การโคลนยีน *HBs* และศึกษาการแสดงออกในระบบ *E.coli* และพัฒนาสู่ระบบสาหร่าย

นางสาวพจชนาถ จันทรัศมี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-17-1321-5
สิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING *HBs* GENE, EXPRESSION IN *E.COLI* SYSTEM AND DEVELOP TO UNICELLULAR ALGAE SYSTEM

Miss Pojchanad Jantaradsamee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Science

Program of Medical Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-1321-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนยีน HBs และการศึกษาการแสดงออกในระบบ *E.coli* และพัฒนาสู่ระบบสาหร่าย
โดย	นางสาวพจชนาถ จันทรัศมี
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

..... กรรมการ

(อาจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวพจชนาถ จันทรัศมี: การโคลยีน HBs และการศึกษาการแสดงออกในระบบ *E.coli.* และพัฒนาสู่ระบบสาหร่าย (Cloning of HBs gene, expression in *E.coli* system and Develop to Unicellular Algae) อ. ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 82 หน้า. ISBN 974-17-1321-5.

ไวรัสตับอักเสบ บี (HBV) เป็นไวรัสที่มีความสำคัญทำให้เกิดโรคตับอักเสบเฉียบพลัน เรื้อรัง หรือตับแข็ง และเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับ ไวรัสตับอักเสบ บี สามารถป้องกันได้ด้วยวัคซีนซึ่งในปัจจุบันผลิตด้วย วิธีการ recombinant DNA ในการศึกษานี้ เป็นการผลิตแอนติเจน DNA recombinant ด้วยระบบ *E.coli* และศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการฝากถ่ายยีนเข้าสู่ระบบสาหร่าย *Dunaliella sp* S gene สำหรับการโคลนส่วน S gene เข้าใน *E.coli* เราใช้ส่วนของยีนที่มีตำแหน่ง restriction enzyme *Bam* HI, *Not* I เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากไวรัสตับอักเสบ บี ใน pGEX ที่มี gene ต้าน amplicillin แล้วถ่ายเข้าสู่ *E.coli* ด้วยวิธี heat shock การตรวจสอบคัดเลือกโคลนที่ได้ ว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ HBsAg gene โดยทำ PCR ใช้ไพรเมอร์ในส่วนของ S gene ตรวจสอบ HBV ซึ่งให้ผลเป็นบวก และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้ เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ได้ก่อนโคลน พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 99.4% และเมื่อเปรียบเทียบกับ HBV สายพันธ์ adr (Ascession No. D000630) มีความเหมือนกัน 94.1 % เมื่อเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ส่วน "a" derterminant จากโคลนกับตัวอย่างก่อนโคลนมีความเหมือนกัน 100% และเมื่อเปรียบเทียบกับ HBV สายพันธ์ adr มีความเหมือนกัน 98.8%เปรียบเทียบกับตัวอย่างก่อนที่จะโคลนพบว่ามีกรดอะมิโนเหมือนกัน 98.2% และเมื่อเปรียบเทียบกับ HBV สายพันธ์ adr มีความเหมือนกัน 90 % ในการเปรียบเทียบกรดอะมิโนตรงส่วน "a" derterminant จากโคลนที่ได้กับตัวอย่างก่อนที่จะโคลนมีความเหมือนกัน 100% และเมื่อเปรียบเทียบกับ HBV สายพันธ์ adr มีความเหมือนกัน 96.1 % การศึกษาหาระยะเวลาที่มีการแสดงออกของโปรตีนผิว พบว่าระยะเวลา 5และ6 ชั่วโมงหลังจากที่กระตุ้นด้วย IPTG จะมีการสร้างโปรตีนแสดงออกมากที่สุด เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติโปรตีนด้วยวิธี Dot Blot และวิธี Western Blot พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้จากโคลนมีคุณลักษณะจับกับแอนติบอดีได้และมีขนาดเท่ากับโปรตีน HBsAg นอกจากนี้ได้ทำการหาความเป็นไปได้ในการฝากถ่ายยีน S ไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่สาหร่าย *Dunaliella sp* โดยฝากถ่ายเข้าสู่ *E.coli* ก่อนเพื่อเพิ่มจำนวน recombinant DNA ใน vector ซึ่งมีส่วน HBs gene อยู่กับ pBISB เพื่อใช้ในระบบสาหร่ายด้วยวิธี heat shock ทำการตรวจสอบโคลนที่ได้ว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ HBV โดยการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ HBV ให้ผลเป็นบวก และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้ เปรียบเทียบกับตัวอย่างก่อนที่จะโคลนพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 98.2% และเมื่อเปรียบเทียบกับ HBV สายพันธ์ adr มีความเหมือนกัน 94.7 % เมื่อเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ตรงส่วน "a" derterminant จากโคลนที่กับตัวอย่างก่อนที่จะโคลนมีความเหมือนกัน 100% และเมื่อเปรียบเทียบกับ HBV สายพันธ์ adr มีความเหมือนกัน 97.1 % และเมื่อเปรียบเทียบ amino acid จากโคลนที่กับตัวอย่างก่อนที่จะโคลนมีความเหมือนกัน 97% และเมื่อเปรียบเทียบกับ HBV สายพันธ์ adr มีความเหมือนกัน 90 % เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนตรงส่วน "a" derterminant จากโคลนที่ได้กับตัวอย่างก่อนที่จะโคลนมีความเหมือนกัน 100% และเมื่อเปรียบเทียบกับ HBV สายพันธ์ adr มีความเหมือนกัน 95.8 % ก่อนที่จะฝากถ่ายยีน S ใน pB เข้าสู่สาหร่าย ได้ทำศึกษาการ ฝากถ่ายยีน Green Fluorescent Protein (GFP) เพื่อใช้เป็น marker เข้าสู่ *Dunaliella sp* ก่อนและทดสอบว่ามียีน GFP ในสาหร่ายโดยใช้วิธี PCR พบว่าสามารถตรวจพบ GFP gene ในสาหร่าย ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าต่อไปในการฝากถ่ายยีน HBs เข้าสู่สาหร่าย *Dunaliella sp*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตรการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....
หลักสูตร วิทยาศาสตรการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4275236530 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD : HBsAg/Cloning/ELISA/E.coli/Algae/western blot/GFP

POJCHANAD JANTARADSAMEE : CLONING OF HBs GENE, EXPRESSION IN E.COLI SYSTEM AND DEVELOP TO UNICELLULAR ALGAE SYSTEM. THESIS ADVISOR : YONG POOVORAWAN, THESIS COADVISOR : PIYASAK CHAUMPLEK, 82 PP. ISBN 974-17-1321-5.

Hepatitis B virus (HBV) is an important virus, which causes acute hepatitis, chronic hepatitis and cirrhosis and has been associated with hepatocellular carcinoma. A vaccine has been used to prevent HBV infection for more than 20 years. The vaccine may be produced form antigen derived from plasma, recombinant protein, yeast and CHO. In this study, we produced the antigen from recombinant DNA in an E.Coli system. We also attempted to produce recombinant antigen from Algae (*Dunaliella ap.*). In the *E Coli.* system the S gene was digested using *Bam*HI and *Not*I at the restriction site and then ligased into pGEX. The construct transformation of recombinant DNA in *E.Coli* was verified by PCR, using the S gene primer of HBV . The homology between nucleotide sequences of recombinant DNA in the S gene after transformation was 99.4 % with the clone prior to transformation; 94.1% with the HBV adr accession NoD000630: 100% with an "a" determinant clone; and 98.8% with an adr clone. For amino acid alignment the homology was 98.2%, 90.0%, 100.0%, and 96.1%, respectively. The peak expression period of HBsAg in *E.coli* occurred during in the 5^{th} and 6^{th} hour of incubation, following stimulation of the IPTG. To test the Characteristics of the HBsAg protein, Dot Blot and Western Blot of the antigen-antibody complex was performed. Protein that was expressed from the clone could detected by anti-HBs with this method. Before transferring the S gene to algae (Dunaililie sp.), a transformation in the *E.Coli* system was performed first, to increase recombinant DNA in plasmid pBCIP. Recombinant DNA was detected by PCR, using the S gene primer of HBV. In this case, homology for nucleotide sequencing after transformation was 98.2% with the clone prior to transformation; 94.7% with the HBV adr accession number D000630; 100% with an "a" determinant clone; 97.1% with an adr clone. For amino acid alignment the homology was 97.0%, 90.0%, 100.0% and 95.8%, respectively. Prior to the transfer of recombinant DNA into algae using electrophoration, attempting to transfer the GFP gene into algae first tested the method. This test was performed successfully. Therefore, the same conditions were used with the recombinant DNA. However, this experiment proofed unsuccessful. Thus, another method of transferring the HBs gene into algae will need to be developed.

Program Medical Science — Student's signature.....

Field of study Medical Science — Advisor's signature.....

Academic year 2002 — Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาในการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์ ทุนเมธีวิจัยอาวุโส และ ทุนสนับสนุนศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ให้การสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณ อาจารย์ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้คำแนะนำและความรู้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญพิเศษหน่วยวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยในการทำวิทยานิพนธ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย