บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

เนื่องจากไวรัสตับอักเสบ บี เป็นสาเหตุการเกิดโรคตับอักเสบ และเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับ ประชากรที่เป็นโรคจะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาและผู้ติดเชื้อบางคนไม่แสดงอาการสามารถแพร่เชื้อต่อไปได้ และในปัจจุบันการรักษาไม่สามารถกำจัดไวรัสออกไปได้เพียงแต่ยับยั้งการอักเสบเท่านั้น ดังนั้นแนวทางที่สามารถป้องกันโรคและลดการแพร่กระจายโรคคือการให้วัคซีน ซึ่งในการผลิตแอนติเจนมาใช้ทำวัคซีนส่วนที่สำคัญคือส่วนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งเป็นส่วนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกาย ในปี 1963 Blumberg ค้นพบ HBsAg ซึ่งเดิมเรียกว่า Autralian antigen พบในชนพื้นเมือง ชาวออสเตรเรีย[16] โดยโปรตีนส่วนนี้แบ่งเป็น 3 บริเวณคือ

Major Protein สร้างจาก S open reading frame (ORF) เรียก S gene ประกอบด้วยกรดอะมิโน 226 ตัว เป็นส่วนหลักที่เรียกว่า hepatitis B surface antigen และเป็นส่วนที่ใช้ในการผลิตวัคซีนในปัจจุบัน ส่วน Major Protein มี 2 รูปแบบคือ non-glycosylated form มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kDa (P24) และ glycosylated form มีน้ำหนักโมเลกุล 27 kDa (P27) โดยมี N-link glycosylated ที่กรดอะมิโน asparagine ตำแหน่งที่ 146 ในส่วน Major Surface antigen จะมีส่วนที่เป็น antigenic determinant ที่อยู่ในเชื้อ HBV ทุกสายพันธุ์เรียกว่า "a" determinant สร้างจากกรดอะมิโนลำดับที่ 124-147 เป็นส่วนที่ร่างกายกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีมาก [17]

Middle protein สร้างจากยีนส่วน preS1 และ S ประกอบด้วยกรดอะมิโน 281 ตัว เป็นส่วนประกอบของenvelope antigen ของเชื้อ ตับอักเสบ บี สามารถเกาะติดได้กับเซลล์ตับและติดเชื้อที่ตับ

Large protein มีกรดอะมิโน 389 ตัว สร้างจากยีน PreS1 , PreS2 และ S มีบทบาทในการเกาะติดระหว่างเชื้อไวรัสกับเซลล์ตับหรือเซลล์เป้าหมายอื่นๆมี 2 รูปแบบคือ non glycosylated มีน้ำหนักโมเลกุล 39 kDaและ glycosilated มีน้ำหนักโมเลกุล 42 kDa

วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบ บี มี 2 ชนิด

ชนิดแรกเป็นวัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบ บี ที่ได้จากพลาสม่า (plasma derived vaccine) โดยผลิตครั้งแรกปี พ.ศ.1970 โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี นำมาทำให้เจือจางแล้วทำลายด้วยความร้อนสูง 98 องศาเซลล์เซียสนาน 1 นาที แล้วนำมาฉีดให้อาสาสมัคร วัคซีนชนิดนี้ได้รับการรับรองให้ใช้ครั้งแรกและได้รับการจดทะเบียนในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี

พ.ศ 2524 แต่ plasma derived vaccine มีขีดจำกัดคือ เกรงว่าอาจจะมีเชื้ออื่นๆที่ยังมีชีวิตปนมาในวัคซีนซึ่งต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายทดสอบความปลอดภัยก่อนนำไปใช้ทำให้มีต้นทุนผลิตสูง และแหล่งเลือดจากผู้เป็นพาหะโรคไวรัสตับอักเสบ บี น้อย จึงมีแนวโน้มที่จะเลิกผลิตในที่สุด

วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบอีกชนิดคือวัคซีนที่ผลิตโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (Recombinant DNA vaccine) เป็นวัคซีนที่ผลิตโดยการนำยีนส่วนที่ควบคุมการสร้าง HBsAg สอดใส่ในเวคเตอร์ได้ดีเอนเอสายผสมซึ่งเรียกว่า Recombinant DNA แล้วถ่ายใส่สู่สิ่งมีชีวิตเช่น แบคทีเรีย[18] ยีสต์[19] การแสดงออกในระบบสิ่งมีชีวิตมีองค์ประกอบขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม ดีเอนเอ ที่ต้องการศึกษา (foreign DNA) ให้ได้ขนาดและลักษณะที่เหมาะสม

2 เวคเตอร์ประกอบด้วย

- origin of replication ส่วนของดีเอนเอที่เป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัว
- multiple cloning site เวคเตอร์ที่ดีต้องมีตำแหน่งที่ตัดของ restition enzyme หลายชนิดเพื่อสะดวกแก่การตัดต่อเข้ากับชิ้นส่วนของ ดีเอนเอ ที่สนใจ
- selective maker คือ ส่วนที่ติดเวคเตอร์ทำให้เราสามารถติดตามได้ว่า ดีเอนเอ เวคเตอร์ อยู่ในเซลล์เจ้าบ้านเซลล์ใด โดยมากจะเป็นยีนดื้อยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการเลือกได้

3. เชื่อม foreign ดีเอนเอ เข้ากับ เวคเตอร์ คือการเชื่อมปลาย ดีเอนเอ ต่างชนิดเข้าด้วยกันโดยอาศัย เอนไซน์ ligase

4. การนำ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์ ได้แก่ การใช้สารละสาย $CaCl_2$[20] หรือการใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูง ทำให้เกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์เพื่อให้ ดีเอ็นเอ มีโอกาสเข้าสู่เซลล์ได้

5. ตรวจสอบ recombinant DNA ที่ต้องการคัดเลือกออกจาก nonrecombinant clone โดยใช้วิธีพีซีอาร์[21]

6. การหาลำดับเบส ซึ่งการทราบลำดับเบสในดีเอนเอ (DNA sequence) ของยีนจะทำให้ทราบลำดับอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีน ในการโคลนยีนและต้องการให้ยีนนั้นแสดงวอกใน *E.coli* ได้จะต้องใช้เวคเตอร์ที่เอื้ออำนวยให้ยีนที่โคลนลงไปมีการถอดรหัสและแปลรหัสใน *E.coli* ซึ่งเรียกว่า expression vector ยีนที่ถูกโคลนจะให้โปรตีนเป็นผลิตภัณฑ์ได้ขึ้นอยู่กับตัวอย่างของเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการศึกษา การแสดงออกของยีนเช่น *E.coli* มีข้อดีคือ มีการศึกษาและทดลองจำนวนมากและมีหลายเวคเตอร์ สามารถควบคุมการแสดงออกของ ยีนได้ง่ายมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว โปรตีนที่ได้มีมากกว่า 50% ของโปรตีนทั้งหมด โดยสามารถออกแบบให้โปรตีนที่ต้องการสามารถหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ตัวอย่างเวคเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกใน *E.coli* เช่น pGEX เป็นเวคเตอร์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน[22] ซึ่งได้มีงานวิจัยที่มีการศึกษาการผลิตแอนติเจนในระบบแบคทีเรีย ในปี 1980 Charnay P และคณะได้ทำการศึกษาการผลิตโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบ บี ใน *E.coli* โดยทำการโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ที่เหนี่ยวนำการแสดงออก

ใน *E.coli* โดยใช้ เฟคแลมดา โดยโปรตีนผิวจะเชื่อมกับ β-galactrosidase (lac Z) ประกอบด้วย กรดอะมิโน 1005 ตัวนำแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายยีนนำมาทดสอบการแสดงออกของยีน โดยทำให้เซลล์แตกแล้วนำมาทำ polyacrylamide SDS gel เพื่อดูขนาดของโปรตีน ผลที่ได้ปรากฏว่าได้โปรตีนขนาดเท่ากับ 138 kDa ซึ่งเป็นผลรวมระหว่างโปรตีนเบต้ากาแลคโตสิเดสกับโปรตีน S หลังจากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำ immunopresipitate เพื่อความจำเพาะกับโปรตีน HBsAg ปริมาณโปรตีนที่ได้ประมาณ 0.05% ของเซลล์โปรตีนของ *E.coli* ซึ่งผลที่ได้จากการโคลน HBsAg เข้าสู่ *E.coli* ปริมาณโปรตีนที่ได้น้อยอาจจากการที่เซลล์แบคทีเรียแตกและไม่มีตัวยับยั้งโปรตีนเอส ทำให้เกิดการทำลายโปรตีนของเซลล์[23]

ในปี 1983 Fujisawa และคณะได้ทำการโคลน HBs gene เข้าสู่ *E.coli* การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยโคลนไวรัสตับอักเสบ บีขนาด3.2กิโลเบสเข้าสู่พลาสมิด pHBV933 ก่อนหลัง จากนั้นใช้ *Sau*3A ตัดโคลนเพื่อให้ได้ชิ้น HBsAg ขนาด809กิโลเบสจากนั้นเชื่อมชิ้นส่วนที่ได้กับ linker ที่เป็น *Bam*HI และ *Hpa*II ทำการเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ที่เหนี่ยวนำในการแสดงออกคือ ptrpss-39 ฝากถ่ายเข้าสู่ *E.coli* โดยใช้วิธีของ cohen[24] ตรวจหาโคโลนีที่มีดีเอ็นเอ HBsAg โดยใช้วิธี colony hybridization โคโลนีที่ให้ผลบวกนำมาวิเคราะห์โดยดูขนาดของโปรตีนที่ผลิตขึ้นโดยนำมาทำ SDS PAGE พบโปรตีนขนาด 22-23 kDa ทำ western blot ใช้ monoclonal antibody ตรวจสอบ HBs gene วัดปริมาณโปรตีนโดยการกระตุ้นด้วย IPTG เริ่มที่ชั่วโมงที่ 3 และพบว่าจะมากที่สุดที่ 7-8 ชั่วโมงซึ่งปริมาณ HBsAg อยู่ที่ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 0.01% ของโปรตีนทั้งหมดซึ่งปริมาณน้อยมากอาจเป็นผลจากการสลายตัวง่ายและประสิทธิภาพในการถอดรหัสของแบคทีเรีย

ส่วนยีนของไวรัสตับอักเสบ บี ที่มีการศึกษาการแสดงออกใน E.coli เช่น ส่วน preS1 ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญโดยจะมี recepter จับกับเซลล์ตับ ซึ่งส่วน Large Protein ของโปรตีนผิวไวรัสตับอักเสบ บี อยู่ที่กรดอะมิโนตัวที่ 1-119 ไวรัสตับอักเสบ บี สายพันธุ์ *adr* ในการแสดงออกใช้พลาสมิด pGEX โคลนเข้าสู่ *E.coli* ชนิด DH5α หลังจากได้ดีเอ็นเอลูกผสมเลี้ยงใน LB broth ที่มี แอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลล์เซียส
ความขุ่นของเซลล์ที่เลี้ยงได้ 0.5-0.6 วัดความเข้มแสงที่ 600 นาโนเมตร กระตุ้นการสร้างโปรตีนโดยใช้ 0.2 มิลลิโมลาร์ของ IPTG เลี้ยงต่อที่ 30 องศาเซลล์เซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยปั่นแล้วละลายเซลล์ด้วย PBS แล้วทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicate ทำการวิเคราะห์โปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE และ western blot เพื่อตรวจดูว่าเป็นโปรตีน preS1 ต่อจากนั้นทำการหา secondary structure โดยใช้หลักการของ Garnier ผลการทดลองที่ได้จากการแสดงออกของดีเอ็นเอลูกผสมที่โคลนในพลาสมิด pGEX อยู่ภายใต้การควบคุมของ tac promotor โปรตีนที่วิเคราะห์ได้จาก SDS-

PAGE และ western blot ประมาณ 12.5 % โดยโปรตีนส่วนใหญ่จะสลายตัว เนื่องจากเมื่อเซลล์แตกจะมีการทำลายโปรตีนโดย protease[25]

การผลิตแอนติเจนในระบบแบคทีเรียมีข้อดีคือ

- เนื่องจากแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนตัวเองได้รวดเร็ว ดังนั้นจะผลิตแอนติเจนได้มากและง่ายต่อการเลี้ยง
- และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางมีข้อมูลพื้นฐานเพื่อเป็นประโยชน์ในการทำการทดลอง[26]
- มีการใช้งานผลิตเป็นอุตสาหกรรม แต่เนื่องจากแบคทีเรียมีการหลั่งสารอื่นๆออกจากเซลล์ซึ่งสารบางอย่างเป็นพิษสำหรับสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำให้โปรตีนที่ได้บริสุทธิ์ก่อนการนำไปใช้ ข้อจำกัดดังกล่าวจึงได้มีความสนใจการผลิตแอนติเจนจากระบบอื่น เช่น ในพืช เนื่องจากพืชสามารถสังเคราะห์อาหารเองได้ มีการฝากถ่ายยีนเข้าสู่ระบบพืช ในปี 1990 Arntzen มีจุดประสงค์ในการพัฒนาการผลิตวัคซีนโดยทำการตัดต่อยีนเข้าสู่พืช ข้อดีคือพืชสามารถเจริญได้ตามธรรมชาติในท้องถิ่น จะลดต้นทุนในการขนส่งและปัญหาจากการขนส่งในระยะทางที่ไกล และไม่จำเป็นต้องเก็บในที่เย็นตลอดเวลาเหมือนวัคซีนในปัจจุบัน วัคซีนที่ผลิตในพืชหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากโรคติดเชื้ออย่างอื่น จะแตกต่างจากวัคซีนที่ผลิตจากพลาสม่าของผู้ป่วยที่เป็นโรค

1995 Arntzen และคณะทำการวิจัยในการผลิตแอนติเจนจากพืช โดยทำการฝากถ่ายยีนของไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่พืชเพื่อให้สร้างโปรตีนส่วน S แล้วทำการทดลองฉีดเข้าหนูพบว่าแอนติเจนที่ได้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิร่างกายเหมือนกันแอนติเจนที่ได้จากไวรัสตับอักเสบ บี โดยตรง[27] นอกจากนี้ Mason และคณะ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของไวรัสตับอักเสบ บี ส่วน S gene โดยทำการฝากถ่ายเข้าสู่ใบยาสูบ ส่วน S gene โดยการแสดงออกถูกควบคุมด้วย CaMV promotor ซึ่งเชื่อมอยู่กับ TEV (tobacco etch virus) เป็นส่วนทำให้ การถ่ายรหัสพันธุกรรมเพิ่มขึ้น แล้วทำการฝากถ่ายเข้าสู่พืชด้วยวิธี Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation ใช้ agrobacterium strain LBA4404 หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอจากแคลลัส โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอ ตรวจสอบด้วย blot โดยใช้ probed ที่ติดสารรังสี p32 *random-primed DNA ปริมาณโปรตีนที่ได้อยู่ในช่วง 66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของโปรตีน* ในส่วนของใบพืชที่ไม่ได้รับการฝากถ่ายยีนจะไม่สามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอและโปรตีน *HBsAg* ช่วยให้โปรตีน HBsAg ที่ได้จากพืชบริสุทธิ์โดยใช้ monoclonal antibody ในปี

ตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในหนูเทียบกับ วัคซีนซึ่งเป็นแอนติเจนที่ผลิตจากยีสต์และวัคซีนที่ได้จากการสังเคราะห์เปปไทด์ส่วนของ "a"determinant ซึ่งเป็นส่วนของ S gene โดยนำพืชที่แสดงออกสร้างโปรตีนส่วน S สกัดโปรตีนแล้วทำการตรวจสอบ HBsAg โดยใช้ ELISA ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนที่ได้ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาฉีดให้หนูระยะเวลา 0,7,และ14 วัน ปริมาณแต่ละครั้ง 0.5 ไมโครกรัม การตรวจวิเคราะห์ แอนติบอดีที่หนูสร้างหลังจากฉีดโดยนำซีรัมของหนูนำมาตรวจจับกับแอนติเจน ในพืชที่ได้รับการฝากถ่ายยีนจะสร้างแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีของ IgG ทั้งหมดและมี IgM [29] นอกจากนี้ที่มีการโคลนยีนจากไวรัสตับอักเสบ บีเข้าสู่มันฝรั่ง โดย Parastoc Ehsani และคณะในปี 1996 ซึ่งได้ทำการโคลนยีน จากไวรัสตับอักเสบ แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วน preS2 เชื่อมอยู่กับ HBsAg และส่วนที่มีเฉพาะส่วนHBsAg อย่างเดียว แล้วทำการตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด pCAMV ซึ่งมี 35S promotor นำพลาสมิดทั้งสองชุดเข้าสู่แบคทีเรีย คือ agrobacterium แล้วเข้าสู่พืชโดยวิธี Agrobacterium-mediated tranformation ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ HBsAg ที่ได้จากการฝากถ่ายยีนเข้าสู่มันฝรั่งการแสดงออกของ HBsAg โดยใช้ ELISA โดยแอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีที่เป็น monoclonal ที่ได้จากซีรัมของคน สกัดพืชที่ไม่ได้รับการฝากถ่ายยีนเพื่อเป็นกลุ่มควบคุม แล้วทำการสกัดพืชที่ได้รับการฝากถ่ายยีนแบ่งเป็นส่วนราก ใบและหัว หาปริมาณโปรตีนของ HBsAg พบว่าส่วนรากจะพบว่ามีการแสดงออกมากที่สุด และทำการเปรียบเทียบระหว่างส่วนของพืชที่มี พลาสมิดที่มี preS2 เชื่อมกับ HBsAg และพืชที่มีพลาสมิดที่มีเฉพาะ HBsAg อย่างเดียวจะมีการแสดงออกของโปรตีนมากที่สุด ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่เอื้ออำนวยต่อการแสดงออกของยีน ทำการวิเคราะห์ pre S2ในพืช ในการทดลองข้างต้น การวิเคราะห์โปรตีนทั้งใ S และM จากพืชที่ได้รับการฝากถ่ายจะอยู่ในรูป การเติมคาร์โบไฮเดรต[30]

เนื่องจากระบบพืชได้มีการศึกษากันมากแล้วดังจะเห็นในรายงาน ทำให้การศึกษาในระบบพืชจึงไม่เป็นนวตกรรมใหม่ อีกทั้งระบบพืชชั้นสูงมีความซับซ้อน จึงได้ในระบบที่มีใกล้เคียงพืชแต่มีความซับซ้อนน้อยกว่าคือระบบ สาหร่าย ซึ่งสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือสาหร่าย *Dunaliella sp.* ข้อได้เปรียบของการเลี้ยงสาหร่ายดูนาลิเอลลลาเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่นคือ

- สาหร่ายสามารถสร้างอาหารโดยขบวนการสังเคราะห์แสงได้
- สาหร่ายชนิดนี้สามารถสะสมเบตาคาโรทีนได้ในปริมาณสูง
- *Dunaliella sp.*สามารถเจริญได้ดีในน้ำที่มีความเค็มสูง ทำให้ลดโอกาสปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆได้ทำให้เลี้ยงในบ่อขนาดใหญ่ได้
- นอกจากนั้นสาหร่าย *Dunaliella sp.*ยังมีสารอย่างอื่นที่มีประโยชน์เช่น โปรตีน glyceral ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้[31]

- สามารถแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว สามารถผลิตแอนติเจนได้มาก
- เป็นสาหร่ายที่เลี้ยงเพื่อผลิตเป็นอุตสาหกรรมอาหารเสริม
- และเป็นประโยชน์เนื่องจากระบบการผลิตแอนติเจนจากสาหร่ายนี้ยังมีผู้ให้ความสนใจน้อยมาก จึงเป็นแรงจูงใจในการศึกษาเพราะเป็นนวตกรรมใหม่ในการฝากถ่ายยีนเข้าสู่ระบบสาหร่าย

ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella sp.* เพื่อผลิตเบตาคาโรทีนในระดับอุตสาหกรรมมีอยู่หลายประเทศ เช่น อิสราเอล ออสเตรเลีย สำหรับอาหารเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella sp* ที่มีการศึกษาในปี 1999 โดย Kenichiro [32] เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายที่มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นได้ทำการหาสูตรอาหารที่สาหร่ายสามารถเจริญได้ดีและมีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต และได้ทำการศึกษาการฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่าย แต่เนื่องจากระบบนี้ยังมีการศึกษากันน้อยมากจึงได้ทำการทดลองฝากถ่ายยีนที่เป็น Marker gene ที่สำคัญนิยมใช้ในปัจจุบันด้วยคือ Green Fluorescent Protein (GFP) เพื่อเป็นตัวทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการฝากถ่ายยีนไวรัสตับอักเสบ บี เข้าสู่สาหร่าย เนื่องจากยีน GFP เป็นยีนที่จะบ่งบอกว่าให้ทราบว่าการแสดงออกมีมากน้อยและในเนื้อเยื่อใด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่ายเนื่องจาก GFP จะปล่อยแสงสีเขียวความยาวคลื่นที่ 509 นาโนเมตร ภายใต้การกระตุ้นของแสง UV

ในปัจจุบันนี้ยีน GFP ซึ่งเป็นยีนที่ได้จากแมงกะพรุน Aequorea victoria เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 238 ตัวมีขนาด 27 kDa เมื่อโปรตีนได้รับการกระตุ้นจาก Ca^{2++} เกิดกลไกทำให้ GFP ปล่อยพลังงานแสงสีเขียวซึ่งสามารถตรวจภายใต้แสง UV มีการใช้ GFP ในสิ่งมีชีวิตครั้งแรกในปี 1991 โดย Chalfie และ Coworkers ใช้เป็น Marker ใน Caenorhabditis elegans[33] ในปี 1994 Chalfie และคณะได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ GFPใน *E.coli* เนื่องจากการตรวจสอบ GFP สามารถตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว อีกทั้งไม่ต้องทำลายเซลล์เหมือนการตรวจสอบยีน GUS นอกจากการฝากถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายเซลล์เดียวแล้วยังมีการศึกษาในสาหร่ายหลายเซลล์ในปี 1994 โดย Armin Hallmann และคณะทำการศึกษาการแสดงออกใน volvox[34] ทำการโคลนยีน arylsulfatase ซึ่งเป็นยีนในการสร้าง เอนไซม์ที่ตัด sulfate จากสารประกอบ aromatic ซึ่งเอนไซม์จะแสดงออกภายใต้สภาวะที่ขาด sulfur และไม่มีการแสดงออกในเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มี sulfur ทำการเชื่อมยีน arylsulfatase ในพลาสมิด puc18 ทำการเพิ่มพลาสมิดและทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์โดยแยกใน CsCl gradient ทำการฝากถ่ายยีนเข้าสู่ volvox carteri โดยวิธี flowing hellium bombard cell โดยดีเอ็นเอจะเคลือบอยู่ที่กระสุนทองคำ หลังจากการฝากถ่ายยีนแล้วนำ volvox ไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือก ซึ่งไม่มี NH_4Cl ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลล์เซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงแล้วเลี้ยงเซลล์ที่ได้

ในอาหารคัดเลือกสำหรับ volvox ทำการวิเคราะห์ปฏิกิริยา arylsulfatease ในvolvox ที่ได้รับการฝากถ่ายยีน 500 ไมโครลิตรจะทำปฏิกิริยากับ 30Mm 5-bromo-4 chloro-3 indolyl sulfate ได้สีฟ้า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย