บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

การศึกษาวิจัยเป็นการศึกษาเชิงพัฒนา วิธีการทางอณูชีววิทยาโดยการนำ ไวรัสตับอักเสบ บี ที่ได้จาก ผู้ป่วยที่เป็นพาหะไวรัสตับอักเสบ บี แบบไม่มีอาการ และได้นำซีรัมผู้ป่วยที่ตรวจ ELISA ให้ผล HBsAg และ HBeAg เป็นบวก ซีรัมผู้ป่วยได้เก็บไว้ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทย์ศาสตร์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย โดยได้ทำการขออนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรเป็นที่เรียบร้อยแล้ว และการศึกษาวิจัยนี้ได้ผ่านคณะกรรมการทางจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขนาดประชากร การศึกษาเป็นการพัฒนาวิธีการทางวิทายาศาสตร์โดยนำยีน *HBs* ซึ่งเป็นยีนที่พบได้ในไวรัสตับอักเสบ บี ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงใช้ขนาดตัวอย่าง 1 ตัวอย่างเป็นตัวแทนของประชากร ในการทำการศึกษาพัฒนา

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Pipette tip : 10 ul, 1,000 ul (Elkay ,Galway,Ireland)
2. Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGEN,Union city,CA USA)
3. Polypropylene canical tube : 15 ml (Elkay ,Galway,Ireland)
4. Beaker : 50 ml, 1000ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex,USA.)
5. Flask : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex,USA.)
6. Reagent bottele : 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran,USA)
7. Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex,USA.)
8. Glass pipette : 5 ml, 10 ml (Pyrex,USA.)
9. Pipette rack (Eppendorf,Hamburg,Germany)
10. Thermometer (Precision , Germany)
11. Parafilm (American National Can, USA)
12. Plastic wrap
13. Stirring-magnetic bar
14. sequence ABI 310 kit (Perkimelmer,Boston,USA.)
15. Combs(Bio-RAD,Hercules,California)

16. Electrophoresis chamber set (Bio-RAD,Hercules,California)

Equipment

1. Automatic adjustable micropipette : P2 (0.1-2 ul), P10 (0.5-10 ul), P20 (5-20 ul) P100 (20-100ul), P1000 (0.1-1 ml) (Eppendorf,Hamburg,Germany)
2. Pipette boy (Tecnomara, Switzerland)
3. Vortax (Scientific industry, USA)
4. PH meter (Eutech Cybermatics)
5. Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
6. Balance (Precisa, Switzerland)
7. Microcentrifuge (Fotodyne, USA)
8. DND Thermal cycle 480 (Perkin Elmer, Cetus USA)
9. Themal cycle (Touch Down, Hybraid USA)
10. Power supply model 250 (Giboco BRL, Grand Island,New York)
11. Horizon 11-14 (Giboco BRL, Grand Island,New York)
12. Incubator (Memmert)
13. Themostat shaking-water bath (Heto, Denmark)
14. Spectronic spectrophotometers (Genesys5, Milon Roy USA)
15. UV Transillumintor (Fotodyne USA)
16. Gel Doc 1000 (Bio-RAD,Hercules,California)
17. Mitsubishi Video copy processor (Bio-RAD,Hercules,California)
18. Thermal paper (Bio-RAD,Hercules,California)
19. Refrigerator 4 c (Misubishi, Japan)
20. Deep freeze-20 c, -80 c
21. Water Purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)
22. Water bath
23. Sonicator(Bio-RAD,Hercules,California)
24. Uvspectrophotometer (SHIMADZU,Japan)

(Reagent) **สารเคมีที่ใช้**

1. General reagents

1.1 Absolute ethanol (Sigma,citilink Warehouse,Singapore)

1.2 Agarose, molecular glade (Promerga,Madison,U.S.A)

1.3 Ammonium acetate (USB,New Territories,Hong kong)

1.4 Ammonium acetate (USB,New Territories,Hong kong)

1.5 Ammouim Persulfate (Sigma,citilink Warehouse,Singapore)

1.6 Amplicilin (Pharmacia Territories,Hong kong)

1.7 Boric acid (USB,New Territories,Hong kong)

1.8 Bromphenol blue (Pharmacia Territories,Hong kong)

1.9 Disodium ethylenediamine tetracetic acid : EDTA (USB,New Territories,Hong kong)

1.10 Chloroform (Sigma,citilink Warehouse,Singapore Merck)

1.11 Ethidium bromide (Sigma,citilink Warehouse,Singapore)

1.12 Isoamyl alcohol (Sigma,citilink Warehouse,Singapore)

1.13 nitrocellulose membrance (Bio-RAD,Hercules,California)

1.14 Sodium chloride (USB,New Territories,Hong kong)

1.15 Sodium dodecyl sulfate (Sigma,citilink Warehouse,Singapore)

1.16 Sodium hydroxide (USB,New Territories,Hong kong)

1.17 Sucrose (USB,New Territories,Hong kong)

1.18 Tris base (USB,New Territories,Hong kong)

1.19100 base pair DNA ladder (Biolabs Hercules,California)

1.20 Polyacrylamide (Sigma,citilink Warehouse,Singapore)

1.21 QIAquick GEL Extraction kit (QIAGEN,Hilden,Germany)

1.22 Temed (Sigma,citilink Warehouse,Singapore)

1.23 trombin protease(Pharmacia Territories,Hong kong)

