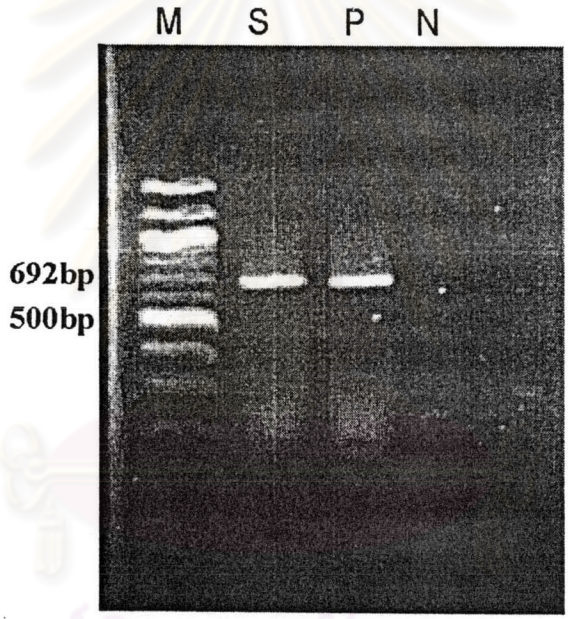
บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

หลังจากนำซีรั่มผู้ที่เป็นพาหะซึ่งให้ผลเป็นบวกโดยการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วพิ่มสายดีเอ็นเอในส่วน S gen ด้วยวิธี PCR โดยสกัดดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี จากผู้ป่วยที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบ HBsAg โดยวิธี ELISA นำผลผลิตที่มีขนาด 692 คู่เบส



รูปที่ 5 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 692 คู่เบสที่เตรียมไว้สำหรับทำการโคลนเพื่อเชื่อมต่อเข้าเวคเตอร์ pGEX

M คือ 100 คู่เบสดีเอ็นเอ Marker

S คือ ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการโคลน ได้จากดีเอ็นเอผู้ที่เป็นพาหะทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

P คือ Positive control ได้จากดีเอ็นเอผู้ที่เป็นพาหะให้ผลบวกตรวจสอบ HBV-DNA มาก่อน

N คือ Negative control ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างสำหรับควบคุมลบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลผลิตที่ได้นำมาเชื่อมโดยใช้เอนไซม์ ligase กับดีเอ็นเอเวคเตอร์ pGEX ซึ่งมีขนาด 4900 คู่เบส pGEXซึ่งมียีนที่สำคัญดังแสดงในแผนที่ของยีน

เวคเตอร์ pGEX ประกอบด้วยยีนต้านยาแอมพิซิลิน

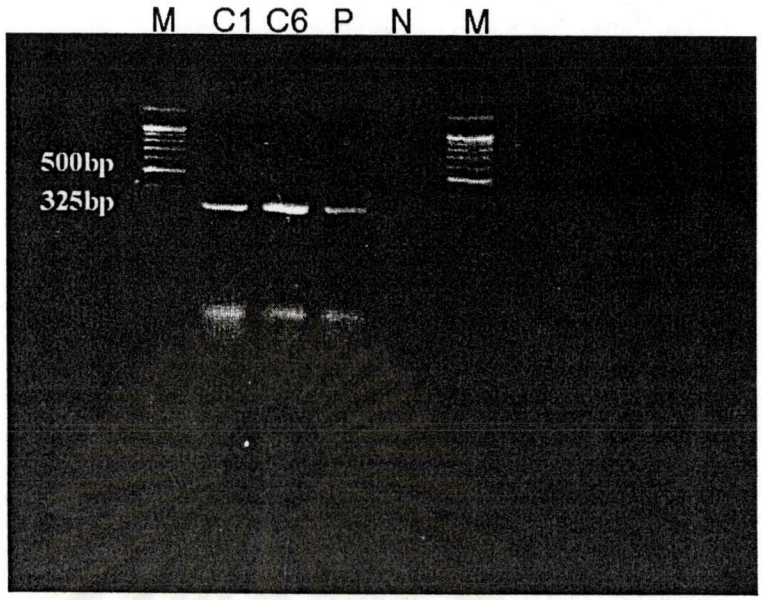
- laq I gene เป็นยีนที่เมื่อได้รับการกระตุ้นจาก Isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) จะสามารถเปลี่ยนสาร 5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-galactoside (X-gal) เกิดการนำไปใช้ในเซลจะเห็นว่าโคโลนีมีสีฟ้าได้ ส่วนโคโลนีที่ได้รับการฝากถ่ายยีนของไวรัสตับอักเสบ บี จะไม่สามารถย่อยสาร X-gal ได้โคโลนีจะมีสีขาว

ทำการฝากถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยวิธี Heat shock โดยกำหนดอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 45 วินาทีเสร็จแล้วแช่น้ำแข็งทันที หลังจากนั้นนำเชื้อมากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยาแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมซึ่งโคโลนีที่ได้ (ต้านยาแอมพิซิลิน) จะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาแอมพิซิลินและเป็นโคโลนีสีขาว หลังจากได้โคโลนีสีขาวนำโคโลนีที่ได้นำมาตรวจสอบต่อไปโดยทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มียาแอมพิซิลินความเข้มข้นเท่ากับใน LB agar คือ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2 . **ทำการคัดเลือกโคโลนี *E.coli* ที่มีส่วน** S gene

เนื่องจากเวคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองมียีนต้านยาแอมพิซิลิน จึงคัดเลือกโคโลนีลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีที่ได้มาแยกโครโมโซมของแบคทีเรียด้วยวิธี alkaline extraction แล้วนำมาตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี ส่วน S gene หรือไม่โดยวิธี nestedPCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งได้ผลผลิตขนาดตามที่คาดได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงผลการตรวจหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบ บี โดยใช้วิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ สำหรับไวรัสตับอักเสบ บีคือ FBSC และ R3 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะได้ ผลผลิตที่ได้มีขนาด 306 คู่เบส

M คือ 100 เบสคู่ดีเอ็นเอ Marker

C1 คือโคลนหมายเลข1ซึ่งให้ผลบวกเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี NestedPCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ใน HBV สำหรับการตรวจสอบโดยผลผลิตที่ได้มีขนาดตรงกับตัวควบคุมที่เป็นบวก

C6 คือโคลนหมายเลข6ซึ่งให้ผลบวกเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี NestedPCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ใน HBV สำหรับการตรวจสอบซึ่งผลผลิตที่ได้มีขนาดตรงกับตัวควบคุมที่เป็นบวก

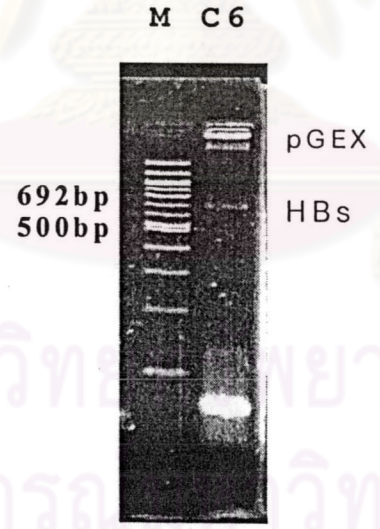
P คือตัวควบคุมที่เป็นบวกซึ่งเป็นซีรัมผู้ที่เป็นพาหะของโรคไวรัสตับอักเสบ บีเมื่อทำการเพิ่มจำนวนจะได้ผลผลิตที่มีขนาด 306 คู่เบส แยกแถบแบนดีเอ็นเอดีใน 2% agarose gel

Nคือ negative controlใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมไม่พบแถบแบนดีเอ็นเอในตัวควบคุมที่เป็นลบ

ผลที่ได้พบว่าโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าน่าจะมียีนต้านยาแอมพิซิลินและมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาแอมพิซิลิน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนและสามารถเห็นแถบดีเอ็นเอซึ่งคาดว่าน่าจะมีชิ้นส่วนของไวรัสตับอักเสบ บี อยู่ซึ่งแถบband ที่ได้มีขนาดตรงกับขนาดของตัวควบคุมที่เป็น บวกและไม่พบแถบband ในตัวควบคุมที่เป็นลบ

เมื่อได้โคโลนีที่มีไวรัสตับอักเสบ บี ที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบด้วยวิธี PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบในไวรัสตับอักเสบ บี นำมา ทำการตรวจสอบต่อไป

โดยนำดีเอ็นเอลูกผสมมาตัดด้วยrestriction enyzme คือ *Bam*H I และ *Not* I เนื่องจากผลผลิตที่โคลนเข้าไปมีตำแหน่งตัดของ restriction Enzyme ซึ่งผลผลิตที่ได้จะเท่ากับผลผลิตที่ใช้ในการโคลน นำผลผลิตที่ได้มาแยกบน 2% agarose gel แสดงรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงผลการใช้ restriction enzyme คือ *Not* I และ *Bam*H I ตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่ให้ผลบวกเมื่อทำการเพิ่มจำนวนเมื่อใช้ไพรเมอร์ HBV

M คือ100เบสคู่ดีเอ็นเอ marker

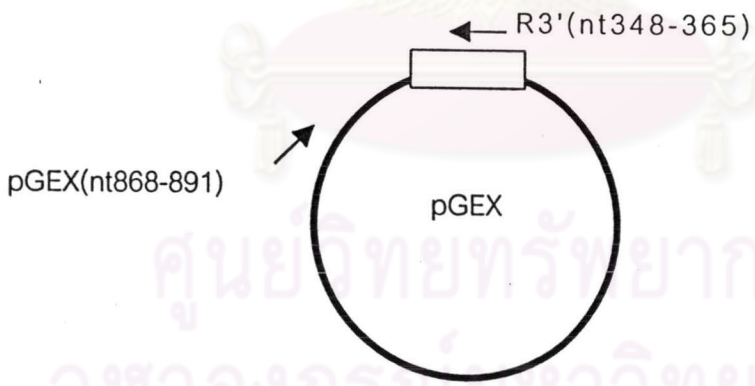
S คือดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกตัดด้วย restriction enzyme คือ *Not* I และ *Bam*H I ซึ่งผลผลิตที่ได้จะมีขนาด 692 คู่เบสและพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ ทำการแยบแถบ ดีเอ็นเอใน 1.5% agaroe gelเปรียบเทียบกับ 100 คู่เบสดีเอ็นเอ marker

สำหรับโคลนที่คาดว่าน่าจะมีดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี เมื่อตัดผลผลิตด้วยเอนไซม์ น่าจะได้ผลผลิตที่เท่ากับผลผลิตก่อนที่จะโคลน เมื่อได้โคลนที่คาดว่าน่าจะมีดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี แล้วได้ขนาดที่คาดไว้จึงได้นำโคลนที่ได้นำมาตรวจสอบต่อไปโดย

3.หาทิศทางของดีเอ็นเอลูกผสมที่โคลนได้ด้วยวิธี PCR

และเพื่อยืนยันทิศทางของยีน S ที่ฝากถ่ายสู แบคทีเรียทำการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่ 5' (pGEX5')อยู่ในส่วนของพลาสมิด pGEX (นิวคลีโอไทด์ลำดับที่868-891) และใช้ไพรเมอร์ 3' ในส่วนของไวรัสตับอักเสบ บี R3 (นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 365-348)

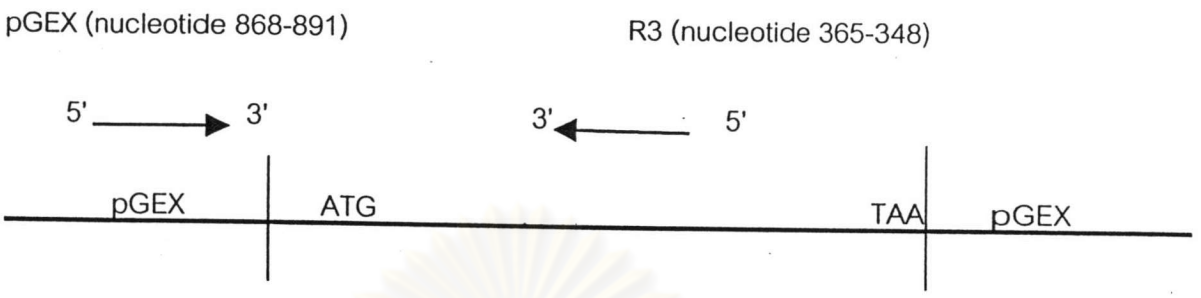
แสดงทิศทางไพรเมอร์ในรูปที่ 8



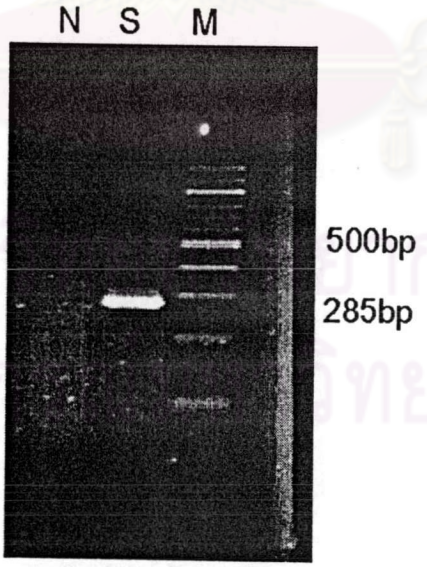
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแสดงรูปที่ 8 ทิศทางไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบทิศทาง HBs gene โดยที่ภายในเวคเตอร์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี

ไพรเมอร์ตำแหน่ง 5' อยู่ในเวคเตอร์ ส่วนไพรเมอร์ 3' อยู่ในส่วนของดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบ บีที่เชื่อมอยู่ในเวคเตอร์



เมื่อทำการเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอลูกผสมที่ทำการสกัดจากแบคทีเรียโดยวิธี alkaline extraction ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จะต้องเป็นส่วนที่มีทั้งพลาสมิดและชิ้นดีเอ็นเอจากไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งเป็นการยืนยันว่าดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บีได้โคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEX ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวน PCR แสดงใน (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 แสดงผลการตรวจสอบทิศทางของดีเอ็นเอลูกผสม เมื่อทำการตรวจสอบด้วยการเพิ่มสายดีเอ็นเอบริเวณจุดเชื่อมกันระหว่างดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบ บี และดีเอ็นเอของเวคเตอร์

N คือnegative control ซึ่งใช้พลาสมิดที่ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี ผลที่ได้จะไม่พบแถบดีเอ็นเอ

S คือดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดจาก *E.coli* แล้วทำการเพิ่มจำนวนบริเวณที่เชื่อมระหว่างดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บีและพลาสมิดเมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี PCR ทำให้สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอซึ่งผลผลิตที่ได้มีขนาด 285 คู่เบส ตามขนาดที่ต้องการ

M คือ 100 คู่เบสดีเอ็นเอ marker

เนื่องจากโคลนที่ได้จะต้องมีส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี อยู่ในพลาสมิด pGEX ซึ่งทำการเพิ่มจำนวนจะได้ผลผลิต แต่สำหรับ negative control ซึ่งใช้พลาสมิดที่ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนเห็นแถบ band ได้

ทำการยืนยันหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอลูกผสม จากผลผลิตที่เพิ่มจำนวนได้จะตรวจพบได้ทั้งส่วนที่เป็นพลาสมิดและส่วนของไวรัสตับอักเสบ บี หลังจากนำมาแยกบน 2% agarose electrophoresis gel แล้วได้ทำการตัดเจลเพื่อนำผลผลิตที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยอาศัยหลักการ PCR based cycle sequencing ของ ABI PRISM fluorescein Big Dye ddNTP Terminator ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้แสดงในรูปที่ 7 นำมาเปรียบเทียบกับการอ่านลำดับเบสใน ซีรั่มผู้ป่วยซึ่งจะเห็นส่วนของพลาสมิดและส่วนของไวรัสตับอักเสบ บี อยู่ในชิ้นส่วนเดียวกันแสดงผลว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี ได้โคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEX แล้ว ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบลำดับเบสกับ HBsAg DNA ในซีรั่มและ reference strain ซึ่งสรุปผลการทดลองที่ได้ดังนี้

1.1 โคลนนี้มี โคดอนเริ่ม และโคดอนหยุด คือ ATG และ TAA ตามลำดับ

1.2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับ S gene จากซีรั่มต้นแบบก่อนโคลนและ สายพันธุ์ *adr*

1.3 จากผลที่ได้ไม่มีนิวคลีโอไทด์ deletion หรือ insertion ในการหาลำดับเบสจากโคลนที่ได้ใน *E.coli* ได้ frame ที่ถูกต้องนับจาก ATG เริ่มต้น

1.4 เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกัน (homology) ระหว่าง HBV DNA subtype adr (ONO et al. 1983) และโคลนที่ได้จากพลาสมิด pGEX (ตารางที่ 1) พบว่ามีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันสูงมากถึง 99.12 % ในระดับนิวคลีโอไทด์ และ 98.24% ในระดับกรดอะมิโน สำหรับ "a" determinant คือตำแหน่งกรดอะมิโน 179 ถึง 202 มีความเหมือนกัน 100% ทั้งระดับนิวคลีโอไทด์และระดับกรดอะมิโนดังนั้นโคลนที่ได้จากการโคลนยีนส่วน S เข้าสู่พลาสมิด pGEX จึงมีความเหมาะสมในใช้ศึกษา การแสดงออกโปรตีน เนื่องจากมีรายงานว่าเมื่อเกิดการกลายพันธ์ในตำแหน่งของ "a" determinant นี้ทำให้ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันลดลงมีผลทำให้เด็กที่ได้รับวัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี ไม่สามารถป้องกันกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บีได้ โดยเกิดการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโน 200 เปลี่ยนจาก ไกลซีนเป็นอาร์จีนีน ซึ่งผลที่ได้จากโคลนในพลาสมิด pGEX ไม่มีการกลายพันธ์ เกิดขึ้นดังกล่าว ผลที่ได้แสดงตาราง

ตารางเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอโทด์

ตารางที่ 3 ส่วน S gene (% homology nucleotide 681 base)

	Clone 9	sample	Adr(D000630)
Clone 9	100%	99.4%	94.1%
Sample	-	100%	95%
Adr(D000630)	-	-	100%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ส่วน "a"epitope(% homology nucleotide 72 base)

	Clone 9	sample	Adr(D000630)
Clone 9	100%	100%	98.8%
sample	-	100%	98.8%
Adr(D000630)	-	-	100%

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน

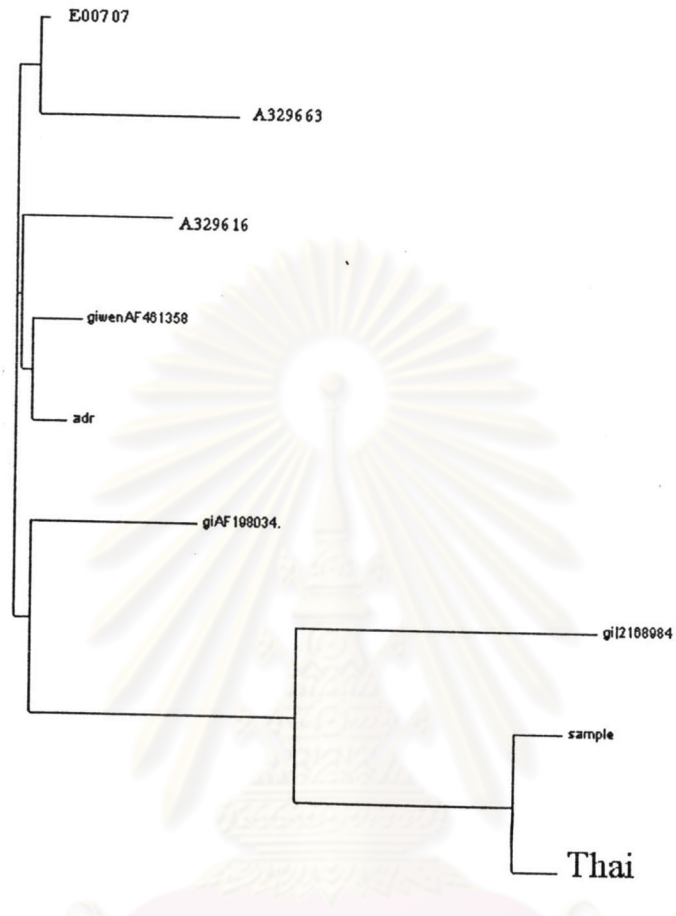
ส่วน S gene(% homology amino acid 226 residue)

	Clone 9	sample	Adr(D000630)
Clone 9	100%	98.2%	90%
sample	-	100%	90%
Adr(D000630)	-	-	100%

ตารางที่ 6 ส่วน "a" epitope(% homology amino acid 24 residue)

	Clone 9	sample	Adr(D000630)
Clone 9	100%	100%	96.1%
sample	-	100%	96.1%
Adr(D000630)	-	-	100%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



HBV สายพันธุ์ adr	ประเทศ
Clone ใน pGEX	Thailand
Clone ใน pBIS	Thailand
adr	Japan
E00707	Japan
AF2168984	Japan
A329616	Japan
A329663	Japan
AF461358	USA
198034	USA

รูปที่ 10 แสดงรูป Phylogenic tree จากโคลนที่ได้ซึ่งเป็นสายพันธุ์ adr ของคนไทยกับ HBV จากต่างประเทศ พบว่ามีความแตกต่างกันถึงจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

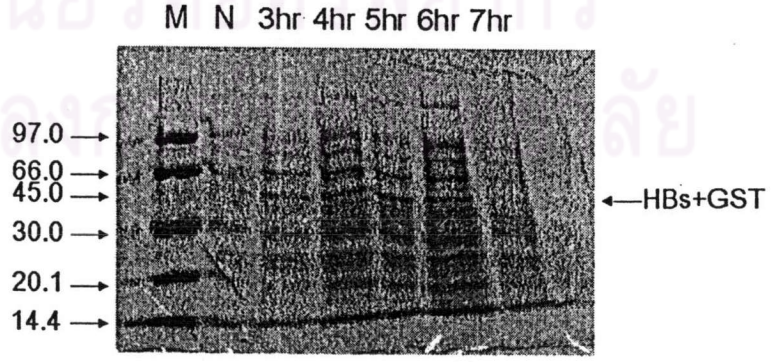
การแสดงออก (Expression) ของ S gene ในระบบ *E.coli*

การทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอลูกผสมจากพลาสมิด pGEX(phamacia,USA) ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่เหนี่ยวนำการแสดงออก ประกอบด้วย Tac promoter ซึ่งทำหน้าที่ลอกแบบดีเอ็นเอให้เป็นอาร์เอ็นเอและทำหน้าที่ได้ดีใน *E.coli* และมียีนต้านยาแอมพิซิลิน โคลนที่ได้สามารถต้านยาแอมพิซิลินได้ทำการเพาะเลี้ยง *E.coli* ได้นำ *E.coli* โคลนมา ตรวจสอบว่าสามารถสร้างโปรตีนชนิดผิวของไวรัสตับอักเสบ บี (HBsAg) ได้หรือไม่

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน S

1. **ทำการหาระยะเวลาที่มีการแสดงออกของ S gene**

โดยนำเซลแบคทีเรียที่ได้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาทำ SDS PAGE เปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่มีเฉพาะพลาสมิดเพื่อเป็นตัวควบคุม โดยนำโคลน *E.coli* ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาแอมพิซิลินเมื่อตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ OD 600 ได้ค่า0.5 แล้วกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG แล้วเก็บเซลล์ที่ 4 ชั่งโมง,5 ชั่งโมง,6 ชั่งโมงและ *E.coli* ที่มีเฉพาะพลาสมิดกระตุ้นด้วย IPTG เพื่อเป็นตัวควบคุมที่ไม่มียีนของไวรัสตับอักเสบ บี หลังจากทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicate เป็นเวลา 10 วินาทีซึ่งจะต้องแช่น้ำแข็งแล้วปั่นแยกตะกอนแล้วนำส่วนใสที่ได้นำมาตรวจสอบด้วยวิธี SDS PAGE ผลที่ได้พบว่า โปรตีนได้ในชั่วโมงที่ 4,5 และ 6 จะเห็นมีความชัดมากกว่าชั่วโมงอื่น หลังจากที่ได้กระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย IPTG ในชั่วโมงที่ 3 แถบband จะจางมากและไม่พบแถบband ใน *E.coli* ที่มีเฉพาะพลาสมิดซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงSDSPAGEแสดงผลการหาระยะเวลาที่มีการแสดงออกของโปรตีนของ HBsAg ซึ่งตรวจสอบด้วยวิธี SDSPAGE โดยพบว่าแบนที่ต่างจาก negative น่าจะโปรตีนของ HBsAg ซึ่งตรงกับตำแหน่งที่แสดง

M คือMarker protien

N คือ *E.coli* ที่ไม่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บีมีเฉพาะพลาสมิดเพื่อเป็นตัวควบคุมที่เป็นลบ

3hrคือ โคลนที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บีกระตุ้นด้วยIPTG 3ชั่วโมง

4hr คือ โคลนที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บีกระตุ้นด้วยIPTG 4ชั่วโมง

5hr คือ โคลนที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บีกระตุ้นด้วยIPTG 5ชั่วโมง

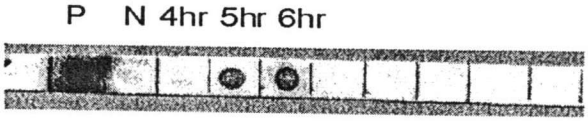
6 hrคือ โคลนที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บีกระตุ้นด้วยIPTG 6ชั่วโมง

7hr คือ โคลนที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บีกระตุ้นด้วยIPTG 7ชั่วโมง

ผลการแยกโปรตีนด้วย SDS PAGE แล้วทำการย้อมโปรตีนด้วย coomassia blue ทำให้เห็นแถบแบนของโปรตีนที่แตกต่างระหว่างเซลแบคทีเรียที่มีเฉพาะพลาสมิดกับเซลของแบคทีเรียที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งแถบแบนจะเห็นแถบแบนได้ในชั่วโมงที่ 4,5,6 แต่จะไม่เห็นแถบแบนในชั่วโมงที่ 3และ 7 ดังนั้นเป็นการหาระยะเวลาที่น่าจะมีการสร้างโปรตีนจึงได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนที่ได้ต่อไป

2. **ตรวจสอบคุณสมบัติโปรตีนด้วยวิธี** Dot blot

หลังจากตรวจสอบอย่างคร่าวๆว่ามีการสร้างโปรตีน ได้ทำการตรวจสอบต่อไปถึงคุณสมบัติโปรตีนที่ได้ เนื่องจากโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนซึ่งสามารถจับกับแอนติบอดีได้ ดังนั้นโปรตีนที่ได้จากการโคลนควรมีคุณสมบัติที่สามารถจับกับแอนติบอดีได้เหมือนกัน ได้นำการตรวจสอบโดยนำเซลที่หาระยะเวลาที่มีการสร้างโปรตีนแล้วนำทำ Dot blot ใช้ซีรัมผู้ที่ [illegible] เป็น negative control แสดงผลการทดลองที่ได้



รูปที่ 11 แสดงผลของ dot blotte จากโคลนที่ 9 ในพลาสมิด pGEX

Lane1 จากพลาสม่าของผู้ที่เป็นพาหะให้ผลบวกของ HBsAg ด้วยวิธี ELISA ให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี

Lane2 negative contral จากพลาสมิด pGEXที่ไม่มีดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบ บีจะไม่มีการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีเนื่องจากไม่มีการสร้างโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี

Lane3 ดีเอ็นเอลูกผสมที่กระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG ชั่วโมงที่ 4

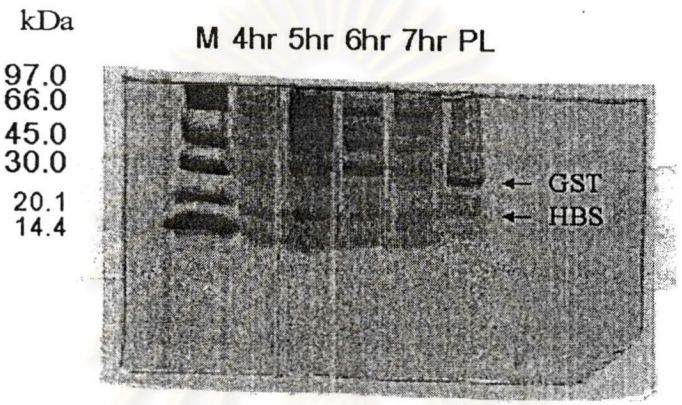
Lane4 ดีเอ็นเอลูกผสมที่กระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG ชั่วโมงที่5

Lane5 ดีเอ็นเอลูกผสมที่กระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTGชั่วโมงที่ 6

ผลที่ได้พบว่าโปรตีนที่ได้จะให้ผลบวกชัดเจนในชั่วโมงที่ 5,6

- ใน แถวที่เป็น negative control จะเห็นเป็นสีขาวซึ่งจะไม่มีการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีเนื่องจากไม่มีการสร้างของโปรตีน
- ในแถวที่เป็น positive control ซึ่งเป็นซีรั่มของผู้ที่เป็นพาหะและให้ผลบวกในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA จะให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี dot blot เห็นเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีและเกิดการย่อยของ enzyme และ substrate
- ดังเช่นแถวที่ 5 และ6 ซึ่งจะให้ผลบวกที่ชัดกว่าแถวอื่น โดยที่ชั่วโมงที่ 4 เกิดปฏิกิริยาน้อยมาก

หลังจากตรวจสอบคุณสมบัติโปรตีนด้วยวิธี dot blot แล้วทราบว่าโปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโปรตีน ผิวของไวรัสตับอักเสบ บี แล้ว เนื่องจากโปรตีนที่โคลนได้เชื่อมอยู่กับโปรตีนของเวคเตอร์ได้ทำการตรวจสอบต่อไปโดยการตัดเอาโปรตีนเชื่อมออกไปโดยใช้ Thrombin protease นำโปรตีนที่ได้มา ทำ SDS PAGE โดยเปรียบเทียบกับขนาดที่ได้กับ positive control ที่ได้จากซีรัมผู้ที่เป็นพาหะและให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธี ELISA ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 12



ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 12 ผล SDS PAGE หลังจากตัดโปรตีนเชื่อมออกแล้ว

M โปรตีน marker

4hr เซลที่ได้รับการฝากถ่ายยีนไวรัสตับอักเสบ บี แล้วถูกกระตุ้นการสร้างโปรตีนแล้วทำการเก็บเซลที่เวลา 4 ชั่วโมง

5hr เซลที่ได้รับการฝากถ่ายยีนไวรัสตับอักเสบ บี แล้วถูกกระตุ้นการสร้างโปรตีนแล้วทำการเก็บเซลที่เวลา 5 ชั่วโมง เซลที่ได้รับการฝากถ่ายยีนไวรัสตับอักเสบ บี แล้วถูกกระตุ้นการสร้างโปรตีนแล้วทำการเก็บเซลที่เวลา 4 ชั่วโมง

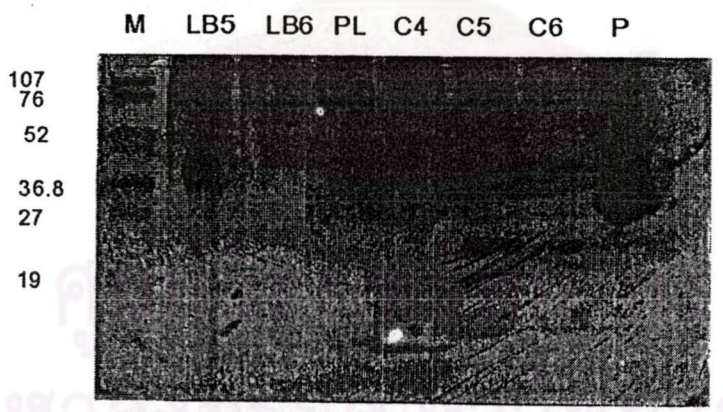
6hr เซลที่ได้รับการฝากถ่ายยีนไวรัสตับอักเสบ บี แล้วถูกกระตุ้นการสร้างโปรตีนแล้วทำการเก็บเซลที่เวลา 6 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7hr เซลที่ได้รับการฝากถ่ายยีนไวรัสตับอักเสบ บีแล้วถูกกระตุ้นการสร้างโปรตีนแล้วทำการเก็บเซลที่เวลา 7 ชั่วโมง

รูปแสดงผลการตรวจสอบโปรตีนที่ได้เมื่อตัดโปรตีนเชื่อมออกโดยใช้ thrombin protease ซึ่งดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการฝากถ่ายยีนของไวรัสตับอักเสบ บี แล้วกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการเก็บเซลล์ที่เวลา 4,5,6,7 ชั่วโมงแล้วนำมาแยกโปรตีนบน SDS PAGE ผลที่ได้จะปรากฏว่าพบแถบแบนอยู่ประมาณ 22 กิโลเดลตัน
เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมงซึ่งพบว่าเกิดแถบแบนให้เห็นขนาดประมาณ 22 กิโลเดลตัน ซึ่งผลได้เช่นเดียวกับในชั่วโมงที่ 5 และที่ 6

ทำการยืนยันโปรตีนที่ได้จากโคลนที่ได้รับการฝากถ่ายยีนของไวรัสตับอักเสบ บี มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ HBsAg ที่ได้จากผู้ที่ป่วยพาหะ เมื่อตัดโปรตีนเชื่อมออกด้วย thrombin protiease แล้วโดยทำการทดสอบด้วยวิธี western blot เพราะสามารถตรวจสอบคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนสามารถจับกับแอนติบอดีได้และทราบถึงขนาดที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนที่ได้ว่ามีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโปรตีนที่ได้จากซีรั่มของผู้ที่เป็นพาหะและให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เนื่องจากโปรตีนที่โคลนมีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนทำการตรวจสอบด้วยวิธี western blot

M คือ โปรตีน marker

LB4 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกจาก ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG เพื่อตรวจสอบว่ามีโปรตีนผิวได้ขับออกมาเซลบ้างหรือไม่ ผลที่ได้พบว่าไม่พบโปรตีนที่ถูกขับออกมา

LE5 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกจาก ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG เพื่อตรวจสอบว่ามีโปรตีนผิวได้ขับออกมาเซลบ้างหรือไม่ ผลที่ได้พบว่าไม่พบโปรตีนที่ถูกขับออกมา

C4 คือ ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวและกระต้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG และเลี้ยงต่อไป 4 ชั่วโมงแล้วทำการตรวจสอบ พบว่ามีแถบแบนที่จางมาก

C5 คือ ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวและกระต้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG และเลี้ยงต่อไป 5 ชั่วโมงแล้วทำการตรวจสอบ พบว่ามีแถบแบนเห็นชัดและมีขนาดประมาณ 24 กิโลเดลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดกับตัวควบคุมที่เป็นบวกซึ่งได้จากซีรั่มของผู้ที่เป็นพาหะ

C6 คือ ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวและกระต้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG และเลี้ยงต่อไป 6 ชั่วโมงแล้วทำการตรวจสอบ พบว่ามีแถบแบนเห็นชัดและมีขนาดประมาณ 24 กิโลเดลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดกับตัวควบคุมที่เป็นบวกซึ่งได้จากซีรั่มของผู้ที่เป็นพาหะ

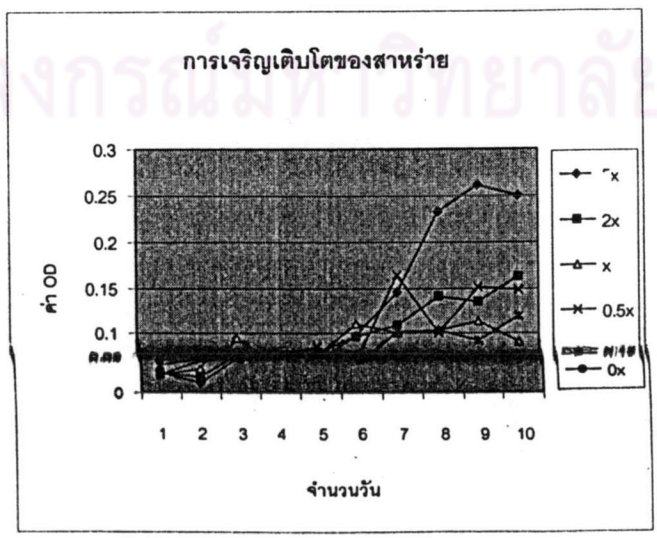
การทดสอบคุณสมบัติโปรตีนที่ได้จากการฝากถ่ายยีนอีกวิธีหนึ่งคือการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ซึ่งตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนผิวที่ได้โดยสามารถตรวจจับได้กับแอนติบอดีของโปรตีนผิวแล้วเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์และ substrate แล้ววัดการดูดกลืนของแสง ผลที่ได้จากการนำเซล *E.coli* ที่ได้รับการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวจากไวรัสตับอักเสบ บี และกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG เมื่อทำให้เซลแตกแล้ว นำมาตรวจสอบด้วยวิธี ELISA (AUSZYME) ผลเป็นลบ

ผลการวิเคราะห์ในระบบสาหร่าย *dunaliela sp*

เมื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella sp.* โดยเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหาร 5x,2x,x,0.5x,0.1x และเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร J1 ซึ่งมีการศึกษาแล้วว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดี แล้วทำการวัดค่า OD ที่ 600 ผลที่ได้แสดงในตาราง

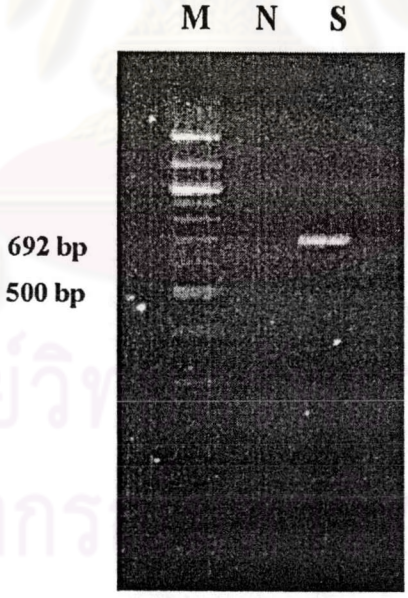
2x	5x	x	0.5x	0.1x	0x
0.025993	0.026548	0.023001	0.0233	0.034137	0.041559
0.013229	0.020223	0.029656	0.040588	0.042888	0.04533
0.046524	0.050151	0.09425	0.04852	0.049124	0.041351
0.076643	0.061227	0.066327	0.07427	0.060212	0.049024
0.067786	0.078342	0.074908	0.084532	0.061606	0.062031
0.096941	0.096255	0.110363	0.069347	0.062605	0.03956
0.144373	0.108997	0.100027	0.16369	0.101937	0.05433
0.23217	0.140183	0.103271	0.099996	0.103346	0.055825
0.260973	0.135313	0.112759	0.150984	0.09196	0.062952
0.250173	0.161913	0.089891	0.147173	0.119589	0.069083

ตารางที่ 7 แสดงผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ทำการศึกษา แล้วแสดงผลเป็นกราฟซึ่งผลที่ได้พบว่าสูตรอาหารที่สาหร่าย *Dunaliella sp.* เจริญได้ดีที่อาหารเลี้ยง 5x,2x



กราฟที่ 1 แสดงผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ทำการศึกษาโดยมีความเข้มข้นต่างๆ พบว่าอาหารเลี้ยงสาหร่าย 2x,5x เจริญเติบโตได้ดี

เมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายแล้วทำการฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่สาหร่ายโดยนำซีรั่มผู้ที่เป็นพาหะซึ่งให้ผลเป็นบวกโดยการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วพิ่มสายดีเอ็นเอในส่วน S genโดยรอบแรกใช้ไพรเมอร์ f1 และ R6 รอบสองใช้ไพรเมอร์ FBSC และ BSC ด้วยวิธี nestedPCR โดยสกัดดีเอ็นเอของไวรัสตับดักเสบ บีจากผู้ป่วยที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบ HBsAg โดยวิธี ELISA



รูปที่ 14 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 692 คู่เบสของยีนโปรตีนผิวจากไวรัสตับอักเสบ บี ที่เตรียมไว้สำหรับ [illegible]

M คือ 100 คู่เบสดีเอ็นเอ Marker

S คือ ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการโคลน ได้จากดีเอ็นเอผู้ที่เป็นพาหะทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

P คือ Positive control ได้จากดีเอ็นเอผู้ที่เป็นพาหะให้ผลบวกตรวจสอบ HBV-DNA มาก่อนซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกับที่ใช้ในการโคลน *E.coli*

N คือ Negative control ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างสำหรับควบคุมลบ

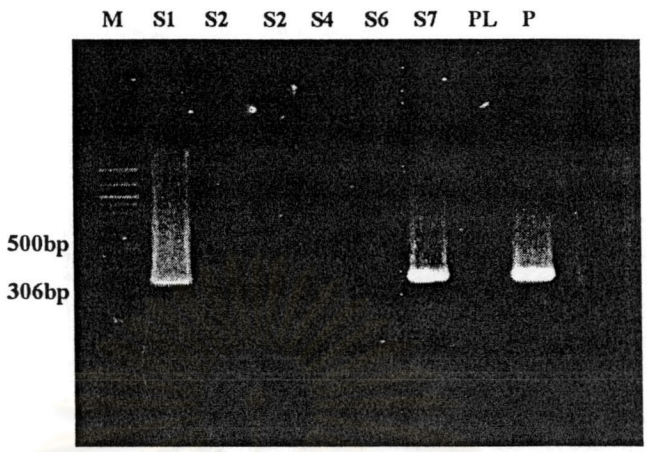
ผลผลิตที่ได้นำมาเชื่อมโดยใช้เอนไซม์ ligase กับดีเอ็นเอเวคเตอร์ pBIS ซึ่งมียีนที่สำคัญ

- เวคเตอร์ pBIS ประกอบด้วยยีนต้านยา kanamycin
- origin of replication เป็นส่วนเริ่มต้นในการถอดรหัส
- 35s pomoter เป็นโปรโมเตอร์ที่เหมาะในการแสดงออกในพืช

ก่อนที่จะทำการฝากถ่ายเข้าสู่ระบบสาหร่ายต้องทำการเพิ่มจำนวนในระบบแบคทีเรียก่อนโดยทำการฝากถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี Heat shock โดยกำหนดอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 45 วินาทีเสร็จแล้วแช่น้ำแข็งทันที หลังจากนั้นนำเชื้อมากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยา kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมซึ่งโคโลนีที่ได้ (ต้านยาkanamycin) จะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาkanamycin นำโคโลนีเดี่ยวๆ เลี้ยงเชื้อต่อไปที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มียา kanamycin ความเข้มข้นเท่ากับใน LB agar คือ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีส่วน S gene

2 . ทำการคัดเลือกโคโลนี *E.coli* ที่มีส่วน S gene

เนื่องจากเวคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองมียีนต้านยา kanamycin จึงคัดเลือกโคโลนีลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีที่ได้มาแยกโครโมโซมของแบคทีเรียด้วยวิธี alkaline extraction แล้วนำมาตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี ส่วน S gene หรือไม่โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FBSC และ R3 สำหรับตรวจสอบไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งได้ผลผลิตขนาดตามที่คาดได้



รูปที่ 15 แสดงผลการตรวจหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบ บี โดยใช้วิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ สำหรับไวรัสตับอักเสบ บีคือ FBSC และ R3 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะได้ ผลผลิตที่ได้มีขนาด 306 คู่เบส

M คือ 100 เบสคู่ดีเอ็นเอ Marker

S1 คือโคลนหมายเลข1ซึ่งให้ผลบวกเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ใน HBV สำหรับการตรวจสอบโดยผลผลิตที่ได้มีขนาดตรงกับตัวควบคุมที่เป็นบวก

S2 คือโคลนหมายเลข 2 ซึ่งให้ผลลบเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ใน HBV สำหรับการตรวจสอบซึ่งไม่มีการฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่พลาสมิด

S3 คือโคลนหมายเลข3 ซึ่งให้ผลลบเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ใน HBV สำหรับการตรวจสอบซึ่งไม่มีการฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่พลาสมิด

S4 คือโคลนหมายเลข4 ซึ่งให้ผลลบเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ใน HBV สำหรับการตรวจสอบซึ่งไม่มีการฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่พลาสมิด

S5 คือโคลนหมายเลข5 ซึ่งให้ผลลบเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ใน HBV สำหรับการตรวจสอบซึ่งไม่มีการฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่พลาสมิด

S6 คือโคลนหมายเลข6 ซึ่งให้ผลลบเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ใน HBV สำหรับการตรวจสอบซึ่งไม่มีการฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่พลาสมิด

S7 คือโคลนหมายเลข7ซึ่งให้ผลบวกเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ใน HBV สำหรับการตรวจสอบโดยผลผลิตที่ได้มีขนาดตรงกับตัวควบคุมที่เป็นบวก

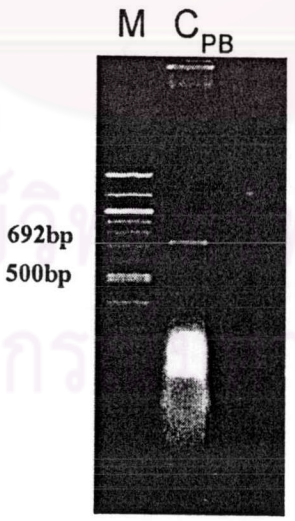
Nคือ negative controlใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมไม่พบแถบแบนดีเอ็นเอในตัวควบคุมที่เป็นลบ

P คือตัวควบคุมที่เป็นบวกซึ่งเป็นซีรัมผู้ที่เป็นพาหะของโรคไวรัสตับอักเสบ บีเมื่อทำการเพิ่มจำนวนจะได้ผลผลิตที่มีขนาด 306 คู่เบส แยกแถบแบนดีเอ็นเอดีใน 2% agarose gel

ผลที่ได้พบว่าโคโลนีซึ่งคาดว่าน่าจะมียีนต้านยา kanamycin และมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา kanamycin พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนและสามารถเห็นแถบดีเอ็นเอซึ่งคาดว่าน่าจะมีชิ้นส่วนของไวรัสตับอักเสบ บี อยู่ซึ่งแถบband ที่ได้มีขนาดตรงกับขนาดของตัวควบคุมที่เป็น บวกและไม่พบแถบ band ในตัวควบคุมที่เป็นลบ

เมื่อได้โคโลนีที่มีไวรัสตับอักเสบ บี ที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบด้วยวิธี PCR เมื่อทำการเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบในไวรัสตับอักเสบ บี นำมา ทำการตรวจสอบต่อไป

โดยนำดีเอ็นเอลูกผสมมาตัดด้วย restriction enyzme คือ *BamH* I เนื่องจากผลผลิตที่โคลนเข้าไปมีตำแหน่งตัดของ restriction enzyme ซึ่งผลผลิตที่ได้จะเท่ากับผลผลิตที่ใช้ในการโคลน นำผลผลิตที่ได้มาแยกบน 2% agarose gel แสดงรูปที่ 16



