ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

คำอธิบายเทคนิคที่นำมาใช้ในการศึกษา

การผลิตโปรตีนสารพิษ Mtx2 ด้วยระบบ Glutathione S-Transferase (GST) Gene Fusion System และการสกัดแยกโปรตีนบริสุทธิ์ด้วย Affinity Chromatography

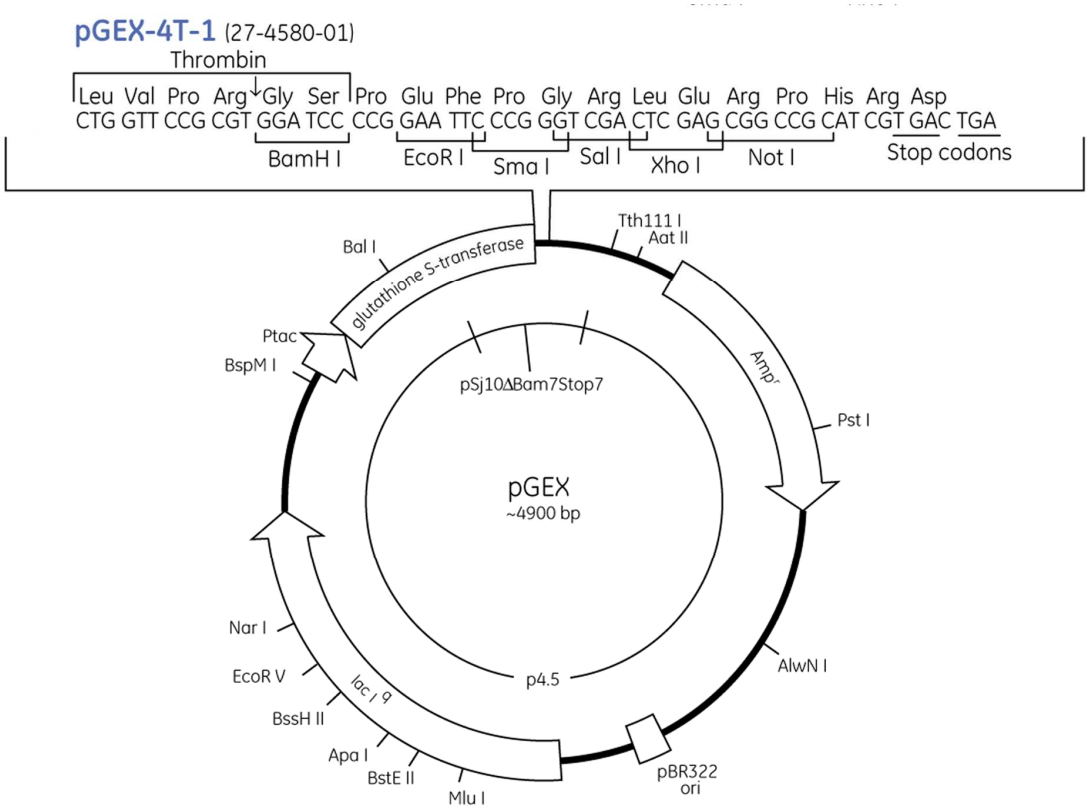
โปรตีนสารพิษ Mtx2 ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยแบคทีเรีย *Escherichia coli* ด้วยระบบ Glutathione S-transferase (GST) gene fusion system ระบบ GST gene fusion system เป็นระบบที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์สำหรับการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย (expression) การสกัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (purification) รวมถึงการติดตามโปรตีนเป้าหมาย (detection) ระบบ GST gene fusion system มีหลักการพื้นฐานคือ ผู้ศึกษาสามารถชักนำระบบให้มีการแสดงออกของยีนที่ต้องการได้ และยังสามารถทำให้ยีนดังกล่าวมีระดับการแสดงออกสูง ซึ่งยีนดังกล่าวนั้นจะถูกเชื่อมต่อกับยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน GST จากแบคทีเรีย *Schistosoma japonicum* อย่างไรก็ตามโปรตีน GST ที่มีขนาดประมาณ 26 kDa สามารถถูกชักนำให้มีการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* ได้โดยไม่ทำให้คุณสมบัติทางด้านเอนไซม์ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการด้วย GST gene fusion system ในแบคทีเรีย *E. coli* จะทำให้ได้โปรตีนที่ต้องการในรูปของโปรตีนเชื่อมต่อ (fusion protein) โดยทางด้านปลาย N-terminus และ C-terminus จะเป็นส่วนของโปรตีน GST และโปรตีนที่ต้องการ ตามลำดับ ดังนั้นสำหรับการแสดงออกของโปรตีนสารพิษ Mtx2 ในแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งทำหน้าที่เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) ด้วยระบบ GST gene fusion system ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนสารพิษ Mtx2 ซึ่งเป็นของแบคทีเรีย *B. sphaericus* สายพันธุ์ 2297 จะถูกทำการตัดนิวคลีโอไทด์ จำนวน 15 นิวคลีโอไทด์ ทางด้านปลาย N-terminus ซึ่งเป็นลำดับนำ (leader sequence) ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เหลือจะถูกเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับโปรตีน GST ซึ่งจะมีผลทำให้โปรตีนสารพิษ Mtx2 ถูกสังเคราะห์ในรูปของโปรตีนเชื่อมต่อกับโปรตีน GST (GST-tMtx2 fusion protein)

การสร้างโปรตีนเชื่อมต่อกับโปรตีน GST (GST fusion protein) สามารถทำได้โดยการแทรกยีนสำหรับโปรตีน GST ซึ่งถูกเชื่อมต่อกับยีนสำหรับโปรตีนที่ต้องการ ไปยังบริเวณ multiple cloning site (MCS) ของเวกเตอร์ pGEX จากนั้นจึงทำการถ่ายเวกเตอร์เข้าไปยังเซลล์

เจ้าบ้าน *E. coli* โดยในการศึกษานี้ได้เลือกใช้เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM109 ซึ่งภายในบรรจุพลาสมิดเวกเตอร์ pGEX -4T-1 แสดงในภาพที่ 19 ที่มียีนสำหรับโปรตีนสารพิษ Mtx2 ซึ่งถูกเชื่อมต่อกับยีนสำหรับโปรตีน GST ดังแสดงในภาพที่ 3

ภาพที่ 19

พลาสมิดเวกเตอร์ pGEX-4T-1



การแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *tac* (*tac* promotor) สามารถถูกชักนำให้แบคทีเรีย *E. coli* JM109 มีการแสดงออกของยีนสำหรับโปรตีน GST-tMtx2 ได้โดยการเติมสารชนิดหนึ่งคือ isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) IPTG เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโมเลกุลน้ำตาลแลกโตสในธรรมชาติ ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในระบบเมตาบอลิซึมของน้ำตาลแลกโตส การมีอยู่ของน้ำตาลแลกโตสส่งผลให้มีการแสดงออกของกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของน้ำตาลแลกโตส (*lac operon*) เนื่องจากโมเลกุลของน้ำตาลแลกโตสจะเข้าจับกับโปรตีนรีเพรสเซอร์ (repressor protein) ซึ่งจะทำให้เอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลี

เมอร์เรส (RNA polymerase) ในกระบวนการลอกรหัส (transcription) สามารถเข้าจับกับบริเวณโปรโมเตอร์และทำให้มีการแสดงออกของยีนได้ ดังนั้นเวกเตอร์ pGEX ส่วนใหญ่จึงถูกปรับให้มีการบรรจุยีน *lacI*^{q} ไว้ภายใน โดยยีน *lacI*^{q} จะทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนรีเพรสเซอร์ซึ่งจะเข้าจับกับบริเวณโอเปอเรเตอร์ (operator region) ของโปรโมเตอร์ *tac* เพื่อป้องกันไม่ให้ยีนมีการแสดงออก โดยภายหลังจากการเติมสาร IPTG เข้าไปในระบบ จะทำให้แบคทีเรีย *E. coli* JM109 มีการแสดงออกของยีนสำหรับโปรตีน GST-tMtx2 ที่จะนำมาใช้ในการศึกษาได้

ภายหลังจากการชักนำให้แบคทีเรีย *E. coli* JM109 ที่บรรจุพลาสมิดสายผสม pGEX-tMtx2 มีการแสดงออกของยีนสำหรับโปรตีน GST-tMtx2 โปรตีน GST-tMtx2 ดังกล่าวสามารถถูกแยกออกจากสารสกัดที่แบคทีเรีย *E. coli* JM109 สังเคราะห์ขึ้นทั้งหมดได้ด้วยเทคนิค affinity chromatography โดยในการศึกษานี้ได้เลือกใช้คอลัมน์ GSTrap FF ภายในคอลัมน์ถูกบรรจุด้วยแมทริกซ์ซึ่งถูกเคลือบด้วยโปรตีน Glutathione (γ-glutamylcysteinylglycine) เนื่องจาก GSTs เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีการใช้ Glutathione เป็นสับสเตรท โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งความเป็นพิษของโมเลกุลที่มีความเป็นพิษซึ่งมีขนาดเล็ก ดังนั้นเมื่อนำสารสกัดโปรตีนทั้งหมดผ่านไปยังคอลัมน์ GSTrap FF โปรตีน GST-tMtx2 จะเข้าจับกับแมทริกซ์ ในขณะที่โปรตีนชนิดอื่นๆจะถูกล้างออกจากคอลัมน์ จากนั้นจึงทำการแยกโปรตีน GST-tMtx2 ออกจากคอลัมน์โดยการผ่านสารละลายของ Glutathione ที่อยู่ในโครงสร้าง reduced form ซึ่งเป็นโมเลกุลของ Glutathione ที่มีความเป็นอิสระ สารละลาย Glutathione จะแย่งจับกับโมเลกุลของโปรตีน GST-tMtx2 ภายในคอลัมน์ ส่งผลให้โปรตีน GST-tMtx2 บริสุทธิ์ถูกชะออกจากคอลัมน์ภายใต้สภาวะที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (non-denaturing condition) เพื่อคงไว้ซึ่งคุณสมบัติต่างๆในการทำหน้าที่ของโปรตีน GST-tMtx2 ไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงไป

อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาสามารถทำการแยกโปรตีน GST ซึ่งเป็นโปรตีนติดตาม (tag protein) ออกจากโปรตีน tMtx2 ได้โดยการเลือกใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) ที่มีลำดับจดจำ (recognition sequence) ที่จำเพาะอยู่ทางด้าน upstream จาก MCS ของพลาสมิด pGEX โดยพลาสมิด pGEX-4T-1 ซึ่งมีลำดับจดจำที่จำเพาะสำหรับเอนไซม์ทรอมบิน (Thrombin) ดังแสดงตำแหน่งของลำดับจดจำสำหรับเอนไซม์ทรอมบินบนพลาสมิด pGEX-4T-1 ในภาพที่… จากนั้นจึงทำการแยกโปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์ GSTrap FF อีกครั้ง โดยการนำโปรตีน GST-tMtx2 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ทรอมบิน (Thrombin) ผ่านไปยังคอลัมน์ ส่งผลให้มีเพียงโปรตีน GST เท่านั้นที่ถูกตรึงอยู่กับแมทริกซ์ภายในคอลัมน์ ในขณะที่โปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์จะถูกชะออกจากคอลัมน์ ซึ่งผู้ศึกษาสามารถแยกโปรตีน GST ออกจากคอลัมน์ได้โดยการผ่านสารละลาย reduced-GSH

ไปยังคอลัมน์เช่นเดียวกับในขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีนบริสุทธิ์ โดยโปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์จะถูกวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีนเพื่อเตรียมสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

เทคนิคการเตรียม Brush Border Membrane Fraction (BBMF)