1.24 tryptone(Giboco BRL, Grand Island,New York)

1.25 Yeast Extract(Giboco BRL, Grand Island, New York)

1.26 X-gal (Biobsic Inc.,Germany)

1.27 IPTG (Biobsic Inc.,Germany)

1.28 Skim milk (Mission,Thailand)

1.29 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium substrate (BCIP/NBT) (Biorad,USA)

Enzyme

1.Alkaline Phosphatase (Pharmacia Territories,Hong kong)

2.Taq DNA Polymerase (QIAGEN,Hilden,Germany)

3.T4 DNA Ligase (Bio-RAD,Hercules,California)

Restriction enzyme

*Bam*H I,*Not* I, (Biolabs Hercules,California)

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับใช้ในการโคลน (DNA preparation) ชิ้นส่วนที่ใช้ในการโคลนได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี ส่วน S gene ซึ่งขั้นตอนในการเตรียมดังนี้

โคลนยีน HBs เข้าสู่ *E.coli*

1.สกัดดีเอ็นเอ(DNA Extraction)

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นซีรัมจากผู้ป่วยที่ HBsAg บวก นำซีรัมมาสกัด ดีเอนเอ โดยวิธีphenol-chlorofom[35]

2.เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ(DNA amplification)ด้วยวิธี Polymerase chain reaction

2.1เพิ่มปริมาณ ดีเอนเอ บริเวณ S gene ไพรเมอร์ออกแบบให้มีตำแหน่งตัดของ restriction enzyme 5' *Bam* HI,3'*Not*I

2.2ในการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำเป็น Negative control และใช้ซีรั่มผู้ป่วยที่เป็นพาหะเป็น positive controlส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1xbuffer,0.5mM DNTP, primer 0.33 pMol,Taq 0.3 ul,DNA 5ul, total 50ul นำหลอด 0.2 ml ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้

- เริ่มต้นที่อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที

annealing 55 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที

extension 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที

เป็นจำนวน 1 รอบ

- ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

55 องศาเซลเซียส 30 วินาที

72 องศาเซลเซียส 30 วินาที

ทำซ้ำเป็นจำนวน 30 รอบ

2.3 เมื่อครบรอบสุดทายตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเป็นเวลา 10 นาที ซึ่งจะได้ผลผลิตของดีเอนเอขนาด 1,276 คู่เบส ในการทำ PCR ช่วงสองเตรียมส่วนผสมในส่วน PCR ประกอบด้วย สารต่างๆ เหมือนกัน PCR ช่วงแรกแต่ใช้ primer คือ

sense PrimerFBSC (50 pmol), antisense PrimerRNSC (50 pmol) อย่างละ 0.33 pMol ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในเครื่อง Termal cycler(PerkinElmer) โดยที่กำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนและจำนวนรอบเหมือนกับการทำ PCR ช่วงแรกผลิตผลของปฏิกิริยาจะได้สายดีเอนเอที่มีความยาว 704 คู่เบส นำผลผลิตที่ได้มา 2 % run agarose ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ 40 นาทีใช้ดีเอ็นเอ marker 100 คู่เบสตรวจแถบดีเอ็นเอโดยใช้ ethidium bromide ภายใต้แสง uv

โคลนยีนส่วน HBs เข้าสู่พลาสมิด pGEX ขั้นตอนดังนี้

1. ตัดผลิตภัณฑ์และเวคเตอร์ด้วย Restriction enzyme

โดยตัดด้วย restriction enzyme ประกอบด้วย Enzyme *Bam*H I , *Not* I ดีเอนเอ 10 ไมโครกรัม ปริมาณทั้งหมด 100 ไมโครลิตร

2. การป้องกันการเชื่อมกันเองของเวคเตอร์ โดยการทำ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase

3. การเชื่อมดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์

4. การฝากถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้า competent cell ส่วนของ HBsAg ที่เชื่อมอยู่กับ vector เข้าสู่ *E.coli* โดยวิธี Heat shock

ตรวจสอบโคโลนีที่มีความเหมาะสมในการศึกษาการแสดงออก

1. การตรวจสอบหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของไวรัสตับอักเสบเชื่อมอยู่ในพลาสมิด pGEX

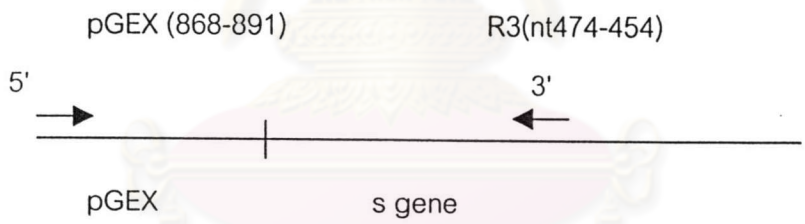
ทำการตรวจสอบหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของไวรัสตับอักเสบเชื่อมอยู่ สกัดพลาสมิดโดยใช้วิธี alkaline extractoin[36] นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ PCR[37,38] โดยใช้ไพรเมอร์ของไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งส่วนผสมในการทำ PCR ประกอบด้วย 1xbuffer,0.5Mm dNTP, 0.33pMol primer (FBSC และ R3) 0.01UTaq,DNA 5 ul ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร

2. ตรวจขนาดของผลผลิตที่ได้ด้วย restriction enzyme

นำดีเอ็นเอลูกผสมตัดด้วย restriction enzyme โดยประกอบด้วย 1x buffer,1x BSA,10U Enzyme *Bam*H I ,ดีเอ็นเอ10ไมโครกรัม ปริมาณทั้งหมด 100 แล้วนำมาตัดด้วย Enzyme *Not* I นำมา run gel เพื่อตรวจสอบผลผลิตที่ได้

3. ตรวจสอบลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโคลนที่ได้

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนระหว่างพลาสมิดและ HBsAg ใช้วิธี PCR เพิ่มสายดีเอ็นเอซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ทาง 5'อยู่ในส่วนของพลาสมิด pGEX และไพรเมอร์ 3'อยู่ในส่วนของ S ยีนดังรูปที่ 1



การตัด เจล ซึ่งในขั้นตอนนี้ใช้ QIAquick GEL Extraction kit

4. ตรวจสอบการเรียบตัวของนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่

นำผลผลิตที่ได้เข้าสู่ clycle sequencing โดยประกอบด้วย 8 ไมโครลิตร BigDye Reaction mix ของ ABI PRISM BigDye Sequencing Terminater cycle Sequencing Ready Reaction kit ,3.2 pMol primer, DNA, ปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร เข้า cycle sequencing นำลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์จากโคลนเปรียบเทียบกับตัวอย่างก่อนโคลนและ HBV จาก Gene Bank และ ทำ Phylogenetic Tree

ขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของยีน *HBs* (HBs expression)

1. หาเวลาที่มีการสร้างโปรตีนผิวในระบบแบคทีเรีย

หาเวลาที่มีการสร้างโปรตีนที่ต้องการ เนื่องจากขนาดของ HBs มีขนาดเท่ากับ 24 กิโลเดลตัน และเชื่อมอยู่กับ GST ซึ่งเป็นโปรตีนเชื่อมอยู่ในพลาสมิด

- เลี้ยงเซลล์ *E.coli* ที่มีการถ่ายยีนของไวรัสตับอักเสบ บี LB broth (Tryptone 10g/l,Yeast Extract 5g/l,NaCl 5 g/l) 100 มิลลิลิตรความเข้มข้นยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเลี้ยงจนกระทั่งเซลมีความขุ่นวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 ได้ค่า 0.6 –0.8
- กระตุ้นการสร้างโปรตีนใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เก็บเซลหลังจากกระตุ้นผ่านไป 2,3,4,5,6, 7,8 ชั่วโมง
- เก็บตะกอนเซลโดยปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที
- ละลายตะกอนด้วย บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร
- ทำให้เซลแตกโดยใช้ sonicate เวลา 30 วินาทีโดยเซลแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา
- นำมาปั่นแยกตะกอนและส่วนใสเก็บแยกกันในอุณหภูมิ-20องศาเซลเซียส
- นำเซลและส่วนใสที่ได่นำไปตรวจหาโปรตีนที่ถูกผลิตมาตรวจสอบความถูกต้องด้วย

การตรวจสอบโปรตีน HBs ด้วยวิธีการทำ SDS-PAGE[38]

1.เตรียม gel สำหรับ run โดยเตรียมชั้น saparating gel ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆดังนี้

น้ำปราศจากเชื้อ	3.25 ml
1.5Mtris-HClpH8.8	2.5 ml
10%SDS	100 ul
acrylamide	4 ml
glyceral	100 ul
10%ammoniumpersulfate	50 ul
TEMED	5 ul

2.ผสมสารต่างใส่ในแผ่นกระจกที่ประกบแล้ว ทิ้งไว้จน gel แข็งตัวประมาณ 30 นาที

3.เตรียมเจลชั้นที่สองคือชั้น stacking gel ประกอบด้วยสารต่างๆดังต่อไปนี้

น้ำปราศจากเชื้อ	0.9 ml
0.5tris-HClpH6.8	3.75 ml
10%SDS	150 ul
Arylamide/Bis	1.95 ul
Glyceral	150 ul
10%ammoniumpersulfate	75 ul
TEMED	10 ul

3.เตรียมตัวอย่างโดยนำมาผสมกับ crackingdye (250mMTrispH6.8),8%SDS,8%2-Mercaptone,0.04%Bromphenol Blue ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4

4.แช่ตัวอย่างที่ผสมกกับ cracking dye แล้วใน 95 องศาเซลเซียส 5 นาทีแล้วแช่ในน้ำแข็ง

5.เตรียมบัฟเฟอร์สำหรับ run gel ประกอบสารดังนี้

tris(hydroxymethyl)aminomethane	3.03 g
glycine	14.40 g
SDS	1.00 g
น้ำปราศจากเชื้อจนถึง	1 ลิตร

5.หยอดตัวอย่างที่เตรียมไว้ run ใช้กระแสไฟฟ้า 200โวล์ เวลา 80 นาที

6.นำ gel ย้อมด้วยย้อมด้วย Coomassie blue ข้ามคืนแล้วล้างสีออก

7.ทำการเก็บแผ่นเจลโดยประกบกันแผ่นกระดาษใสแล้วตากแห้ง

ตรวจสอบผลการแสดงออกของโปรตีนผิวไวรัสตับอักเสบ บีโดยใช้วิธี Dot blot **เพื่อวิเคราะห์ว่ามีการสร้างโปรตีนผิวซึ่งมีคุณสมบัติสามารถจับกับแอนติบอดีโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี**

1. นำเซลและส่วนใสนำมาหยดบนแผ่นเมมเบรน nitrocellulose**ซึ่งมี** positive และ negative control ทิ้งไว้ให้แห้ง
2. นำแผ่นเมมเบรนล้างด้วยบัพเฟอร์
3. แช่แผ่นเมมเบรนด้วย 5% skim milk ค้างคืน
4. ล้างด้วยบัพเฟอร์ 3 ครั้งครั้งละ 5 นาที
5. ใส่ Anti-HBsใน 5% ของ skim milk ในอัตราส่วน 1:500 เขย่าเบาๆในที่มืด ข้ามคืน
6. ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัพเฟอร์ 3 ครั้งครั้งละ 5นาที
7. ใส่ Human IgG ที่มีเอนไซม์ Horseradish Peroxideas(HRP)15 ulใน5% skimmilk เขย่าในที่มืดเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
8. ใส่ substrate คือ DAB (3,3' diaminobenzidine) ถ้าผลเป็นบวกจะให้สีน้ำตาล

ตรวจสอบโปรตีนที่ได้หลังจากตัดโปรตีนเชื่อมออกแล้ว

ตรวจสอบโปรตีนหลังจากใช้เอนไซม์ thrombin **ตัดซึ่งจะตัดโปรตีนเชื่อมออกแล้วทดสอบคุณสมบัติการจับของโปรตีนผิวกับแอนติเจนโดยวิธี** western blot

1. นำตัวอย่างที่ได้จากการกระตุ้นการสร้างโปรตีนโดยใช้ IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิโมล แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicator แล้วแยกระหว่างส่วนใสและเซลล์
2. ตัดโปรตีนเชื่อมโดย thombin protease
3. incubateที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
4. นำตัวอย่างที่เตรียมได้มาแยกโปรตีนด้วย SDS PAGE ใช้กระแสไฟฟ้า100โวล์ 2 ชั่วโมง
5. transfer ตัวอย่างจาก SDS PAGE สู่แผ่น nitrocellulose membrance
6. นำ nitrocellulose membrance ใส่ TTBS เป็น blocking solution ซึ่งประกอบด้วย (100 mMTris-HCl pH7.5,0.9%NaCl,0.1%Tween20) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เวลา 1 ชั่วโมง
7. เทสารละลายทิ้งแล้วเติม monoclonal antibody ต่อ HBs

8. เขย่าที่อุณหภูมิห้องเวลา 4 ชั่วโมง

9. ล้างด้วย TTBS 4ครั้ง

10. เติม Human IgG ที่มีเอนไซม์ Horseradish Peroxideas(HRP):TTBS อัตราส่วน 1:200

11. เขย่าที่อุณหภูมิห้องเวลา 1 ชั่วโมง

12. ล้างด้วย TBS สารละลายซึ่งประกอบด้วย(100 mMTris-HCl pH7.5,0.9%NaCl)

13. เติม substrate คือ DAB (3,3' diaminobenzidine) ถ้าผลเป็นบวกจะให้สีน้ำตาล เวลา 2-3นาที

14. ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

15. แช่เมมเบรนในสารละลายบัฟเฟอร์

16. ควรเก็บผลโดยการสแกนในเครื่องคอมพิวเตอร์เลย เพราะถ้าปล่อยไว้นานผลที่ได้อาจจะจางได้

ตรวจสอบโปรตีนที่ให้ผลบวก นำมาทำ ELISA

1. นำตัวอย่างที่จะทดสอบ 200ไมโครลิตรและ negative และ positive ใส่ใน tray

2. ใส่ 50ไมโครลิตรของ conjugate

3. ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ Bead ซึ่ง เคลือบ ด้วยแอนติบอดีต่อ HBsAg

4. ปิด แล้วนำไปincubateที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเวลา 2 ชั่วโมง

5. ล้าง Bead ด้วยน้ำกลั่น

6. ถ่าย Bead สู่หลอดแล้วใส่ substrateคือ o-phenylalanine ให้สีเหลืองเมื่อผลเป็นบวก ถ้าสีขาวคือ negative

7. หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N H_2SO_4

วัดการดูดกลืนสีที่ 496 นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพสรุปวิธีการทดลองในระบบ *E.coli*

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

สกัดพลาสมิดจาก E.coli

↓

ตัดดีเอ็นด้วย restriction enzyme

↓

ตกตะกอนดีเอ็นเอ

ตัดพลาสมิดด้วย restriction enzyme

↓

ป้องกันการจับกันเองของพลาสมิด

↓

เชื่อมพลาสมิดและดีเอ็นเอจาก HBV

↓

ฝากถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ E.coliด้วยวิธี heat shock

↓

เลือกโคโลนีที่ต้านยาปฏิชีวนะและเป็นโคโลนีสีขาว

↓

นำโคโลนีที่เลือกมาสกัดแล้วทำ PCRใช้ไพรเมอร์ HBV คือ FBSC+R3

↓

ตรวจสอบทิศทางของนิวคลีโอไทด์ในโคลนที่ได้โดยใช้ไพรเมอร์ 5'ในส่วนพลาสมิดและ 3'ในส่วนของ HBV

↓

ขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของยีน *HBs* (HBs expression)

1.ทำการหาเวลาที่มีการสร้างโปรตีนผิวในระบบแบคทีเรียโดย run SDS PAGE

2.ตรวจสอบผลการแสดงออกของโปรตีนผิวไวรัสตับอักเสบ บีโดยใช้วิธี Dot blot

3.หลังจากตัดโปรตีนเชื่อมแล้วทดสอบการจับกับแอนติบอดีด้วยวิธี western blot

4.ทดสอบคุณสมบัติการจับกับแอนติบอดีโดยวิธี ELISA

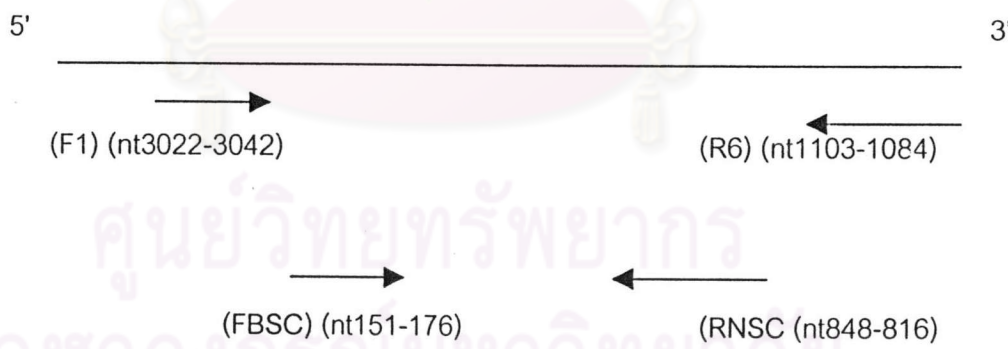
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ตำแหน่ง	ความยาว
F1	5'GGAGCGGGAGCATTCGGGCCA 3'	(nt3022-3042)	21
R6	5' GGCGAGAAAGTGAAAGCCTG 3'	(nt1103-1084)	20
FBSC	5'TCCATGGAGAACATCACATCAGGAT3'	(nt151-176)	25
RNSC	5'GAATGCGGCCGCTTAAATGTATACCCA3'	(nt848-816)	27
pGEX5'	5' GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG 3'	(nt868-891)	23
R3	5' CAAGGTATGTTGCCCGTTTGC 3'	(nt474-454)	20

ในการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ genome ของไวรัสตับอักเสบ บี สายพันธ์ adr (D000630)

รูปภาพที่ 2 แสดงทิศทางไพรเมอร์ HBsAgสำหรับโคลนเข้าสู่ *E.coli*



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแสดงทิศทางของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบ บี โดยมีตำแหน่งตัดของ Restriction enzyme ดังนี้

- *Bam*H I ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 148
- *Not* I ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 811

วิธีการดำเนินการวิจัย ถึงความเป็นไปได้ในการโคลนยีนไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่ระบบสาหร่ายสีเขียวเซลเดียว (*Dunaliela sp*)

การเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliela sp*

สาหร่ายที่ใช้ในการทำการวิจัยได้จากห้องปฏิบัติการ Trangenic technology โดยดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ เนื่องจากสาหร่าย เป็นสาหร่ายน้ำเค็ม เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิห้องและเป็นต้องมีแสงส่องถึง โดยได้ทำการเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหาร J/1^0 ซึ่งประกอบไปด้วยสารประกอบต่างใน 1 ลิตรดังนี้ 30%NaCl, $MgCl_2.6H_2O$ (0.015M), $MgSO_4.7H_2O$(0.00041M), KCl (0.0026M)$CaCl_2.6H_2O$(0.0018 M), KNO_3 (.0099 M), $NaHCO_3$ (0.0004 M), $KHPO_4$ (0.00020M),Fe solution 10 มิลลิลิตร, Trace element solution 10 มิลลิลิตร

Fe solution ประกอบด้วยสารต่างดังนี้ Na_2EDTA 189 มิลลิกรัม,$FeCl_3.6H_2O$(0.55 M)

Trace element solution H_3BO_3 (61.0 mg), $(NH_4)_6MO_7O_{27}.4H_2O$(38 mg), $CuSO_4.5H_2O$ (0.0240 M),$CaCl_2.6H_2O$(0.045 M),$ZnCl_2$(0.030 M), $MnCl_2.4H_2O$(0.020 M),ปรับ pH 7.5 ด้วย HCl ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้แสง 12 ชั่วโมง แล้วปล่อยฟองอากาศ 100 ลูกบาศก์ต่อนาที นอกจากสูตรเลี้ยงสาหร่ายด้วยสูตรอาหาร J/1 แล้วได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่มีราคาต้นทุนต่ำกว่าโดยอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ศึกษามีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายซึ่งจะประกอบด้วยสูตรปุ๋ยและอาหารเสริมดังนี้

สูตรอาหาร	x	2x	5x	0.5x	0.1x
- ปุ๋ยสูตรประกอบด้วยธาตุ nitrogen-phosphorus และ potassium (13-0-46)	1.1	2.2	5.5	0.55	.11
- ปุ๋ยสูตรประกอบด้วยธาตุ nitrogen-phosphorus และ potassium (16-16-16)	0.05	0.10	0.25	0.01	0.005
- Unilat อาหารเสริมที่ประกอบด้วย สารอาหารเสริมของพืช (Mg 24%,Mn (1.5%) Fe (1.5%), Cu (0.5%), Zn (0.5%), Co (0.03%) B (0.3%),Mo (0.03%)	0.6847				

- Mg_2SO_4 0.2287

ทำการเลี้ยงสาหร่ายเปรียบเทียบโดยนำสาหร่ายใส่ในแต่ละขวดเท่ากันขวดละ 1 มิลลิลิตร incubate ที่อุณหภูมิห้องที่แสงส่องสว่าง แล้วทำการวัด OD ที่ 600 ทุกวันเป็นระยะเวลา 2 อาทิตย์

การศึกษาความเป็นไปได้ในการฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่สาหร่าย *Dunaliela sp*

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับใช้ในการโคลน (DNA preparation)

ชิ้นส่วนที่ใช้ในการโคลนได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี ส่วน Sgene ซึ่งขั้นตอนในการเตรียมดังนี้

สกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

สกัด ดีเอนเอ โดยวิธี phenol-chlorofom

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (DNA amplification)

โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1xbuffer,0.5mMDNTP, primer 0.33 pMol,Taq 0.3 ul,DNA 5ul, total 50ul นำหลอด 0.2 ml ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนเหมือนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการโคลนเข้าสู่ *E.coli*

ขั้นตอนการฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่าย

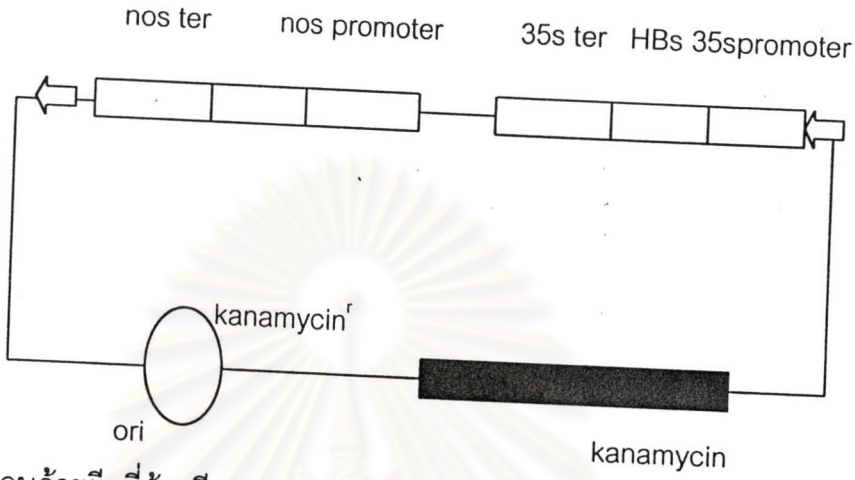
1.ตัดผลิตภัณฑ์เพื่อเตรียมเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์

ตัด HBs และพลาสมิด pBIS ด้วย Enzyme *Bam*HI

2.เชื่อมดีเอ็นเอและเวคเตอร์ด้วยกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากพลาสมิดที่ใช้ในระบบสาหร่าย dunaliela มียีนที่สำคัญแสดงดังรูปที่ 3



ประกอบด้วยยีนที่ต้านยีน kanamysin

- original of replication เป็นส่วนเริ่มต้นในการถอดรหัสในการสร้างโปรตีน
- ในตำแหน่งที่รับชิ้นส่วนของดีเอ็นมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์อยู่ 4 ชนิดคือ *Kpn*I ,*Eco*R I,*Bam*H I,*Stu* I
- โปรโมเตอร์ที่เหมาะสมในเซลพืชคือ 35s promoter จะแสดงออกในพืชทุกชนิดเป็น promoter ที่ใช้กันมากในการฝากถ่ายยีนในพืชให้มีการแสดงออกของยีน
- พลาสมิดมีขนาดประมาณ 10 กิโลคู่เบส

การเตรียมพลาสมิด เพื่อทำการตัดต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี ต้องทำการเพิ่มปริมาณของพลาสมิดก่อนซึ่งจะทำการฝากถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* ก่อนแล้วทำการสกัดพลาสมิดจากเซลของ *E.coli*

การฝากถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ E.coli

เซลล์ *E.coli* ที่ใช้เป็นชนิด DH5α ฝากถ่ายยีนโดยวิธีของ Cohen และคณะ

ทำการตรวจสอบหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของไวรัสตับอักเสบเชื่อมอยู่

สกัดดีเอ็นเอลูกผสมโดยใช้วิธี alkaline Extractoin พลาสมิดที่สกัดได้ในแต่ละโคโลนีนำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งส่วนผสมในการทำ PCR ประกอบ

ไพรเมอร์คือ FBSC 5'ATCCATGGAGAACATCACATCAGGAT3'(nt151-176)

r3 5'CAAGGTATGTTGCCCGTTTGC 3'(nt474-454)

ตรวจขนาดของผลผลิตที่ได้ด้วย restriction Enzyme

ตัดดีเอ็นเอลูกผสมด้วย restriction enzyme ประกอบด้วย 1x buffer,1x BSA,10U Enzyme *Bam*HI ,ดีเอ็นเอ10ไมโครกรัม

ตรวจสอบลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโคลนที่ได้

ผลผลิตที่ได้เข้าสู่ clycle sequencing โดยประกอบใช้ไพรเมอร์ตรวจสอบสำหรับไวรัสตับอักเสบ บี คือ FBSC ผสมกับ 8 ไมโครลิตร BigDye Reaction mix ของ ABI PRISM BigDye Sequencing Terminater cycle Sequencing Ready Reaction kit ทำการ sequencing เพื่อยืนยันว่าเป็นชิ้นส่วนที่โคลนได้โดยสกัดพลาสมิดแล้วนำมาทำ purification โดยใช้ (Qiaprep miniprep kit, QIAGEN) แล้วเข้า Cycle Sequence แล้วนำมาตกตะกอนอีกทีแล้วจึงเข้าเครื่อง sequence ABI 310 เนื่องจากผลผลิตที่ได้มีขนาดใหญ่

แสดงแผนภาพสรุปการเตรียมดีเอ็นเอลูกผสมก่อนที่จะทำการฝากถ่ายเข้าสู่สาหร่าย *Dunaliela sp*

สกัดดีเอ็นเอโดย phenol-chloroform → เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR → ตัดสายดีเอ็นเอด้วย *Bam*HI

pBICPเพิ่มปริมาณใน *E.coli* → สกัดพลาสมิดด้วยalkaline extraction → ตัดสายพลาสมิดด้วย *Bam*HI

เชื่อมดีเอ็นเอกับพลาสมิดด้วยเอนไซม์ ligase

↓

ฝากถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *E.coli* ด้วยวิธี heat shock

↓

เลือกโคโลนีที่ตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ FBSC และ R3 ให้ผลเป็นบวก

↓

ตรวจสอบผลผลิตที่ตัดด้วย *Bam*HI

↓

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้

↓

ฝากถ่ายเข้าสู่สาหร่าย *Dunaliela sp*

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ตำแหน่ง	ความยาว
(F1)	5' GGAGCGGGAGCATTCGGGCCA 3'	(NT3022-3042)	21
(R6)	5' GGCGAGAAAGTGAAAGCCTG3'	(NT1103-1083)	20
(FBSC)	5'ATCCATGGAGAACATCACATCAGGAT3'	(NT151-176)	25
(BSC)	5'CCGGTCCTTAAATGTGTACCCAAAGACACCCG3'	(NT850-816)	32

เมื่อเตรียมดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากยีนจากไวรัสตับอักเสบ บีอยู่ในเวคเตอร์ pBIS แล้ว ขั้นตอนต่อไปต้องเตรียมสาหร่ายสีเขียวเพื่อให้พร้อมสำหรับการรับดีเอ็นลูกผสม

ทำการเพิ่มจำนวนสาหร่าย *Dunaliela sp.* โดยเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมของ agar

ขั้นตอนในการฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่าย *Dunaliela sp.*

เนื่องจากสาหร่าย dunaliela เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลเดียวมีขนาดประมาณ 10-20 ประกอบด้วยแล้วนำมาแยกโคโลนีเดี่ยว โดยทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแข็ง โดยใช้ 0.8% ไมโครเมตร ไม่มีผนังเซล มีเพียงเยื่อหุ้มบางๆ ซึ่งวิธีการที่จะฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบ บี จะใช้วิธีการ Electroporation คือ การผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เซลเพื่อผลักดันให้เซลสาหร่ายรับดีเอ็นเอลูกผสม

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

การฝากถ่ายยีนเข้าสู่พืชทำได้หลายวิธีในการเลือกวิธีที่จะทำการทดลอง เนื่องจากสาหร่ายที่ใช้ในการทำการทดลองเป็นเซลเดี่ยวและไม่มีพนังเซลจึงใช้วิธีการฝากถ่ายยีนด้วย

กระแสไฟฟ้า เนื่องจากวิธีนี้จะให้ประสิทธิภาพการฝากถ่ายยีนที่ดีและเหมาะกับสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กซึ่งในแต่สภาวะที่ใช้จะทำกลุ่มสาหร่ายควบคุมด้วยคือสาหร่ายที่นำมากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกับกลุ่มทดลองเพื่อทดสอบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้

สภาวะที่ 1

คือ ดีเอ็นเอลูกผสม 10 ไมโครลิตรกับสาหร่าย 1 มิลลิลิตร ใส่ Polyethylene glycol 8'000 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 % ใช้กระแสไฟฟ้า 300 โวล์ .25 ไมโครฟาลัส แล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 นำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งความเข้มข้น 0.8% ของ agar ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อจะใส่ยาแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ kanamysin บ่มที่อุณหภูมิห้องแต่ต้องแสงส่องถึง เพราะสาหร่ายจะเจริญเติบโตได้ในที่แสงสว่างส่องถึง เนื่องจากจะต้องมีขบวนการสังเคราะห์แสง จนกว่าจะมีโคโลนีของสาหร่ายเติบโตขึ้นมาประมาณ 7 วัน

สภาวะที่ 2

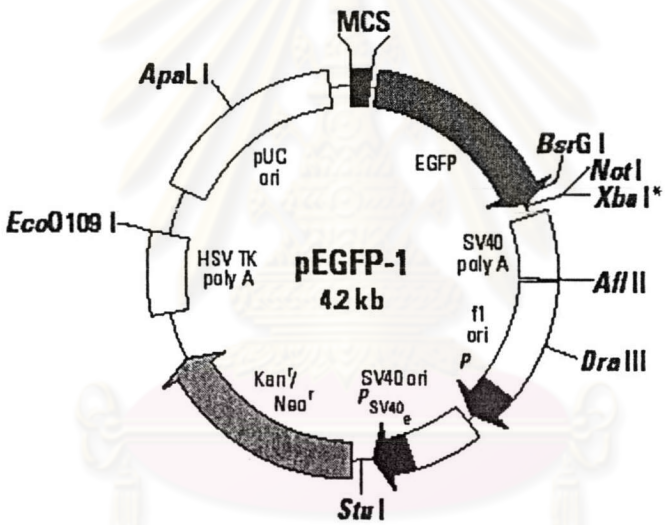
ใช้คือ ดีเอ็นเอลูกผสม 10 ไมโครลิตรกับสาหร่าย 1 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 300 โวล์ .25 ไมโครฟาลัส แล้วแช่ในน้ำแข็ง นำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งความเข้มข้น 0.8% ของ agar ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อจะใส่ยาแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ kanamysin บ่มที่อุณหภูมิห้องแต่ต้องแสงส่องถึง เพราะสาหร่ายจะเจริญเติบโตได้ในที่แสงสว่างส่องถึง เนื่องจากจะต้องมีขบวนการสังเคราะห์แสง จนกว่าจะมีโคโลนีของสาหร่ายเติบโตขึ้นมาประมาณ 7 วัน

สภาวะที่ 3

ใช้คือ ดีเอ็นเอลูกผสม 10 ไมโครลิตรกับสาหร่าย 1 มิลลิลิตร ใส่ glyceral 0.4 % ใช้กระแสไฟฟ้า 300 โวล์ .25 ไมโครฟาลัส แล้วแช่ในน้ำแข็ง นำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งความเข้มข้น 0.8% ของ agar ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อจะใส่ยาแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ kanamysin บ่มที่อุณหภูมิห้องแต่ต้องแสงส่องถึง เพราะสาหร่ายจะเจริญเติบโตได้ในที่แสงสว่างส่องถึง เนื่องจากจะต้องมีขบวนการสังเคราะห์แสง จนกว่าจะมีโคโลนีของสาหร่ายเติบโตขึ้นมาประมาณ 7 วัน

ทดสอบฝากถ่ายยีนอื่นเข้าสู่ระบบสาหร่าย *Dunaliella sp. sp*

เนื่องจากระบบสาหร่าย *Dunaliela sp* เป็นระบบที่ใหม่ยังไม่การทดลอง จึงได้ทำการออกแบบการทดลอง โดยโคลนยีนที่ง่ายต่อการตรวจสอบผลการฝากถ่าย ยีนที่ง่ายขึ้น โดยในปัจจุบันนี้ยีน Marker นิยมใช้ คือ Green Fluorescent Protein (GFP) จาก CLONTECH เมื่อทำการฝากถ่ายเข้าสู่เซล สามารถตรวจสอบได้ง่าย เนื่องจาก GFP สามารถปล่อยแสงสีเขียวที่ความยาวคลื่น 385 นาโนเมตร ภายใต้การให้แสง UV โดยเป็นการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อความเป็นไปได้ในการนำฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายโดยจะยีน GFP เป็นยีนทดลอง ทำการฝากถ่ายยีน GFP เข้าสู่สาหร่ายโดยยีน GFP จะอยู่ในพลาสมิด pEGFP ดังรูปที่แสดงโครงสร้างของส่วนประกอบของยีน



รูปที่ 4 พลาสมิด pEGFP-1 และองคประกอบภายในพลาสมิด

การฝากถ่ายยีน GFP เข้าสาหร่าย *Dunaliela sp*

สภาวะที่ได้ทำการทดลอง คือนำสาหร่าย *Dunaliela sp* 50 มิลลิลิตรแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที ปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง ละลายตะกอนด้วย manital 500 ไมโครลิตร แช่สารในน้ำแข็ง 30 นาที นำพลาสมิดที่มียีน GFP 10 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 385 โวล์ ทดสอบ capacity ของเซลได้ 25 μf ช่วยให้ยีนเข้าสู่ สาหร่าย นำเซลสาหร่าย *Dunaliela sp*

ที่ผ่านกระแสไฟฟ้า โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง แสงส่องถึง เป็นระยะเวลาประมาณ 1 อาทิตย์ นำโคโลนีที่ได้มาตรวจสอบการฝากถ่ายยีนด้วยวิธี PCR

การตรวจสอบโคโลนีที่ของสาหร่ายที่ได้รับการฝากถ่ายยีนด้วยวิธี PCR

โดยนำโคโลนีของสาหร่าย นำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ในยีน GFP โดยเตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย

1xbuffer,dNTP,sense primer,antisense primer ,0.2 U taq polymesase , DNA 3 ไมโครลิตร ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง thermal cycle

โดยใช้ cycle ดังนี้ 93 องศาเซลเซียส 1 นาที 1รอบก่อนที่จะเข้าสู่ cycle

93องศาเซลเซียส 1 นาที

55องศาเซลเซียส 1 นาที

72องศาเซลเซียส 1 นาที

40 รอบ

หลังจากนั้นนำมาแยกดีเอ็นเอ ใน 2% agarose gel แล้วนำสภาวะที่ได้ ไปใช้ในการฝากถ่ายยีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย