บทที่ 3

เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และ วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการผลิตโปรตีนสารพิษ Mtx2

3.1.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

แบคทีเรีย *E. coli* JM109 และ

พลาสมิด pGEX-tMtx2 (Rungrod et al., 2009)

คอลัมน์สกัดแยกโปรตีนบริสุทธิ์ Affinity column

GSTrap™ FF 5 ml GE Healthcare

Acrodisc™ Syringe Filters PALL Corporation

หลอดฉีด (Syringe) 10 ml และ 20 ml NIPRO

Amicon Ultra-15 Millipore Corporation

ขาตั้ง

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) BINDER

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

ตู้ปลอดเชื้อ NUAIRE™ Class II model NU-440

ลวดเขี่ยเชื้อ

เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ

(Refrigerated centrifuge) Jouan

เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง

(Ultrasonicator) Vibracell

เครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Microplate reader)

ชุดวัดปริมาณโปรตีน D_C Protein Assay BIO-RAD

3.1.1.2 สารเคมี

Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside -

(IPTG)

LB Broth Ultrapure	USB Corporation
Ampicillin	BIO BASIC INC.
Sodium chloride	CARLO ERBA REAGENTS
Potassium chloride	SIGMA
Sodium phosphate	SIGMA
Potassium phosphate	SIGMA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane, - Ultrapure, MB Grade	USB Corporation
Glutathione(reduced form)	SERVA
Guanidine hydrochloride, Ultrapure, MB Grade	USB Corporation
Ethanol	MERCK
Bovine serum albumin (BSA)	Innova

3.1.2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการเตรียม Brush Border Membrane Fraction (BBMF)

3.1.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

อุปกรณ์บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer)

อ่างเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (Sonic bath)

เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)

ห้องควบคุมอุณหภูมิ

กระบะเลี้ยง

ไข่ยุงลาย *Aedes aegypti*

3.1.2.2 สารเคมี

D-Mannitol	MERCK, FLUKA
Ethyleneglycol bis(alpha-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid	
Tris-(hydroxymethyl) aminomethane	USB Corporation
Magnesium chloride, hexahydrate, ACS - Reagent	RESEARCH ORGANICS
Complete, Mini Protease Inhibitor - Cocktail Tablets	Roche

3.1.3 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36

3.1.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

Aedes albopictus, Clone C6/36 ATCC CRL-1660

ตู้ปลอดเชื้อ NUAIRE™ Class II model NU-440-400E

ตู้บ่ม CO_2 (Forma Series II Water Jacketed CO_2 Incubation)

ตู้บ่ม CO_2 ควบคุมอุณหภูมิ model BB6220 Heraeus INSTRUMENTS

Bio-Rad D_C Protein Assay BIO-RAD

เครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader)

3.1.3.2 สารเคมี

Minimum

Foetal Bovine Serum invitrogen

0.25% Trypsin-EDTA invitrogen

MEM non-essential amino acid solution -

100X SIGMA

L-Glutamine 200mM 100X invitrogen

PBS pH 7.2 Phosphate Buffered Saline -

10X invitrogen

Trypan Blue Solution Fluka

3.1.4 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

3.1.4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชุดอุปกรณ์การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค

SDS-PAGE Model AE-6530 ATTO

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า myPower300

AE-8130 ATTO

เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก

(Microcentifuge) รุ่น Biofuge pico Heraeus

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) Fisher scienctific

ปิเปตต์อัตโนมัติ (Autopipette) Eppendorff

3.1.4.2 สารเคมี

DL-Dithiothretol (DTT)	BIO BASIC INC.
N,N,N',N'-tetramethylethylene - diamine (TEMED)	BIO BASIC INC.
40% Acrylamide solution	BIO-RAD
Tris-(hydroxymethyl) aminomethane	USB Corporation
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	
Ammonium persulfate $(NH_4)_2S_2O_8$	Promega
Glacial acetic acid (CH_3COOH)	MERCK
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma

3.1.5 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2- Dimensional gel Electrophoresis (2-DE)

3.1.5.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

Ettan™ IPGphor II/3 Isoelectric Focusing Unit	GE Healthcare
Immobiline™ DryStrip pH 3-10, pH 4-7 7 cm	GE Healthcare
IPG buffer pH 3-10, pH 4-7	GE Healthcare
IPGphor Regular Strip Holder	GE Healthcare
ชุดอุปกรณ์การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE Model AE-6530	ATTO
เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า myPower300 AE-8130	ATTO

3.1.5.2 สารเคมี

Urea	
Thiourea	
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl ammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)	
Triton X-100	Research Organics
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	

Bromophenol blue	Sigma
Dithiothretol (DTT)	MERCK
Iodoacetamide (IAA)	GE Healthcare

3.1.6 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการติดตามโปรตีนด้วยเทคนิค Western blotting

3.1.6.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

Mini Trans-Blot® Cell	BIO-RAD
PROTRAN® Nitrocellulose Transfer - Membrane	Whatman®
เครื่องเขย่าขนาดเล็ก (shaker) รุ่น ORBIT LS	Labnet

3.1.6.2 สารเคมี

Non-fat dry milk (Skimmed milk)

Anti-Mtx2 antibody

Anti-Rabbit IgG (Whole molecule) - Alkaline Phosphatase Conjugate	SIGMA

5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)

4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT)

Tween-20	Bio Basic

3.1.7 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

3.1.7.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

Bruker Ultraflex III Maldi-Tof	Bruker
HTCultra	Bruker

อ่างบ่มควบคุมอุณหภูมิ

ฐานข้อมูล NCBI จาก Mascot (www.matrixscience.com)

3.1.7.2 สารเคมี

Trypsin

Trifluoroacetic acid

Methanol

Glacial acetic acid	
Acetonitrile (ACN)	
Ammonium bicarbonate	
DL-Dithiothretol (DTT)	MERCK
Iodoacetamide (IAA)	GE Healthcare

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การผลิตโปรตีนสารพิษ Mtx2

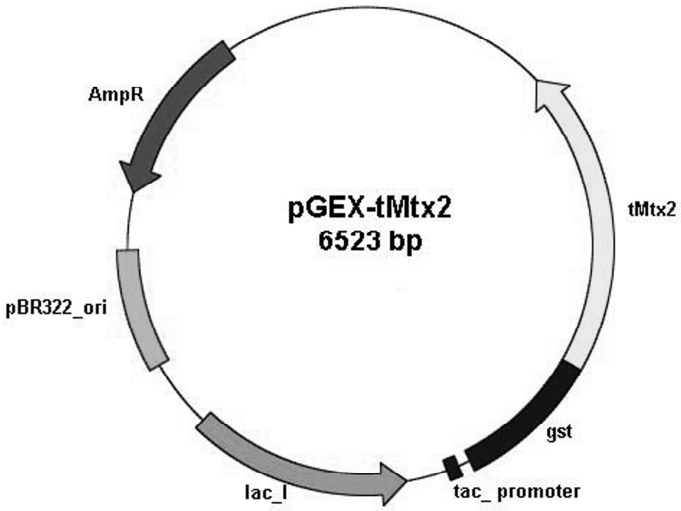
3.2.1.1 การแสดงออกของแบคทีเรีย *Escherichia coli* JM109+pGEX-tMtx2

กระบวนการผลิตโปรตีนสารพิษ Mtx2 สำหรับการศึกษานี้เริ่มจากการทำให้แบคทีเรีย *E. coli* JM109+pGEX-tMtx2 ดังแสดงในภาพที่ 6 มีการแสดงออกของยีนสำหรับโปรตีน GST-tMtx2 ซึ่งเป็นโปรตีนเชื่อมต่อ (fusion protein) ระหว่างโปรตีน GST และ โปรตีน truncated Mtx2 (ลำดับกรดอะมิโน 16-292) โดยแบคทีเรียที่บรรจุพลาสมิดดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมจุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (Rungrod et al., 2009)

ภาพที่ 6

พลาสมิดสายผสม pGEX-tMtx2

พลาสมิดสายผสม pGEX-tMtx2 ประกอบด้วย pBR322 ori ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการจำลองดีเอ็นเอ ยีนสำหรับการแสดงออกของโปรตีน GST และ tMtx2 ยีน AmpR ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อแอมพิซิลิน การแสดงออกของ GST-tMtx2 อยู่ภายใต้การควบคุมของ tac promoter



ที่มา: Rungrod, 2009

แบคทีเรีย *E. coli* JM109-pGEX-tMtx2 จะถูกกระตุ้นให้มีการเจริญในอาหารเหลว โดยการเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียบนจานเลี้ยงอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) agar ที่ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicilin) เข้มข้น 100μg/ml จากนั้นจึงทำการเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวดังกล่าวในขวดรูปชมพูซึ่งบรรจุอาหารเหลว LB medium ที่ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เข้มข้น 100μg/ml ภายในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (rpm) แบคทีเรีย *E. coli* JM109-pGEX-tMtx2 ที่ได้จากขั้นตอนนี้จะถูกนำไปใช้เป็นตัวเริ่มต้น (starter) สำหรับขั้นตอนต่อไป