รูปที่ 16 แสดงผลการใช้ restriction enzyme คือ *Bam*H Iตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่ให้ผลบวกเมื่อทำการเพิ่มจำนวนเมื่อใช้ไพรเมอร์ HBV

M คือ100เบสคู่ดีเอ็นเอmarker

S คือดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกตัดด้วย restriction enzymeคือ *Bam*H ซึ่งผลผลิตที่ได้จะมีขนาด 692 คู่เบสและพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ ทำการแยบแถบ ดีเอ็นเอใน 1.5% agaroe gel เปรียบเทียบกับ 100 คู่เบสดีเอ็นเอ marker

สำหรับโคลนที่คาดว่าน่าจะมีดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี เมื่อตัดผลผลิตด้วยเอนไซม์ น่าจะได้ผลผลิตที่เท่ากับผลผลิตก่อนที่จะโคลน เมื่อได้โคลนที่คาดว่าน่าจะมีดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี แล้วได้ขนาดที่คาดไว้จึงได้นำโคลนที่ได้นำมาตรวจสอบต่อไปโดย

ทำการยืนยันหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอลูกผสมจากผลผลิตที่เพิ่มจำนวนได้จะตรวจพบได้ทั้งส่วนที่เป็นพลาสมิดและส่วนของไวรัสตับอักเสบ บี หลังจาก run electrophoresis gel แล้วได้ทำการตัดเจลเพื่อนำผลผลิตที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยอาศัยหลักการ PCR based cycle sequencing ของ ABI PRISM fluorescein Big Dye ddNTP Terminator ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้แสดงในรูปที่ 7 นำมาเปรียบเทียบกับการอ่านลำดับเบสใน ซีรั่มผู้ป่วยซึ่งจะเห็นส่วนของพลาสมิดและส่วนของไวรัสตับอักเสบ บี อยู่ในชิ้นส่วนเดียวกันแสดงผลว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี ได้โคลนเข้าสู่พลาสมิด pBISแล้ว ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบลำดับเบสกับ HBs DNA ในซีรั่มและ reference strain ซึ่งสรุปผลการทดลองที่ได้ดังนี้

1.1 โคลนนี้มี codon เริ่ม และโคดอนหยุด คือ ATG และ TAA ตามลำดับ

1.2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับ S gene จากซีรั่มต้นแบบก่อนโคลนและสายพันธุ์ adr

1.3 จากผลที่ได้ไม่มีนิวคลีโอไทด์ deletion หรือ insertion ในการหาลำดับเบสจากโคลนที่ได้ใน *E.coli* ได้ frame ที่ถูกต้องนับจาก ATG เริ่มต้น

1.4 เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกัน (homology) ระหว่าง HBV DNA subtype adr (ONO et al. 1983) และโคลนที่ได้จากพลาสมิด pBIS พบว่ามีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันสูงมากถึง 99.12 % ในระดับนิวคลีโอไทด์ และ 98.24% ในระดับกรดอะมิโน สำหรับ "a" determinant คือตำแหน่งกรดอะมิโน 179 ถึง 202 มีความเหมือนกัน 100%ทั้งระดับนิวคลีโอไทด์และระดับกรดอะมิโนดังนั้นโคลนที่ได้จากการโคลนยีนส่วน S เข้าสู่พลาสมิด pBIS จึงมีความเหมาะสมในใช้ศึกษา การแสดงออกโปรตีน เนื่องจากมีรายงานว่า เมื่อเกิดการกลายพันธ์ในตำแหน่งของ "a" determinant นี้ทำให้ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันลดลงมีผลทำให้เด็กที่ได้รับวัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี ไม่

สามารถป้องกันกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บีได้ โดยเกิดการกลายพันธ์ที่กรดอะมิโน 200 เปลี่ยนจาก ไกลซีนเป็นอาร์จีนีน ซึ่งผลที่ได้จากโคลนในพลาสมิด pBIS ไม่มีการกลายพันธ์ เกิดขึ้นดังกล่าว

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบความเหมือน (%homology) ในลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน S gene (681คู่เบส)

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ตำแหน่ง	ความยาว
	Clone *E.coli*	HBV sample	HBV (D000630)
Clone pBCIP	(F1) 5' GGAGCGGGAGCATTCGGGCCA 3'	(NT3022-3042)	21
	99.7%	98.8%	94.7%
	(R6) 5' GGCGAGAAAGTGAAAGCCTG3'	(NT1103-1083)	20
	(PBSC) 5'ATGGATGGAGAACATCACATCAGGATT3'	(NT151-176)	25
	(BSC) 5'CCGGTCCTTAAATGTGTACCCAAAGACACCCG3'	(NT850-816)	32

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบความเหมือน (%homology) ในลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน S determinant (72 คู่เบส)

	Clone *E.coli*	HBV sample	HBV (D000630)
Clone Pbis	100%	100%	97%

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบความเหมือน (%homology) ในลำดับกรดอะมิโนส่วน S gene (226ตัว)

	Clone *E.coli*	HBV sample	HBV (D000630)
Clone Pbis	100%	100%	96%

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบความเหมือน (%homology) ในลำดับกรดอะมิโนส่วน S determinant (24ตัว)

	Clone *E.coli*	HBV sample	HBV (D000630)
Clone pBCIP	100%	100%	95.8%

ทำการเพิ่มจำนวนสาหร่าย *Dunaliela* ในอาหารที่เหมาะสม เช่น agar

ขั้นตอนในการฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่าย *Dunaliela sp.*

เนื่องจากสาหร่าย dunaliela เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลเดียวมีขนาดประมาณ 10-20 ไมโครเมตร ไม่มีผนังเซล มีเพียงเยื่อหุ้มบางๆ ซึ่งวิธีการที่จะฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบ บี จะใช้วิธีการ Electroporation คือ การผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เซลเพื่อผลักดันให้เซลสาหร่ายรับดีเอ็นเอลูกผสมวิธีการ

1. **เตรียมดีเอ็นเอลูกผสม** โดยทำการสกัดดีเอ็นเอลูกผสมจากเซลของ *E.coli* ด้วยวิธีการ alkaline Extraction แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยแยกโปรตีนใช้ phenol-chloroform แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอลูกผสมด้วย Isopropanolและ ammonium acetate แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ทำให้แห้งแล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำปราศจากเชื้อ

การฝากถ่ายยีนเข้าสู่พืชทำได้หลายวิธีในการเลือกวิธีที่จะทำนั้นขึ้นอยู่กับ สาหร่ายที่ใช้ในการทำการทดลองเป็นเซลเดียวและไม่มีพนังเซลจึงใช้วิธีการฝากถ่ายยีนด้วย