเด่นชัด ว่าโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 27 kDa ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า แอนติเจนที่ผลิตได้จากโคลน สามารถตรวจจับได้กับแอนติบอดี หลังจากการตัดด้วยโปรตีนเชื่อมออกไปแล้ว ขนาดของโปรตีนมีขนาดเล็กกว่า เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตใน โปรคาริโอต โปรตีนจะไม่ได้ถูก glycosylation คือการเติมหมู่น้ำตาลในผลผลิตที่ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลผลิตที่ได้จากการผลิตโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี ในยีสต์โดย Pablo Valenzuela และคณะในปี 1982 ได้ทำการผลิตโปรตีนผิวไวรัสตับอักเสบ บี ในยีสต์ และตรวจโปรตีนที่ผลิตได้ด้วยวิธี western blot โปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 23 kDaเป็นโปรตีนที่ไม่ได้ glycosylation เหมือนกันจะแตกต่างจากโปรตีนที่ได้จากตัวควบคุมที่เป็นบวกว่าโปรตีนที่ได้มีขนาด 27 kDaชัดเจน

การตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตได้จาก *E.coli* หลังจากที่ได้เลี้ยงเซลล์และกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG เก็บเซลล์หลังจากกระตุ้นเป็นเวลาที่มีการแสดงออกของโปรตีน HBsAg ทำให้เซลล์แตก แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ให้ผลเป็นลบ การวิเคราะห์ ELISA ผลที่ได้เป็นลบ อาจเป็นเพราะการที่เมื่อเซลล์แตกแล้วและโปรตีนอื่นๆภายในเซลล์ไม่ได้ถูกกำจัดออกไป ทำให้โปรตีนอื่นมาบดบังโปรตีน S ซึ่งมีปริมาณน้อยอยู่แล้ว ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี ELISA ได้ หรืออาจเป็นเพราะ HBsAg ที่ผลิตจาก *E.coli* ไม่ได้ถูก glycolysis และนี่อีกประการหนึ่งอาจจะมีโครงสร้างที่ไม่เหมาะสม การศึกษาของ Fujisawa และคณะ ซึ่งเมื่อตรวจสอบโปรตีนที่ได้จากการโคลนให้ผลเป็นลบ กรณีที่สามารถตรวจสอบด้วยวิธี western blot ได้ แต่ตรวจสอบด้วยวิธี ELISAเป็นลบเนื่องจาก

- เมื่อโปรตีนแบคทีเรียแตกจะมีโปรตีนอื่นๆของแบคทีเรียมากมายทำให้เกิดการบดบังโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบได้ ทำให้วิธี ELISA ไม่สามารถตรวจสอบได้[42]โปรตีนผิวที่ได้ในระบบแบคทีเรียเป็นโปรตีนที่ผลิตในเซลล์ต้องทำให้ เซลล์แตก (lysis) เพื่อจะได้ตรวจหรือวิเคราะห์โปรตีนผิวได้ แต่ถ้าต้องการโปรตีนที่ผลิตแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์จะต้องเปลี่ยนพลาสมิดเป็นชนิดอื่นที่เป็นพลาสมิดที่สามารถหลั่งโปรตีนที่ผลิตออกมานอกเซลล์ได้

ในระบบ *E.coli* ได้ทำการโคลนและศึกษาการแสดงออก ซึ่งเป็นระบบพื้นฐาน สามารถตรวจสอบการสร้างโปรตีนผิวโดยจับกับแอนติบอดีต่อโปรตีนผิวได้ ในระบบ *E.coli* ถึงจะไม่ใช้เป็นการศึกษาที่ใหม่แต่การทดลองนี้ใช้ซีรั่มของคนไทย ซึ่งเป็นแนวทางเพื่อผลิตแอนติเจนในประเทศ

ดังนั้นแนวทางสำหรับการทดลองต่อไปในการศึกษาในระบบ *E.coli* ควรทำดังต่อไปนี้

- โปรตีนผิวที่ได้ในระบบแบคทีเรียเป็นโปรตีนที่ผลิตในเซลล์ต้องทำให้ เซลล์แตก (lysis) เพื่อจะได้ตรวจหรือวิเคราะห์โปรตีนผิวได้ แต่ถ้าต้องการโปรตีนที่ผลิตแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์จะต้องเปลี่ยนพลาสมิดเป็นชนิดอื่นที่เป็นพลาสมิดที่สามารถหลั่งโปรตีนที่ผลิตออกมานอกเซลล์ได้
- โปรตีนที่ผลิตได้ในระบบ *E.coli* ที่โคลน ได้สามารถตรวจสอบการตอบสนองต่อโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบได้ ต้องทำให้โปรตีนที่ผลิตได้บริสุทธิ์ซึ่งวิธีการโดยทำการเลี้ยงเซลล์แล้วกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG แล้วทำให้เซลล์แยกตะกอนออกไป แล้วนำโปรตีนทั้งหมดใส่ใน column ซึ่งใน column มี glutathione sepharose เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตได้ในพลาสมิด pGEX เชื่อมอยู่กับโปรตีนเชื่อม glutathion S transferase ซึ่งสามารถจับกับ glutathione sepharose ได้หลังจากล้างโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่สามารถจับได้ออกไปแล้ว ทำการแยกโปรตีนที่ต้องการด้วย Glutathione Buffer แล้วตัดผลผลิตที่ได้ด้วยโปรตีน Thrombin จะได้ HBsAg ที่บริสุทธิ์ขึ้นเหมาะสมในการใช้ทดสอบต่อไป และอาจทำการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA มีรายงานการผลิตและตรวจสอบโปรตีนผิว PreS2 ของ sun boon Rhyum[43] และคณะได้ทำการผลิตโปรตีน PreS2 ใน *E.coli* (DH5α)หลังกระตุ้นการสร้างโปรตีนแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย anion-exchange chromotography แล้วทำการตัดโปรตีนเชื่อมออกโดยใช้ Factor Xa สามารถนำมาตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
- อาจทำการตรวจสอบการกระตุ้นภูมิร่างกายได้โดยศึกษาในสัตว์ทดลอง เช่นหนู โดยนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์แล้วฉีดในหนูตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีของหนู อาจจะนำซีรัมของหนูมาตรวจหาแอนติบอดีในระยะเวลาต่างๆหลังจากที่ได้รับแอนติเจนแล้ว

การศึกษาในสาหร่าย

การศึกษาอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่าย ได้ดัดแปลงขึ้นจากสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายของ เพื่อลดต้นทุนโดยการดัดแปลงการผลิตโดยใช้ปุ๋ยเพื่อชดเชยธาตุอาหาร พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยต้นทุนที่ใช้สำหรับอาหารเลี้ยงสาหร่ายประมาณลิตรละ 80 สตางค์ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มีประโยชน์สำหรับทำการเลี้ยงสาหร่ายเป็นอุตสาหกรรม จะประหยัดค่าใช้จ่าย

สำหรับการฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่าย

สำหรับยีน HBs ที่อยู่ในพลาสมิด pBIS เป็นพลาสมิดที่มี 35s promoter เป็น promoter ที่แสดงออกในพืช เมื่อทำการฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายไม่สำเร็จอาจเป็นเพราะสภาวะไม่เหมาะสมจึงทำให้การฝากถ่ายยีนไม่สำเร็จ

ระบบสาหร่ายเป็นระบบที่ใหม่ยังไม่มีการทดลอง จึงได้ออกแบบการทดลองการโคลนยีนที่ง่ายต่อการตรวจสอบผลการฝากถ่ายยีน โดย ใช้ Marker gene ที่ปัจจุบันนิยมใช้คือ Green Fluorescent Protein (GFP) ซึ่งระบบนี้จะมีประโยชน์ง่ายต่อการตรวจผลการฝากถ่ายยีน GFPเป็นยีนที่ได้จาก Aequorea victoria ปืนแมงกระพรุนเรืองแสง ส่วนที่เรืองแสงอยู่รอบๆ ส่วนที่เรียกว่า umbrella ในส่วน cytoplasm ของเซลล์ ประกอบด้วยส่วนที่จำเป็นในการเรืองแสง ซึ่งเมื่อมีการกระตุ้นจาก Ca^{++} photoprotein,aequorin จะปล่อยแสงสีเขียว น้ำเงิน GFP โปรตีนมีกรดอะมิโน 238 ตัว[44] เป็นโปรตีนที่มีความทนทานสามารถอยู่ใน pH ที่ช่วงกว้างคือ 5.5-12 GFP ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