จากนั้นจึงทำการเลี้ยงแบคทีเรียตัวเริ่มต้น (starter) ในขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุอาหารเหลว LB medium ที่ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เข้มข้น 100μg/ml ภายในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เมื่อแบคทีเรียมีการ

เจริญเข้าสู่ระยะ mid-Log phase ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะแก่การชักนำให้แบคทีเรียมีการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการ ซึ่งสามารถทราบได้โดยการนำแบคทีเรียไปทำการวัดค่าการดูดคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ซึ่งจะได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5 หลังจากนั้นจึงทำการเติมสาร isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1mM) เพื่อชักนำให้แบคทีเรียมีการเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน GST-tMtx2 จากนั้นจึงทำการเลี้ยงแบคทีเรียภายในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ด้วยอุณหภูมิ 25 °C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการชักนำให้แบคทีเรียมีการแสดงออกด้วยสาร IPTG สามารถกระทำได้ในช่วงเวลา 6-24 ชั่วโมง ขึ้นกับลักษณะของโปรตีน GST-tMtx2 ที่ต้องการนำไปใช้ในการศึกษา โดยในธรรมชาติแบคทีเรีย *B. sphaericus* จะผลิตโปรตีนสารพิษ Mtx2 ที่มีความสามารถในการละลายได้ (soluble protein) ซึ่งหากในขั้นตอนการชักนำให้แบคทีเรีย *E. coli* JM109-pGEX-tMtx2 มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 มีการใช้ระยะเวลายาวนานมากขึ้นส่งผลให้แบคทีเรียมีการผลิตโปรตีน GST-tMtx2 อย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณมากขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้โปรตีน GST-tMtx2 มีการจับกลุ่มกันและเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรตีนให้อยู่ในโครงสร้างที่สามารถละลายได้ยาก (inclusion) ซึ่งเมื่อครบกำหนดตามระยะเวลาที่ต้องการจึงทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการนำแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารเหลวมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้ได้ทำการเก็บแบคทีเรีย *E. coli* JM109-pGEX-tMtx2 ที่ไม่ถูกชักนำให้มีการแสดงออก และ ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 เพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลโพลิอะคริลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250

3.2.1.2 การสกัดแยกโปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์

ตะกอนเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* JM109-pGEX-tMtx2 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMtx2 จะถูกแขวนลอย (re-suspension) ในสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate-Buffered Saline (PBS) (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 1.8mM KH_2PO_4, pH 7.4) จากนั้นจึงทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (เวลา 4 นาที : ช่วงเวลาปล่อยคลื่นเสียง (pulse on) 9.9 วินาที : ช่วงเวลาหยุด (pulse off) 9.9 วินาที : ระดับพลังงานของคลื่นเสียง (Amplitude) 60%) เพื่อทำให้โปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและถูกเก็บไว้ภายในเซลล์ถูกปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งสารสกัดโปรตีนทั้งหมดจะถูกแยกออกจากส่วนที่เป็นตะกอนเยื่อหุ้ม

เซลล์ของแบคทีเรียได้โดยทำการปั่นเหวี่ยงสิ่งแขวนลอยทั้งหมดด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 12,000 x g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นจึงทำการแยกโปรตีน GST-tMtx2 ออกจากสารสกัดโปรตีนทั้งหมดด้วยคอลัมน์ GSTrap FF (GE Healthcare) กระบวนการต่างๆในขั้นตอนนี้ต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษคือหลอดฉีด (syringe) และตัวกรอง (filter) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการปล่อยสารละลายบัฟเฟอร์หรือสารสกัดผ่านเข้าไปยังภายในคอลัมน์และกรองฝุ่นละอองหรือตะกอนต่างๆที่ปะปนอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์หรือสารสกัดโปรตีน ตามลำดับ ขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน GST-tMtx2 เริ่มจากการทำความสะอาดภายในคอลัมน์ด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 จากนั้นจึงทำการผ่านสารสกัดโปรตีนทั้งหมดไปยังภายในคอลัมน์อย่างช้าๆ (อัตราเร็วประมาณ 1-5ml/min) โดยเมื่อทำการผ่านสารสกัดโปรตีนไปได้ปริมาณหนึ่ง (ประมาณ 5 ml ซึ่งเป็นปริมาตรของคอลัมน์ GSTrap FF) จึงให้เวลาเพื่อปล่อยให้โมเลกุลของโปรตีน GST-tMtx2 จับกับแมทริกซ์ซึ่งถูกเคลือบด้วย Glutathione (γ-glutamylcysteinylglycine) ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ในขณะที่โมเลกุลโปรตีนอื่นๆที่ไม่สามารถจับกับแมทริกซ์ของคอลัมน์จะถูกปล่อยออกมาสู่ภายนอก ภายหลังจากการผ่านสารสกัดทั้งหมด จึงทำการผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ปริมาตรประมาณ 50 ml ไปยังภายในคอลัมน์ด้วยอัตราที่เร็วขึ้น (อัตราเร็วประมาณ 5-10ml/min) เพื่อเป็นการกำจัดโมเลกุลโปรตีนอื่นๆที่ยังอาจหลงเหลืออยู่ภายในคอลัมน์ จากนั้นจึงทำการแยกโปรตีน GST-tMtx2 ออกจากคอลัมน์โดยการผ่านสารละลายของ Glutathione ที่อยู่ในโครงสร้าง reduced form (50mM Tris-HCl, 10mM reduced Glutathione, pH 8.0) เข้าไปภายในคอลัมน์ (อัตราเร็วประมาณ 5-10ml/min) ซึ่งจะทำให้โปรตีน GST-tMtx2 ถูกชะออกจากคอลัมน์ อย่างไรก็ตามสารสกัดโปรตีน GST-tMtx2 ที่ได้จากขั้นตอนนี้อาจมีโมเลกุลของ Glutathione ปะปนออกมาโดยการจับกับโปรตีน GST ซึ่งโมเลกุล Glutathione ดังกล่าว สามารถกำจัดได้โดยนำสารสกัดโปรตีน GST-tMtx2 มาผ่านขั้นตอนการ dilution และ filtration โดยทำการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ด้วยหลอด Amicon Ultra-15 โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 2,500 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C

ภายหลังจากการสกัดแยกโปรตีน GST-tMtx2 บริสุทธิ์ โปรตีน GST ซึ่งเป็นโปรตีนติดตาม (tag protein) จะถูกตัดออกจากโปรตีน tMtx2 โดยการเติมเอนไซม์ทรอมบิน (Thrombin) (10U/mg protein) ลงไปในสารสกัดโปรตีน GST-tMtx2 และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 22-25 °C เป็นเวลา 2-16 ชั่วโมง ซึ่งในขั้นตอนนี้ผู้ศึกษาจะต้องทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน GST-tMtx2 ที่ได้จากการสกัดแยกในขั้นตอนแรก เพื่อนำค่าความเข้มข้นของโปรตีนมาใช้ในการคำนวณปริมาณ

เอนไซม์ทรอมบินที่จะใช้ ซึ่งวิธีการวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนจะได้อธิบายในหัวข้อ “การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน GST-tMtx2 และ โปรตีน tMtx2” จากนั้นจึงนำสารสกัดโปรตีน GST-tMtx2 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ทรอมบินไปผ่านขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ GSTrap FF อีกครั้ง ซึ่งจะทำให้มีเพียงโปรตีน GST เท่านั้นที่ถูกตรึงอยู่กับแมทริกซ์ภายในคอลัมน์ ในขณะที่โปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์จะถูกชะออกจากคอลัมน์ จากนั้นจึงทำการแยกโปรตีน GST ออกจากคอลัมน์โดยการผ่านสารละลาย reduced-GSH ไปยังภายในคอลัมน์ ซึ่งจะส่งผลให้โปรตีน GST ถูกชะออกจากคอลัมน์เช่นกัน สารสกัดที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในกระบวนการสกัดแยกโปรตีน GST-tMtx2 และ โปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลโพลิอะคริลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250

3.2.1.3 การวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างจากขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน GST-tMtx2 และ โปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ตัวอย่างโปรตีนจากขั้นตอนการแสดงออกของแบคทีเรีย *E. coli* JM109-pGEX-tMtx2 และขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน GST-tMtx2 และ โปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ จะถูกนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยกระบวนการวิเคราะห์เริ่มจากการเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์ที่ประกอบด้วยสารเคมีและสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1

ส่วนประกอบในการเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

สารเคมี	**ปริมาตร (ml)**
Separating (Resolving) gel (12%) 10 ml (สำหรับ 1 เจล):	
• Steriled distilled water	3.3
• 1.5M Tris-HCl pH 8.8 (containing 0.4%SDS)	1.9
• 40% Acrylamide solution (Acrylamide:Bis-Acrylamide=29:1)	2.25
• 10% Ammonium persulfate	0.05
• TEMED	0.005

Stacking gel (สำหรับ 1 เจล): • Steriled distilled water • 1.5M Tris-HCl pH 8.8 (containing 0.4%SDS) • 40% Acrylamide solution (Acrylamide:Bis-Acrylamide=29:1) • 10% Ammonium persulfate • TEMED	1.65 0.625 0.2 0.03 0.003

ที่มา : ดัดแปลงวิธีการเตรียมจาก Sambrook and Russell, 2001

ในขั้นตอนการเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์ เมื่อทำการผสมสารละลายบัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Separating gel จึงทำการรินส่วนผสมดังกล่าวลงในกระจกแก้วสำหรับเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์ ซึ่งจะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิยาโพลิเมอไรเซชัน (polymerization) ระหว่าง Acrylamide และ N,N'-methylene-bis-acrylamide ประมาณ 30 นาที จากนั้นจึงทำการผสมสารละลายบัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Stacking gel และรินส่วนผสมดังกล่าวทับลงบนส่วนที่เป็น Separating gel ที่เกิดการโพลิเมอไรซ์อย่างสมบูรณ์แล้ว หลังจากนั้นจึงทำการเสียบอุปกรณ์ซึ่งมีลักษณะคล้ายหวี (comb) ลงไปภายในส่วนที่เป็น Stacking gel เจลในส่วนนี้จะใช้เวลาประมาณ 30 นาทีเช่นกันในการเกิดปฏิกิยาโพลิเมอไรเซชัน (polymerization) เมื่อปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างสมบูรณแล้ว จึงทำการดึงอุปกรณ์ลักษณะคล้ายหวีออกจากเจล ซึ่งจะเกิดเป็นช่องว่างรูปร่างสีเหลี่ยมผืนผ้าสำหรับใช้ในการเติมโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

ภายหลังจากการเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์ จึงทำการผสมตัวอย่างกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (1X SDS gel-loading buffer (50mM Tris-Cl (pH 6.8), 100mM DTT, 2% (W/V) SDS, 0.1 Bromophenol blue, 10% (V/V) glycerol) และทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน โดยการต้มโปรตีนตัวอย่างที่ผสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในน้ำเดือด (100 °C) เป็นเวลา 5 นาที และจึงนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดตะกอนที่ไม่ละลายในสารละลายโปรตีนตัวอย่างออกไป หลังจากนั้นเติมโปรตีนตัวอย่างลงไปยังช่องว่างภายในเจลโพลิอะคริลาไมด์ตามลำดับที่ต้องการ และเสียบสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยจะให้กระแสไฟฟ้า 120 V สำหรับการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ เมื่อโปรตีนมีการเคลื่อนที่ไปจนถึงส่วนล่างสุดของ Separating gel ซึ่งสามารถสังเกตได้จากสีของ Bromophenol blue ในสารละลายสำหรับ

ตัวอย่าง จึงหยุดการจ่ายกระแสไฟ หลังจากนั้นจึงตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลโพลิอะคริลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250

3.2.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน GST-tMtx2 และโปรตีน tMtx2

ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ Bio-Rad D_C Protein Assay ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะมีความคล้ายคลึงกับการวัดความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างด้วย Lowry assay อย่างไรก็ตามหลักการพื้นฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Bio-Rad D_C Protein Assay เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับสารละลาย Alkaline copper tartrate และสาร Folin โดยปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นในสองขั้นตอน ประกอบด้วยปฏิกิริยาเริ่มต้นซึ่งเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับโมเลกุลของ copper ในสารละลาย Alkaline ตามด้วยการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของสาร Folin โดยโมเลกุลโปรตีนที่เกิดปฏิกิริยากับโมเลกุล copper ในปฏิกิริยาเริ่มต้น ซึ่งทำให้เกิดสีที่สามารถสังเกตเห็นได้ โดยปฏิกิริยาการเกิดสีดังกล่าวเป็นผลจากการที่กรดอะมิโนไทโรซิน (Tyrosine) ทริปโตแฟน (Tryptophan) ซิสเทอิน (Cystein) และฮิสทิดิน (Histidine) ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไปมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของสาร Folin ซึ่งมีผลทำให้สาร Folin มีการสูญเสียอะตอมของออกซิเจนจำนวน 1-3 อะตอม ซึ่งจะทำให้เกิดระดับของสีน้ำเงินที่แตกต่างกัน โดยสามารถทำการวัดค่าการดูดกลืนแสดงได้ในช่วง 405-750 nm

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน tMtx2 ด้วย Bio-Rad D_C Protein Assay เริ่มจากการเตรียมโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งในการศึกษานี้ได้เลือกใช้โปรตีน Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยจะทำการเตรียมโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 mg/ml ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการเติมโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ สารละลายบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 (blank) รวมทั้งโปรตีน tMtx2 ในปริมาณ 5 µl ลงในแต่ละหลุมของถาด 96 หลุม (96 wells plate) หลังจากนั้นจึงเติมสาร A (Reagent A: an alkaline copper tartrate solution) ปริมาณ 25 µl และ สาร B (Reagent B: a dilute Folin Reagent) ปริมาณ 200 µl ตามลำดับ ผสมสารทุกอย่างในแต่ละหลุมให้เข้ากันและทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 15 นาที จึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาการเกิดสีดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่มีความเสถียรอยู่ในระดับหนึ่ง ซึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อนประมาณ 5% หรือ 10% หากทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 1 ชั่วโมง หรือ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ ภายหลังจากการเติมสาร A และสาร B ลงไปในระบบ

ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน BSA ซึ่งได้จากการวัดที่ความยาวคลื่น 750 nm ที่ความเข้มข้นต่างๆจะถูกนำมาสร้างเป็นสมการของโปรตีนมาตรฐาน (standard curve equation) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน GST-tMtx2 และ โปรตีน tMtx2 ได้

3.2.2 การเตรียม Brush Border Membrane Fraction (BBMF)

ถึงแม้ว่าจากการทดสอบความสามารถในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ Mtx2 จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* พบว่าสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex*) ได้ดี (Thanabalu and Poter, 1996) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *B. sphaericus* บางสายพันธุ์ เช่น *B. sphaericus* สายพันธุ์ 2297 มีการสังเคราะห์โปรตีนสารพิษ Mtx2 ที่มีประสิทธิภาพในการแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes* หรือ *Stegomyia*) ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญ โดยในการศึกษานี้เป็นโปรตีน Mtx2 จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* สายพันธุ์ 2297 ดังนั้นจึงเลือกใช้ลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ในการศึกษาหาโปรตีนตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษ Mtx2 จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* สำหรับการศึกษานี้ ซึ่งในการเตรียม Brush border membrane fraction จะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆดังนี้

3.2.2.1 การฟักไข่และการเลี้ยงลูกน้ำยุง

การฟักไข่ยุงสามารถทำได้โดยการนำไข่ของยุงลาย *Aedes aegypti* แช่ลงในกระบะขนาด 30 x 50 x 15 cm ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 2 ลิตร เมื่อลูกน้ำยุงฟักจากออกจากไข่จึงทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C โดยให้อาหารอย่างเพียงพอ อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาสามารถทำการเลี้ยงลูกน้ำยุงได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 25-30 °C โดยอัตราการเจริญเติบโตของลูกน้ำยุงจะแปรผันตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น เนื่องจากสภาวะอากาศร้อนและอบอุ่นเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนประชากรของยุง ลูกน้ำยุงเมื่อฟักออกจากไข่จะมีขนาดเล็กและจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อมีการลอกคราบ โดยวงจรชีวิตของยุงที่อยู่ในระยะที่เป็นลูกน้ำจะมีการลอกคราบ 4 ครั้ง ก่อนที่จะมีการเจริญเข้าสู่ระยะตัวโม่ง (pupa) ซึ่งจะสามารถแบ่งการเจริญของลูกน้ำยุงออกเป็น 4 ระยะ โดย ลูกน้ำแรกฟักออกจากไข่ ลูกน้ำที่มีการลอกคราบครั้งที่ 1 ครั้งที่ 2 ครั้งที่ 3 และ ครั้งที่ 4 คือ ลูกน้ำที่มีการเจริญอยู่ในระยะที่ 1 ระยะที่ 2 ระยะที่ 3 และ ระยะที่ 4 ตามลำดับ เมื่อลูกน้ำยุงเจริญเข้าสู่ระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะที่ลูกน้ำยุงมีขนาดเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษา จึงทำการแยกลูกน้ำยุงออกจากอาหาร โดยจะให้ลูกน้ำยุงอดอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันไม่ให้มีเศษอาหารตกค้างอยู่ภายในกระเพาะอาหารของลูกน้ำยุง จากนั้นจึงทำการเก็บลูกน้ำยุงในขั้นตอนการเก็บอาจใช้อุปกรณ์ดูดอากาศ (Vacuum pump) เพื่อกำจัดน้ำ

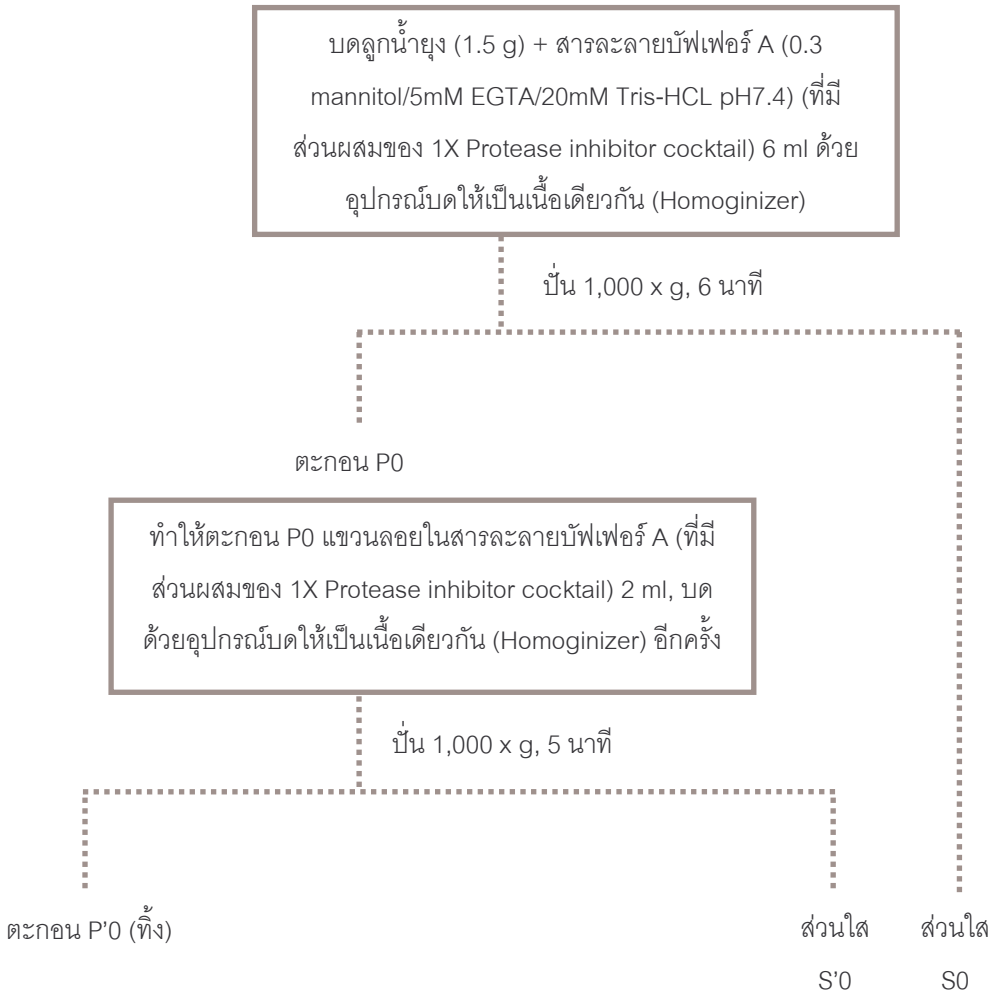
ออกให้หมด คงเหลือแต่เพียงตัวของลูกน้ำยุงเท่านั้น แล้วจึงทำการเก็บลูกน้ำยุงในหลอดขนาด 1.5 ml โดยชั่งให้มีน้ำหนักของลูกน้ำยุงประมาณ 1.5 g หลังจากนั้นจึงเก็บลูกน้ำยุงดังกล่าวภายในตู้แช่เยือกแข็ง -80 °C เพื่อรอนำมาใช้ในการเตรียม BBMF สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

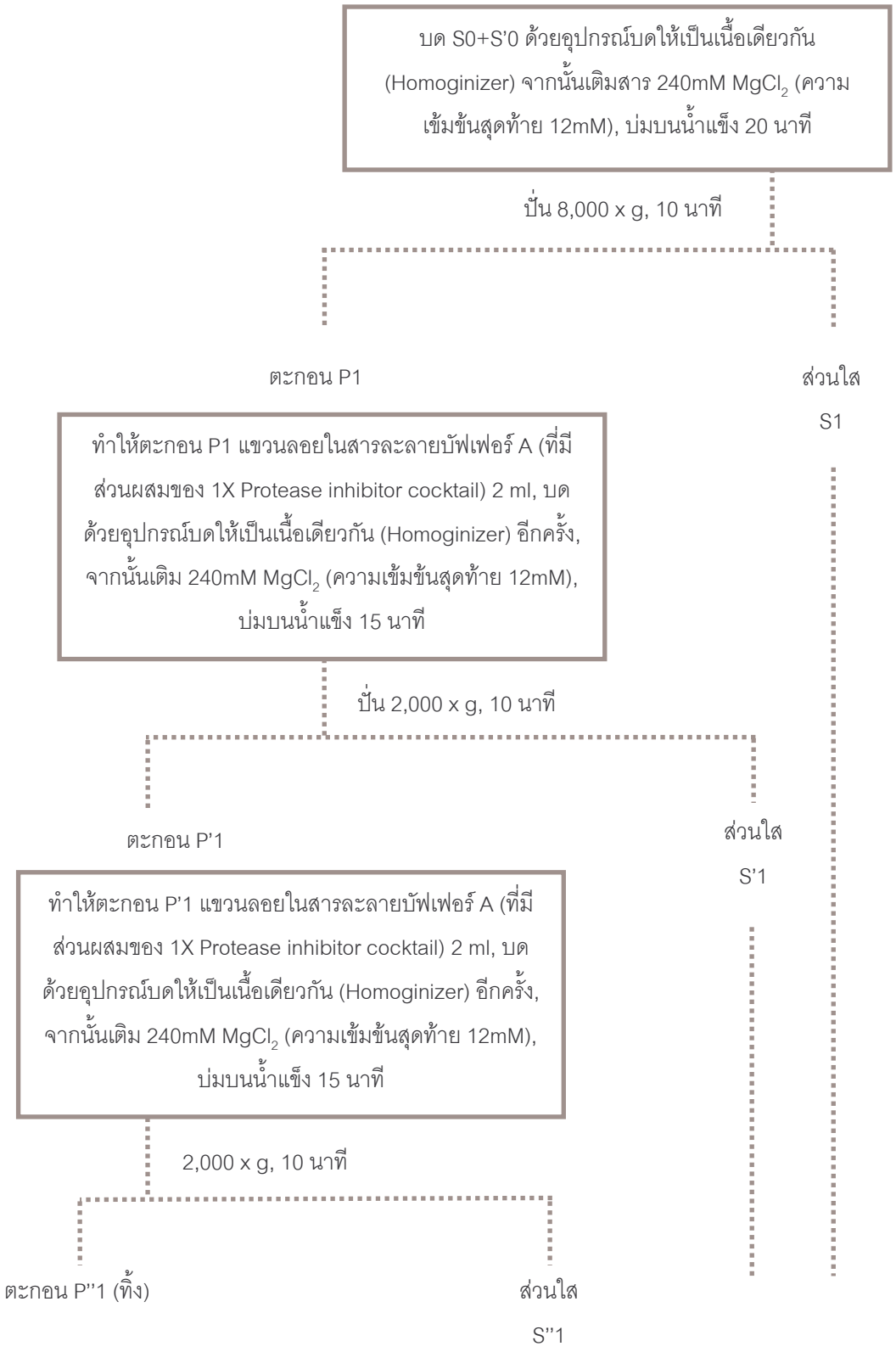
3.2.2.2 ขั้นตอนการเตรียม Brush Border Membrane Fraction (BBMF)

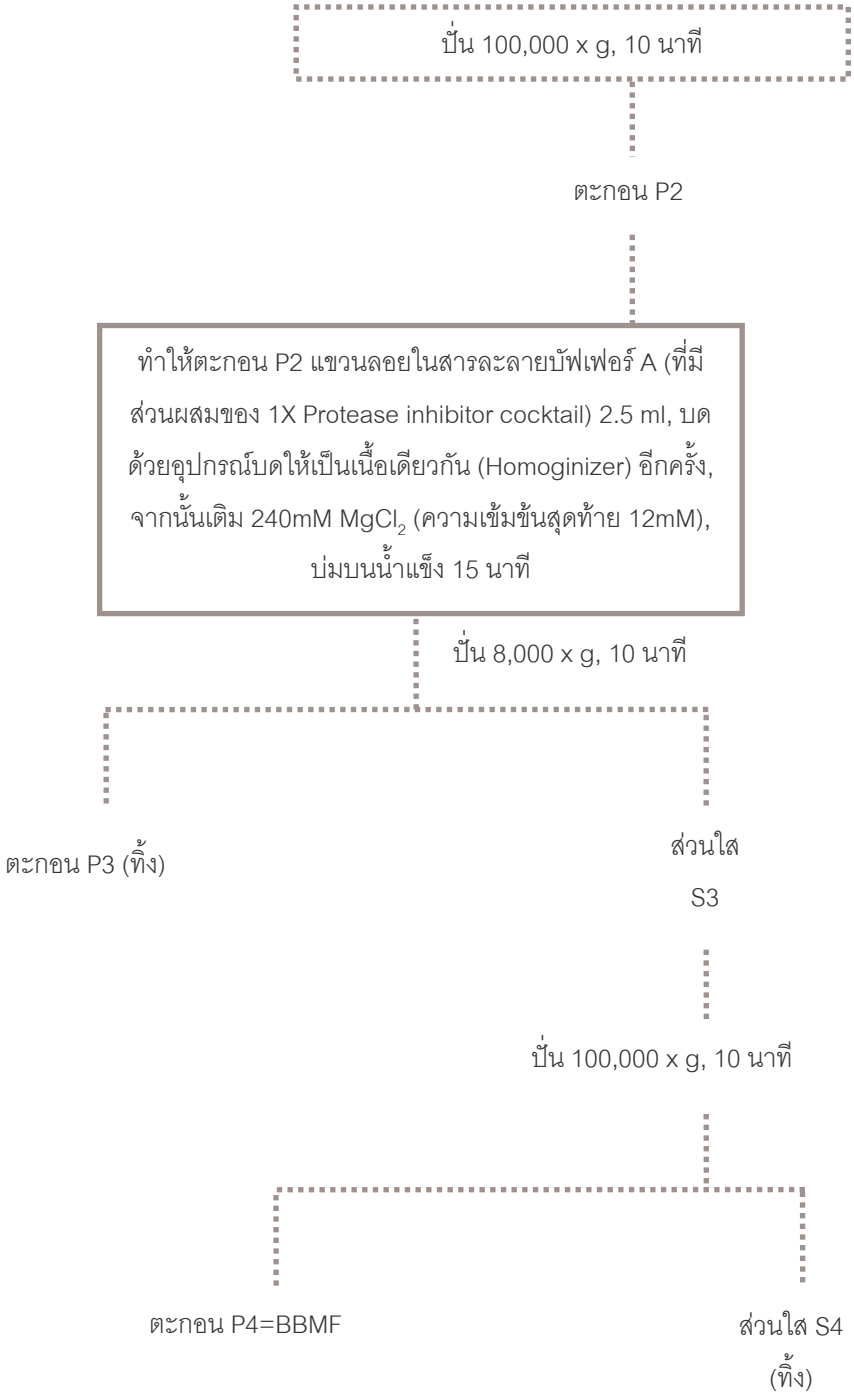
วิธีการเตรียม Brush border membrane fraction (BBMF) สำหรับใช้ในการศึกษานี้มีที่มาจาก Silva-Filha et al., 1997 ซึ่งบางขั้นตอนอาจมีการปรับตามความเหมาะสม ขั้นตอนต่างๆในการเตรียม BBMF โดยสรุป แสดงในภาพที่ 7

ภาพที่ 7

ขั้นตอนการเตรียม Brush border membrane fraction (BBMF)




บด S0+S'0 ด้วยอุปกรณ์บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homoginizer) จากนั้นเติมสาร 240mM $MgCl_2$ (ความเข้มข้นสุดท้าย 12mM), บ่มบนน้ำแข็ง 20 นาที
ปั่น 8,000 x g, 10 นาที
ตะกอน P1
ส่วนใส S1
ทำให้ตะกอน P1 แขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์ A (ที่มีส่วนผสมของ 1X Protease inhibitor cocktail) 2 ml, บดด้วยอุปกรณ์บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homoginizer) อีกครั้ง, จากนั้นเติม 240mM $MgCl_2$ (ความเข้มข้นสุดท้าย 12mM), บ่มบนน้ำแข็ง 15 นาที
ปั่น 2,000 x g, 10 นาที
ตะกอน P'1
ส่วนใส S'1
ทำให้ตะกอน P'1 แขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์ A (ที่มีส่วนผสมของ 1X Protease inhibitor cocktail) 2 ml, บดด้วยอุปกรณ์บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homoginizer) อีกครั้ง, จากนั้นเติม 240mM $MgCl_2$ (ความเข้มข้นสุดท้าย 12mM), บ่มบนน้ำแข็ง 15 นาที
2,000 x g, 10 นาที
ตะกอน P''1 (ทิ้ง)
ส่วนใส S''1



ตะกอนของ BBMF จะถูกนำมาทำให้แขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์ A (ที่มีส่วนผสมของ 1X Protease inhibitor cocktail) 100 µl โดยแบ่งเก็บในหลอดขนาด 1.5 ml หลอดละ 20 µl ภายในตู้แช่เยือกแข็ง -80 °C เพื่อรอนำมาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป อย่างไรก็ตาม โปรตีนแต่ละส่วนที่ได้จากขั้นตอนการเตรียม BBMF จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

และตรวจผลการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลโพลิอะคริลาไมด์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250

3.2.3 การวิเคราะห์โปรตีนจาก Brush Border Membrane Fraction (BBMF) ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot

BBMF ที่ได้จากการสกัดจากลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค Western blot เพื่อหาโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งในที่นี้หมายถึงโปรตีนตัวรับที่จำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษ Mtx2 อย่างไรก็ตามขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนจาก BBMF ด้วยเทคนิค SDS-PAGE สามารถกระทำได้ในลักษณะเดียวกันกับการวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างชนิดอื่นๆด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังที่ได้อธิบายในหัวข้อที่ 3.2.1.3 การวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างจากขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน GST-tMtx2 และ โปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งอาจแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์

ภายหลังจากการเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน จึงเป็นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่จะนำมาวิเคราะห์ โดย BBMF ที่ได้จากการสกัดจะถูกนำมาผสมรวมกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (1X SDS gel-loading buffer (50mM Tris-Cl (pH 6.8), 100mM DTT, 2% (W/V) SDS, 0.1 Bromophenol blue, 10% (V/V) glycerol) จากนั้นจึงนำ BBMF ที่ผสมรวมอยู่กับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างมาทำการต้มในน้ำเดือด ($100^{\circ}C$) เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้นอกจากจะเป็นการทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใน BBMF แล้ว ยังเป็นการช่วยละลายโปรตีนซึ่งมีการแทรกตัวอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ให้หลุดออกอีกด้วย จากนั้นจึงนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอนและเยื่อหุ้มเมมเบรนที่ไม่ละลายในสารละลายโปรตีนตัวอย่างซึ่งอาจขัดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนบนแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ออกไป อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ที่จะนำไปใช้ในการติดตามโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Western blot นั้น จะต้องมีการเตรียมโปรตีนสำหรับใช้เป็นตัวควบคุมทางบวก (positive control) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมผลการทดลองในแต่ละการทดลอง ดังนั้นตัวควบคุมทางบวกสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนจาก BBMF และการติดตามโปรตีนตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษ Mtx2 จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* ก็คือ โปรตีน tMtx2

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามด้วยการติดตามโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Western blot ใดๆ มีความจำเป็นจะต้องทำการเติมตัวอย่างโปรตีนด้วยลำดับที่เหมือนกันจำนวน 2 ชุด โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและตรวจหาตำแหน่งของโปรตีนที่ได้จากการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ที่มีตำแหน่งเดียวกันอยู่บนเจลโพลิอะคริลาไมด์ ซึ่งภายหลังจากการจ่ายกระแสไฟฟ้า 120 V เพื่อให้โปรตีนมีการเคลื่อนที่บนแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ และทำการหยุดการจ่ายกระแสไฟเมื่อโปรตีนมีการเคลื่อนที่ไปจนถึงส่วนล่างสุดของ Separating gel จากนั้นจึงทำการแบ่งเจลออกเป็นสองชุดตามชุดของโปรตีนตัวอย่างที่เรียงลำดับไว้บนเจลโพลิอะคริลาไมด์ โดยนำแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ของโปรตีนตัวอย่างชุดที่หนึ่งแช่ลงในสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250 เพื่อตรวจผล ในขณะที่โปรตีนบนแผ่นเจลอีกชุดหนึ่งจะถูกถ่ายโอนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยให้กระแสไฟฟ้า 100 V โดยจะทำการถ่ายโอนเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot ต่อไป

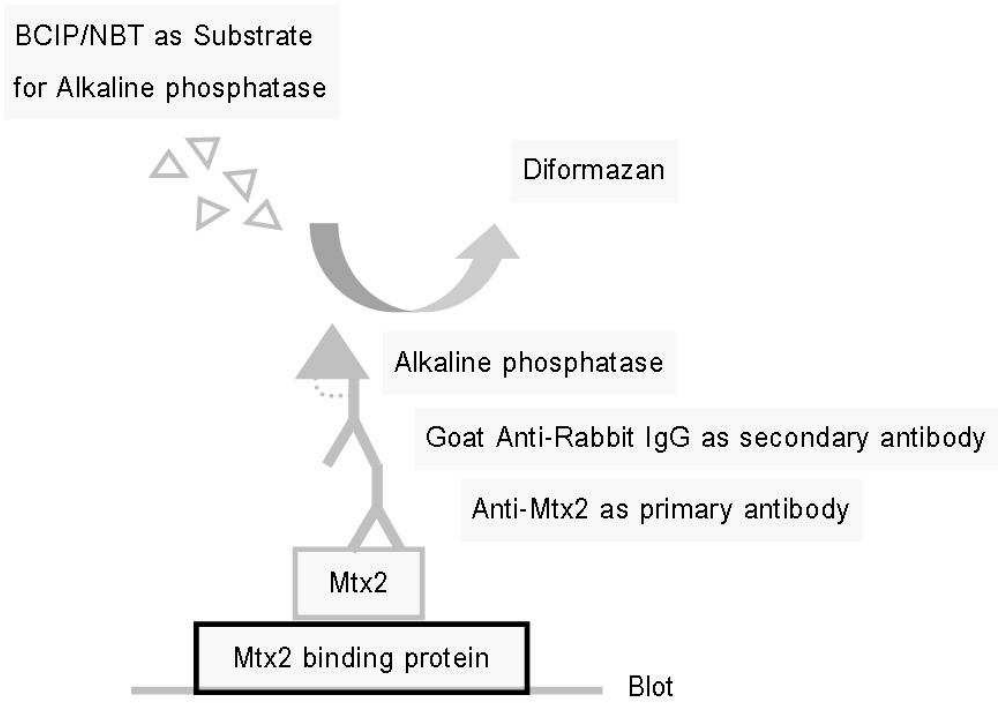
สำหรับในการศึกษานี้ซึ่งเป็นการศึกษาหาโปรตีนที่จับจำเพาะกับโปรตีนสารพิษ Mtx2 จากแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* ดังนั้นในการติดตามโปรตีนจับจำเพาะดังกล่าวสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค Western blot โดยโปรตีนจาก BBMF และ โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE หรือ 2D-E จะถูกถ่ายโอนลงบนแผ่นเมมเบรน ภายหลังจากการบ่มด้วยนมขาดมันเนยในสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate buffered saline (PBS) โปรตีนบนแผ่นเมมเบรนจะถูกบ่มด้วยโปรตีนสารพิษ Mtx2 ในขั้นตอนนี้โปรตีนจับจำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษ Mtx2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ต้องการตรวจหา เปรียบเสมือนเป็นแอนติเจน และจะจับกับโปรตีนสารพิษ Mtx2 ซึ่งเปรียบเสมือนเป็นแอนติบอดี อย่างจำเพาะ จากนั้นคอมเพล็กซ์ที่เกิดจากการจับกันระหว่างโปรตีนสารพิษ Mtx2 และโปรตีนตัวรับที่จำเพาะจะถูกโพรบด้วยแอนติบอดีสำหรับโปรตีนสารพิษ Mtx2 (Anti-Mtx2) ตามด้วย แอนติบอดี Goat-anti-rabbit IgG ที่ถูกเชื่อมต่อกับเอนไซม์ Alkaline phosphatase ซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติบอดีลำดับที่หนึ่ง (primary antibody) และแอนติบอดีลำดับที่สอง (secondary antibody) ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการเติมสารผสมระหว่าง 5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) และ 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) ในสารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอเนต (final dilution: 0.02% BCIP และ 0.03% NBT) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ Alkaline phosphatase

การใช้สารผสมระหว่าง BCIP และ NBT ในการทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ Alkaline phosphatase โดยเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase เกิดจากการที่เอนไซม์ Alkaline phosphatase มีการเร่งปฏิกิริยาการตัดหมู่ฟอสเฟต (phosphate group)

ออกจากโครงสร้างของ BCIP ทำให้เกิด 5-bromo-4chloro-3-indolyl hydroxide จากนั้นโมเลกุลดังกล่าวที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยาการจับกันทุกๆ สองโมเลกุล (dimerization) เกิดเป็น 5,5'-dibromo-4,4'-dichloroindigo ซึ่งเป็นตะกอนของสารประกอบที่ไม่ละลายและมีสีฟ้า โดยทุกๆ ปฏิกิริยา dimerization ที่เกิดขึ้น จะมีการปล่อยหนึ่งโมเลกุลของ Nitroblue tetrazolium เกิดเป็นตะกอนที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ของ Diformazan ดังนั้นภายหลังจากการเติมสารผสม BCIP/NBT เข้าไปในระบบ จะทำให้ทราบตำแหน่งของโปรตีนที่จับจำเพาะกับโปรตีนสารพิษ Mtx2 ได้ โดยลำดับการเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะในขั้นตอนการทำ Western blot แสดงในภาพที่ 8

ภาพที่ 8

ลำดับการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนการตรวจหาโปรตีนที่จับจำเพาะกับโปรตีนสารพิษ Mtx2 ด้วยเทคนิค Western blot



ในการตรวจหาหรือติดตามโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot ระบบในขั้นตอนการติดตามโปรตีน

เป้าหมายโดยการบ่มด้วยโปรตีน tMtx2 และแอนติบอดีต่างๆ จะถูกทำให้มีการเคลื่อนที่อยู่ตลอดเวลา เพื่อให้โมเลกุลของสิ่งที่ใช้ในการบ่มและสารละลายบัฟเฟอร์มีการหมุนเวียนและเคลื่อนที่ตลอดเวลา โดยการวางบนเครื่องเขย่า (shaker) ด้วยความเร็ว 55 rpm ซึ่งขั้นตอนการติดตามโปรตีนเป้าหมายจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆดังนี้

ภายหลังจากการถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แผ่นไนโตรเซลลูโลสดังกล่าวจะถูกวางภายในกล่องบ่ม (incubation box) จากนั้นจึงทำการบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยนมขาดมันเนย (5% skim milk in PBS) เพื่อเป็นการกำจัดพื้นที่ว่างบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยโปรตีนจากนม ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้เวลาตั้งแต่ 1 ชั่วโมง-ตลอดคืน .โดยสามารถกระทำได้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) หากทำการบ่มเพียง 1-3 ชั่วโมง แต่หากต้องการกำจัดพื้นที่ว่างให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจจำเป็นต้องใช้เวลาในการบ่มมากขึ้น ซึ่งสามารถทำการบ่มได้ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นจึงกำจัดสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยโปรตีนจากนมที่ไม่ได้จับกับแผ่นไนโตเซลลูโลสโดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TPBS (PBS pH 7.4 ทีมี Tween20 0.1%) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยโปรตีน tMtx2 (tMtx2 in PBS pH 7.4 (20µg/ml)) ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 55 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นขั้นตอนที่เป็นการทำให้โปรตีน tMtx2 จับกับโปรตีนเป้าหมายบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแผ่นไนโตรเซลลูโลสจะถูกล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TPBS เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) หลังจากนั้นจึงทำการบ่มด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยแอนติบอดี Anti-Mtx2 จากกระต่าย ซึ่งแอนติบอดีลำดับที่หนึ่ง โดยจะทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TPBS เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) หลังจากนั้นจึงทำการบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย Goat anti-rabbit IgG (Alkaline phosphatase conjugate) ซึ่งเป็นแอนติบอดีลำดับที่สอง โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา แผ่นไนโตรเซลลูโลสจะถูกล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TPBS เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ขั้นตอนต่อไปเป็นการตรวจผลการติดตามโปรตีนเป้าหมายด้วยการรินสารละลายผสมระหว่าง BCIP และ NBT ในสารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอเนต (final dilution: 0.02% BCIP และ 0.03% NBT) จากนั้นจึงตรวจผลการติดตามโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งสามารถมองเห็นเป็นแถบสีน้ำตาลของโปรตีน บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แผ่นไนโตรเซลลูโลสจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยาการเกิดสี และตากทิ้งไว้ให้แห้งก่อนทำการเก็บ

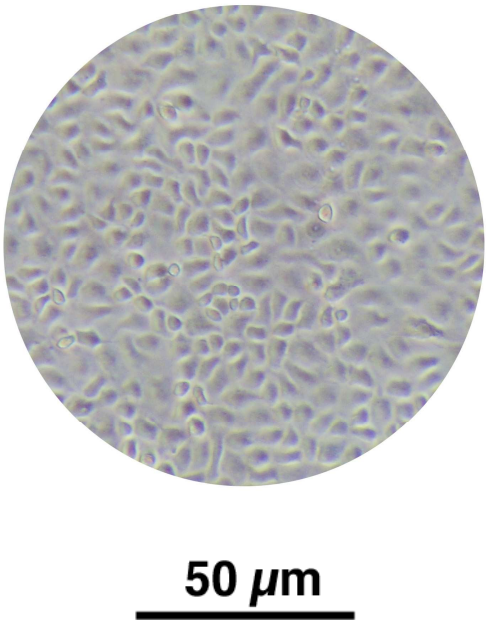
3.2.4 **การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง** *Aedes albopictus* C6/36

เซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 หรือ เซลล์เพาะเลี้ยง *Aedes albopictus* clone C6/36 (ATCC® Number: CRL-1660™) เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากเลี้ยงเซลล์ของลูกน้ำยุงทั้งตัว (whole larvae) ของลูกน้ำยุงในสกุล *Aedes albopictus* โดยโคลน C6/36 เป็นโคลนที่ถูกแยกจากเซลล์ *A. albopictus* ซึ่งถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร Eagle's MEM จากนั้นจึงทำการ cloned และ recloned โดยการเลี้ยงเซลล์เดี่ยวซึ่งแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยง (single cell suspension) บนจานเลี้ยง petri dish

เซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุกฤตยา วีระนนท์ จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์สัตว์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอนและมีการเกาะกับพื้นผิวของภาชนะ ดังแสดงในภาพที่ 9

ภาพที่ 9

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted microscope ของเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 (กำลังขยาย 40X ขนาดแถบวัด 50μm)



เซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย *Aedes albopictus* C6/36 จะถูกเลี้ยงบนขวดรูปชมพู่สำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง ขนาด 75 cm^3 ด้วยอาหาร Minimum Essential Medium (MEM ($NaHCO_3$ 1.1g/l) +10% Fetal bovine serum+2mM L-Glutamine+0.1mM Non essential amino acid) ซึ่งจะทำการเลี้ยงภายในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) ด้วยปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 28 °C

3.2.5 การวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot

การวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง C6/36 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการติดตามโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Western blot สามารถกระทำได้ในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์โปรตีนจาก BBMF อย่างไรก็ตามอาจมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและลักษณะการวิเคราะห์ ซึ่งการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง C6/36 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot ในการศึกษานี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่หนึ่ง: เป็นการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein)

การทดลองที่สอง: เป็นการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) โปรตีนที่ละลายอยู่ภายในเซลล์ (cytosolic protein) และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein)

การทดลองที่สาม: เป็นการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้น

เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์จนเต็มพื้นที่ เซลล์จะถูกแยกออกจากขวดเลี้ยงเพื่อนำมาใช้ในการศึกษา โดยในขั้นตอนแรกพื้นผิวชั้นเดียว (monolayer) ของเซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS pH 7.2 จากนั้นจึงทำการเติมเอนไซม์ทริปซิน (0.0625% Trypsin) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยง MEM ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของเอนไซม์ทริปซินลงไปในขวดเลี้ยงเพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทริปซิน จากนั้นจึงแบ่งเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยง (cell suspension) ปริมาณ ¾ ส่วนของทั้งหมด ไปใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่จะนำไปใช้ในการศึกษา ในขณะที่ ¼ ส่วนที่เหลือจะถูกเลี้ยงเพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป

เซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ซึ่งแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยง จะถูกนำมาทำให้ตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็วรอบ 2,000 x g ที่

อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนเซลล์ที่ได้จะถูกล้างด้วยน้ำกลั่นโดยการรบกวนเซลล์ให้มีการแขวนลอยในน้ำกลั่น จากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็วรอบ 2,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นจึงนำเซลล์มาทำการแขวนลอยในน้ำกลั่นอีกครั้งเพื่อทำการเก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) ในขณะเซลล์ส่วนที่เหลือจะถูกนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เสียงความถี่สูง และถูกปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็วรอบ 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งจะได้ส่วนใส (supernatant) และส่วนตะกอน (pellet) ซึ่งคือ โปรตีนที่ละลายอยู่ภายในเซลล์ (cytosolic protein) และ โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) ตามลำดับ จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot ดังที่ได้อธิบายในหัวข้อที่ 3.2.3 การวิเคราะห์โปรตีนจาก Brush border membrane fraction (BBMF) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot

3.2.6 การวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง *Aedes albopictus* C6/36 ด้วยเทคนิค 2-Dimensional gel Electrophoresis (2-DE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot

ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2D-E ตามด้วยการติดตามโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Western blot จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างเดียวกันซ้ำ 2 ชุด เนื่องจากจะต้องมีโปรตีนจากเจลหนึ่งถูกทำการถ่ายโอนไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสเพื่อติดตามโปรตีนเป้าหมายด้วยการทำ Western blot ในขณะที่อีกเจลหนึ่งจะถูกนำไปย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 เพื่อตรวจผลการวิเคราะห์ค่า pI และ น้ำหนักโมเลกุล ของโปรตีนแต่ละโมเลกุล

โดยในการศึกษานี้ โปรตีนตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง C6/36 (cell membrane proteins) ซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophilic ซึ่งยื่นออกสู่ภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ และ โครงสร้างส่วนที่เป็น hydrophobic ซึ่งฝังอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นภายหลังจากการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ (ในกรณีที่ตัวอย่างคือเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง C6/36) การละลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อาจทำได้โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารชะล้าง (detergent) เช่น 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) Triton X-100 และ Sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการละลายโมเลกุลไขมัน และจะเข้าแทนที่โมเลกุลไขมันนั้น ส่งผลทำให้โปรตีนอยู่ในรูปที่สามารถละลายได้

นอกจากนี้สารละลายบัฟเฟอร์ยังประกอบด้วย Urea และ Thiourea ซึ่งจะทำหน้าที่ในการทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ ดังนั้นขั้นตอนการวิเคราะห์จึงเริ่มจากการละลายตะกอนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Lysis buffer (30mM Tris base, 2M Thiourea, 7M Urea, 4% CHAPS, 0.1% Triton X-100, 0.01% SDS) นำไปเขย่าโดยใช้อ่างเขย่าสารโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ตลอดคืน เพื่อให้ Lysis buffer ทำหน้าที่ในการละลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด หลังจากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงสารละลายโปรตีนใน Lysis buffer ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดตะกอนเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่ละลายออกจากสารละลายโปรตีน จากนั้นจึงผสมสารละลายโปรตีนเข้ากับสารละลายบัฟเฟอร์ Rehydration buffer (9M Urea, 4% CHAPS, 1% IPG buffer, 20mM DTT, Bromophenol blue) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดตะกอนที่ไม่ละลายที่อาจหลงเหลืออยู่ในสารละลายโปรตีนอีกครั้ง หลังจากนั้นจึงทำการเตรียมอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนในมิติที่ 1 (first dimension) ซึ่งประกอบด้วยแท่งเจล (gel strip pH 3-10L) แท่งสำหรับวางแท่งเจล และ น้ำมัน ภายหลังจากที่เสร็จจากการปั่นเหวี่ยงครั้งสุดท้าย จึงทำการดูดสารละลายโปรตีนและปล่อยลงในแท่งสำหรับวางแท่งเจล จากนั้นจึงวางแท่งเจลทับลงไปและเกลี่ยสารละลายโปรตีนให้ทั่ว หลังจากนั้นจึงทำการปิดแท่งเจลด้วยน้ำมันซึ่งเป็นการทำให้เป็นระบบปิด เพื่อป้องกันไม่ให้มีการระเหยของสารละลายโปรตีนซึ่งถูกผสมด้วยสารละลาย Rehydration buffer จากนั้นจึงทำการจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยแท่งเจลจะถูกกำหนดให้เกิดปฏิกิริยา Rehydration เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 °C ด้วยกระแสไฟฟ้า 50 μA ซึ่งจะมีการตั้งค่าต่างๆสำหรับการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนดังนี้

Step 1 Step and Hold	300 V	0.2 KVh
Step 2 Gradient	1, 000 V	0.3 KVh
Step 3 Gradient	5,000 V	4.0 KVh
Step 4 Step and Hold	5,000 V	2.0 KVh

เมื่อโปรตีนแต่ละโมเลกุลมีการเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่มีค่า pI ที่ทำให้ประจุสุทธิของโมเลกุลโปรตีนนั้นๆ เท่ากับศูนย์ ซึ่งทำให้โปรตีนแต่ละโมเลกุลหยุดการเคลื่อนที่บนแท่งเจล

หลังจากนั้นแท่งเจลจะถูกนำไปทำการปรับสภาพให้เหมาะสมที่จะนำไปทำการวิเคราะห์ในมิติที่ 2 (second dimension)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ในมิติที่ 2 (second dimension) เป็นขั้นตอนการนำโปรตีนที่ผ่านการแยกตามค่า pI ของโปรตีนแต่ละโมเลกุล มาทำการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในมิติที่ 2 โดยจำเป็นต้องมีการเตรียมเจลสำหรับที่จะใช้ในการวิเคราะห์ โดยเจลโพลิอะคริลาไมด์ที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D-E จะมีความแตกต่างกับเจลโพลิอะคริลาไมด์ที่ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE ตรงที่ไม่มีเจลในส่วนที่เป็น stacking gel ซึ่งจะถูกแทนที่ด้วยที่ว่างไว้สำหรับวางแท่งเจลที่วิเคราะห์ไปในขั้นตอนแรก การเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับการวิเคราะห์ในมิติที่ 2 ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และสารเคมีดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2

ส่วนประกอบในการเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2-DE

สารเคมี	**ปริมาตร (ml)**
Separating (Resolving) gel (10%) 20 ml (สำหรับ 2 เจล):	
• Steriled distilled water	9.68
• 1.5M Tris-HCl pH 8.8	5
• 10% SDS	0.25
• 40% Acrylamide solution (Acrylamide:Bis-Acrylamide=29:1)	5
• 10% Ammonium persulfate	0.005
• TEMED	0.2
	0.066

ที่มา : ดัดแปลงวิธีการเตรียมจาก Sambrook and Russell, 2001

จากนั้นจึงทำการปรับสภาพของแท่งเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Equilibration buffer (75mM Tris-HCl pH 8.8, 6M Urea, 30% Glycerol, SDS, Bromophenol blue) ที่ผสมด้วยสาร Dithiothreitol (DTT) 100 mg ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงทำการปรับสภาพของแท่งเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Equilibration buffer ที่ผสมด้วย Iodoacetamide (IAA) 125 mg ซึ่งจะทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) เป็นเวลา 15 นาที

เช่นกัน ซึ่งในขณะนี้แท่งเจลมีสภาพที่เหมาะสมที่จะนำมาทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปแล้ว จึงนำแท่งเจลวางลงบนโพลิอะคริลาไมด์เจลอย่างระมัดระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นระหว่างผิวแท่งเจลและเจลโพลิอะคริลาไมด์ เนื่องจากฟองอากาศอาจขัดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนบนแผ่นเจลได้ จากนั้นจึงปิดพื้นผิวด้านบนของแท่งเจลด้วยเจลอะกาโรส (agarose) ที่ผสมด้วย Bromophenol blue ซึ่งจะทำให้สามารถติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนแผ่นโพลิอะคริลาไมด์เจลได้ จากนั้นจึงทำการจ่ายกระแสไฟฟ้า 120 V เพื่อให้โมเลกุลของโปรตีนมีการเคลื่อนที่ เมื่อโปรตีนมีการเคลื่อนที่ไปจนถึงส่วนล่างสุดของ Separating gel จึงหยุดการจ่ายกระแสไฟ จากนั้นจึงนำแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ของโปรตีนตัวอย่างชุดที่หนึ่งแช่ลงในสารละลาย Fixation solution (50% (V/V) Ethanol, 2% (V/V) Phosphoric acid) เพื่อเป็นการยึดโมเลกุลโปรตีนให้คงอยู่ภายในเจล เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงแช่แผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ในสารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 (34% (V/V) Methanol, 17% Ammonium sulphate, 2% (V/V) Phosphoric acid, 0.06% (V/V) CBB G-250) ตลอดคืน โดยจะสามารถตรวจผลการวิเคราะห์ได้ภายหลังจากการล้างสีย้อมออกจากเจลโพลิอะคริลาไมด์ด้วยน้ำกลั่น ในขณะที่โปรตีนจากเจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับโปรตีนชุดที่สองจะถูกทำการถ่ายโอนไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส เพื่อนำไปใช้ในการติดตามโปรตีนเป้าหมาย ในลักษณะเดียวกันดังที่ได้อธิบายในหัวข้อที่ 3.2.3 การวิเคราะห์โปรตีนจาก Brush border membrane fraction (BBMF) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Western blot

3.2.7 การวิเคราะห์โปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

ภายหลังจากการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงด้วยเทคนิค 2D-E และการติดตามโปรตีนเป้าหมายที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ได้อย่างจำเพาะด้วยเทคนิค Western blot จากนั้นจึงเป็นขั้นตอนการวิเคราะห์ผลที่ได้โดยการเปรียบเทียบตำแหน่งของโปรตีนที่ติดตามได้บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสกับตำแหน่งของโปรตีนบนเจลโพลิอะคริลาไมด์ที่ถูกย้อมด้วย Coomassie brilliant blue G-250 จากนั้นจึงทำการตัดโปรตีนบนเจลโพลิอะคริลาไมด์ที่มีตำแหน่งตรงกันมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF) เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีน

การเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF เริ่มจากการตัดจุดของโปรตีนบนเจลโพลิอะคริลาไมด์ที่ได้จากการเปรียบเทียบตำแหน่งกับจุดของโปรตีนติดตามที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 อย่างจำเพาะบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส วางลงในหลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นจึงทำการล้างสีย้อมโปรตีนออกจากเจลโดยการเติมสารละลายสำหรับล้างสี

(destaining solution (50% Methanol, 5% Acetic acid)) วางหลอดบนเครื่องเขย่าเพื่อช่วยให้การล้างสีย้อมโปรตีนออกจากเจลมีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยจะเขย่าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหากยังคงมีสีของ Coomassie brilliant blue อยู่ภายในเจล ให้ทำการเปลี่ยนสารละลายสำหรับล้างสีภายในหลอดและทำการเขย่าเป็นเวลา 10 นาที โดยจะทำการเปลี่ยนสารละลายสำหรับล้างสีจนกว่าจะเห็นว่าเจลมีสีใสและไม่มีสีของ Coomassie brilliant blue ติดค้างอยู่ภายในเจล จึงดูดสารละลายทิ้ง จากนั้นจึงทำการเติมสารละลาย Acetonitrile (ACN) ปริมาณ 200 µl เพื่อทำปฏิกิริยาการสูญเสียน้ำ (dehydration) ของโปรตีน โดยจะบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 5 นาที จึงดูดสารละลายทิ้งอย่างระมัดระวัง และปล่อยให้สารละลายของ ACN มีการระเหยออกจากหลอดจนแห้ง ซึ่งในขั้นตอนนี้จะสามารถสังเกตเห็นได้ว่าเจลจะมีสีขาวและจะมีขนาดเล็กลง หลังจากนั้นจึงทำการเติมสารละลาย DTT (10mM DTT in 10mM Ammonium bicarbonate) 200 µl บ่มภายในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้โมเลกุลโปรตีนจะเกิดปฏิกิริยา reduction โดยสาร DTT จะทำหน้าที่ในการทำลายพันธะ disulfide (S-S) ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอิน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงดูดสารละลายของ DTT ทิ้งอย่างระมัดระวัง จากนั้นจึงเติมสารละลาย IAA (100mM IAA in 10mMAmmonium bicarbonate) 200 µl โดยจะทำการบ่มภายในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งในขั้นตอนนี้สาร IAA จะทำหน้าที่ในการทำให้โปรตีนเกิดปฏิกิริยา alkylation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการแทนที่อะตอมไฮโดรเจนด้วยหมู่อัลคิล (alkyl group) เมื่อครบกำหนดเวลาจึงดูดสารละลายของ IAA ทิ้งอย่างระมัดระวัง ขั้นตอนต่อไปเป็นการทำให้โปรตีนเกิดปฏิกิริยาการสูญเสียน้ำด้วยสารละลาย Acetonitrile อีกครั้ง ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 5 นาที จึงดูดสารละลายทิ้งอย่างระมัดระวัง และปล่อยให้สารละลายของ ACN มีการระเหยจนแห้ง จากนั้นเป็นการคืนน้ำให้แก่โปรตีน (rehydration) โดยการเติมสารละลาย Ammonium bicarbonate (100mM) 200 µl) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงดูดสารละลายดังกล่าวทิ้ง และทำให้โปรตีนมีการสูญเสียน้ำโดยการบ่มด้วยสารละลาย ACN อีกครั้ง และทำการดูดสารละลายของ ACN ทิ้งและปล่อยให้สารละลายของ ACN มีการระเหยจนแห้ง ขั้นตอนต่อเป็นการเติมสารละลายเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin in 10mM Ammonium bicarbonate) 10 µl (200 ng) ทำการบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงทำการเติมสารละลาย Ammonium bicarbonate (10mM Ammonium bicarbonate) เพิ่มลงในหลอด 20 µl และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ตลอดคืน ซึ่งในขั้นตอนนี้เป็นเทคนิคที่เรียกว่า “In-gel digestion” ซึ่งเป็นการใช้เอนไซม์ทริปซินในการย่อยโปรตีนที่ยังคงอยู่ภายในเจล ก่อนที่จะทำการสกัดโปรตีนออกจากเจลเพื่อนำมาวิเคราะห์

ภายหลังจากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน โปรตีนซึ่งถูกย่อยภายในเจลจะถูกสกัดออกมาจากเจล ซึ่งสามารถทำได้โดยการเติมสารละลาย Ammonium bicarbonate (10mM Ammonium bicarbonate) ลงในหลอด 30 µl ทำการเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นจึงถ่ายสารละลายดังกล่าวไปยังหลอดขนาด 1.5 ml ใหม่ จากนั้นจึงทำการสกัดแยกโปรตีนจากเจลด้วยสารละลายของ ACN และ Trifluoroacetic acid (TFA) (50% ACN/0.1% TFA) 60 µl โดยจะทำการเขย่าเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการถ่ายสารละลายของโปรตีนรวมกับสารละลายในหลอดใหม่ในขั้นตอนก่อนหน้า จากนั้นจึงสกัดแยกโปรตีนอีกครั้งด้วยสารละลายเดิมด้วยปริมาณ 40 µl เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีนจึงทำการรวมสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นจึงนำสารละลายโปรตีนไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ ตะกอนโปรตีนจะถูกละลายด้วยสารละลาย 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) 5 µl ก่อนจะนำไปวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF และ LC/MS-MS

ข้อมูลของน้ำหนักของเปปไทด์ (Peptide mass) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS และข้อมูลของไอออนต่างๆที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS-MS จะถูกนำไปทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลของโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูล NCBInr ที่มีลิขสิทธิ์อย่างสมบูรณ์ของ Mascot (http://www.matrixscience.com) ซึ่งในการสืบค้นมีการยินยอมให้เอนไซม์ทริปซินมีการย่อยผิดตำแหน่งเพียง 1 ตำแหน่ง (Trypsin missed cleavage) กระบวนการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลโปรตีนประกอบด้วย Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) และ Variable modifications: Oxidation (M) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะจัดจำแนกว่าโปรตีนที่จับจำเพาะกับโปรตีน tMtx2 น่าจะเป็นโปรตีนชนิดใด