เนื่องจาก GFP สามารถปล่อยแสงสีเขียวที่ความยาวคลื่น 509 นาโนเมตร ภายใต้แสง Ultraviolet ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย การฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายมีความเป็นไปได้ เพราะได้ทำการฝากถ่ายยีน GFP เข้าสู่สาหร่ายได้ โดยทำการตรวจสอบการฝากถ่ายยีนโดยใช้วิธี PCR พบว่าให้ผลเป็นบวกตรงกับตำแหน่งของ positive control เมื่อได้สภาวะที่สามารถทำการฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายได้ สามารถใช้สภาวะที่ได้ในการฝากถ่ายยีนชนิดอื่นๆเข้าสู่สาหร่ายได้

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตอื่นเช่น Caenorhabditis elegans[45] และ Drosophila ในระบบพืชได้นำ ยีน GFP มาใช้โดยการใช้ GFP มีการแสดงออกในพืช ได้ เช่นใบยาสูบ

การแสดงออกในระบบสาหร่าย มีขั้นตอน 2 ขั้นตอน

1. การฝากถ่ายยีนเข้าสู่ระบบสาหร่าย *Dunaliella sp*
2. การแสดงออกในระบบ *Dunaliella sp*

จากการทดลองที่ได้พบว่า มีความเป็นไปได้ในการฝากถ่ายยีน เข้าสู่สาหร่าย เนื่องจากสามารถฝากถ่ายยีน GFP เข้าสู่สาหร่ายได้ โดยได้ทำการตรวจสอบการฝากถ่ายยีน GFP ด้วยวิธี PCR ให้ผลเป็นบวกตรงกับตำแหน่ง positive control การฝากถ่ายยีนเข้าสู่ระบบ *Dunaliella sp* เป็นระบบที่ยังมีผู้ศึกษากันน้อยมาก จึงเป็นนวตกรรมใหม่ในการฝากถ่ายยีนเข้าสู่ระบบสาหร่าย

สำหรับการแสดงออกในระบบสาหร่าย ทำการฝากถ่ายยีน GFP เข้าสู่สาหร่ายพบว่า GFP ไม่สามารถแสดงออกได้คือไม่สามารถเรืองแสงภายใต้ UV ได้ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจาก GFP ที่ฝากถ่ายเข้าสู่สาหร่าย ไม่มี 35s promoter ซึ่งเป็น promoter ที่แสดงออกในพืช แต่อย่างไรก็ตามสามารถตรวจสอบการฝากถ่ายยีนได้โดยวิธี PCR

เนื่องจากสาหร่าย Dunaliella sp เป็นระบบที่น่าสนใจ เพราะเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารเองได้ และมีสารอาหารที่มีประโยชน์ เช่น สารอาหารโปรตีน กลีเซอรอล ในปัจจุบันนี้ได้มีการเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella sp* เป็นอาหารเสริมในภาคอุตสาหกรรม นอกจากนี้เกษตรกรก็สามารถเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ได้

แนวทางเพื่อที่จะทำการศึกษาต่อไป

1. ทำการปรับปรุงพลาสมิดที่ใช้ ซึ่งพลาสมิดที่ใช้เป็นพลาสมิดในระบบพืชคือมี 35spromoter โดยจะปรับปรุงคือควรให้มี marker ที่บ่งบอกได้ว่าสาหร่ายได้รับยีนที่ต้องการฝากถ่าย ซึ่งเรียกยีนตัวบ่งชี้ และทราบปริมาณการแสดงออกของยีนได้โดยใช้ Reporter gene

Reporter gene เป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางอย่างเพื่อให้ทราบว่าการแสดงออกมากน้อยเพียงใดในเนื้อเยื่อใด ยีนรายงานผลอีกชนิดหนึ่งคือ *Luc* (firefly luciferase) เป็นยีนรายงานผลที่ได้จากหิ่งห้อย เป็น marker gene ด้วย มีความเสถียร พลาสมิดที่มี luc gene การตรวจวัด luc gene ไม่จำเป็นต้องทำการสกัดเซลล์พืชดังนั้นเซลล์พืชที่ตรวจสอบไม่ตาย ปฏิกิริยาของ luc คือจะ oxidize luciferin แล้วปล่อยพลังงาน ATP โดยฉีดเข้าสู่เซลล์ เมื่อทำปฏิกิริยาแสงจะถูกปล่อยออกมาสามารถนับได้ในรูปโปรตรอน แต่มีข้อควรระวังคือต้องระวังการปนเปื้อนจาก แบคทีเรียที่สามารถแสดงออกของยีน luc ได้

report gene ในปัจจุบันมีการสนิยมใช้ report gene ชนิดนี้มากคือ GFP (green fluorescent protein) ในระบบพืชได้นำ ยีน GFP มาใช้เหมือนกัน โดยการ

ใช้ GFP มีการแสดงออกในพืช คือใบยาสูบ ในการนำ GFP ยีนเข้ามาใช้เพื่อเป็นยีนรายงานในระบบพืช คือระบบสาหร่ายที่ได้ทำการศึกษาอยู่ เห็นว่ามีความเหมาะสมเนื่องจากการฝากถ่ายยีน ควรจะมียีนรายงานที่เห็นได้ง่าย ตรวจสอบได้โดยตรงคือ นำ HBsAg มาต่อกับยีน GFP ถ้าโคโลนีของสาหร่าย ได้รับการฝากถ่ายยีนสามารถเห็นการเรืองแสงได้โดยมีการปล่อยพลังงานออกมา ซึ่งข้อดีที่น่าจะนำมาใช้ในระบบสาหร่าย *dunaliela sp*

- เนื่องจากสามารถตรวจวัดการฝากถ่ายยีนได้โดยตรงว่ามีโคโลนีใดได้รับการฝากถ่ายยีนโดยไม่ต้องสกัดเซลล์
- มีความไวและทนทานเพราะสาหร่ายต้องเลี้ยงในที่อุณหภูมิห้องและต้องมีแสงสว่างส่องถึง
- GFP reporter gene ปัจจุบันมีการจำหน่ายเป็นการค้า

GFP สามารถใช้เป็นยีนรายงานได้จะง่ายต่อการตรวจ ว่าโคโลนีใดที่รับยีนโปรตีนผิวเข้าไป โดยไม่ต้องตรวจด้วย PCR มีประโยชน์เพราะจะประหยัดเวลาและแรงงานได้มาก หลังจากนั้นเมื่อได้โคโลนีที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบ บี อยู่จึงได้ทำการตรวจสอบการแดสงออกต่อไป

2. ยีน HBs ที่มี 35s promoter น่าจะทำการฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายโดยใช้สภาวะที่ได้จากการฝากถ่ายยีน GFP และทำการตรวจสอบว่า การฝากถ่ายยีนสำเร็จหรือไม่โดย PCR และมี positive control ถ้าสามารถฝากถ่ายยีนไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่สาหร่ายได้ น่าจะมีการแสดงออกในระบบสาหร่าย เนื่องจากดีเอ็นเออยู่ในพลาสมิดที่มีความเหมาะสมในการแสดงออกในพืช การตรวจสอบการแสดงออกในระบบสาหร่ายโดยการทำ western blot ตรวจสอบโปรตีนที่ได้ว่ามีขนาดและคุณลักษณะอย่างไร ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนผิวในระบบสาหร่าย
3. อีกแนวทางคืออาจจะทำการตัดต่อยีน GFP ใน 35s promoter เพื่อให้ยีน GFP มีการแสดงออกในระบบพืช สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีน GFP ได้ง่ายเพราะยีน GFP สามารถเรืองแสงภายใต้ UV ได้ ซึ่งการพัฒนาระบบการฝากถ่ายยีนเข้าสู่ระบบสาหร่ายนี้ยังมีการศึกษากันน้อย จึงเป็นอีกระบบหนึ่งที่ได้น่าสนใจมาก