เทคนิคการเตรียม BBMF สำหรับใช้ในการวิจัยโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การเตรียมโดยใช้เฉพาะส่วนเนื้อเยื่อบริเวณกระเพาะอาหารของลูกน้ำยุง (gut membrane) และ การเตรียมโดยใช้ลูกน้ำยุงทั้งตัว (whole larvae) ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน กล่าวคือ การเตรียม BBMF จากส่วนเนื้อเยื่อบริเวณกระเพาะอาหารเป็นวิธีที่ให้ BBMF ที่มีคุณภาพสูง เนื่องจากเป็นการเตรียมจากเนื้อเยื่อบริเวณกระเพาะอาหารโดยตรง ซึ่งเป็นบริเวณที่โปรตีนสารพิษมีการแสดงความเป็นพิษ อย่างไรก็ตามการเลือกใช้วิธีดังกล่าวในการเตรียม BBMF สามารถกระทำได้อย่างจำกัด เนื่องจากลูกน้ำยุงแต่ละตัวจะต้องถูกนำมาตัดส่วนหัวและหางเพื่อทำการแยกส่วนที่เป็นกระเพาะอาหารและลำไส้ที่จะนำไปใช้ในการเตรียม BBMF นอกจากนี้ในแต่ละการทดลองจะต้องใช้กระเพาะอาหารและลำไส้ของลูกน้ำยุงในปริมาณมาก ดังนั้นการเตรียม BBMF ด้วยวิธีที่หนึ่งจึงเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลานาน แต่ถึงแม้ว่าการสกัด BBMF ด้วยวิธีที่สอง คือการเตรียม BBMF จากการใช้ลูกน้ำยุงทั้งตัวจะใช้ระยะเวลาน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกัน การสกัดด้วยวิธีนี้จะให้ BBMF ที่มีคุณภาพด้อยกว่า เนื่องจากเป็นการเตรียมโดยใช้ลูกน้ำทั้งตัว จึงอาจเป็นการยากที่จะบ่งชี้ได้ว่า BBMF ที่ได้จากการสกัดนั้น เป็น BBMF ที่ได้จากบริเวณกระเพาะอาหารลูกน้ำยุงหรือไม่ เพราะในสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปยังมีอวัยวะส่วนอื่นๆ ที่มีการขยายขนาดของพื้นที่ผิวของเซลล์โดยการยื่นส่วนไมโครวิลไลออกจากเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะ เช่น ตับ และ ลำไส้เล็ก เป็นต้น อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ได้เลือกใช้วิธีการเตรียมโดยใช้ลูกน้ำยุงทั้งตัวในการเตรียม BBMF สำหรับใช้ในการทดลอง

เทคนิคการสกัด BBMF มีหลักการที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการปั่นแยกองค์ประกอบของเซลล์ที่ความเร็วรอบ สูง-ต่ำ ต่างๆกัน (differential centrifugation) และการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือของโลหะ (metal salt) ซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

ขั้นตอนแรกเริ่มจากการบดลูกน้ำยุงในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมคือสารละลายที่ประกอบด้วย Mannitol Ethyleneglycol bis(alpha-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid และ Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (tris)-HCl (MET) อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาสามารถใช้สาร 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) หรือ N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-2-amino-ethanesulfonic acid (TES) หรือ 3-[N-

bis(hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid (DIPSO) หรือ Piperazine-N,N-bis(2-hydroxy)propanesulfonic acid (POPSO) แทน Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (tris)-HCl ได้ แต่สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัด BBMF โดยทั่วไปมักใช้สารละลาย MET (300 mM Mannitol 5 mM Ethyleneglycol bis(alpha-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid และ 17 mM Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (tris)-HCl) เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งภายหลังจากขั้นตอนการบดจะเป็นขั้นตอนการกำจัดโครงร่างแข็งซึ่งห่อหุ้มภายนอก (exoskeleton) ของลูกน้ำยุง การกำจัดโครงสร้างดังกล่าวสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การกรองด้วยผ้าฝ้ายบาง หรือ การนำสิ่งที่ได้จากการบดไปปั่น (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 1,000 x g เป็นเวลา 10 นาที เป็นต้น

จากนั้นเป็นขั้นตอนการสกัดแยก BBMF โดยการนำส่วนใสที่ได้จากการกรอง/การปั่นมาทำการบดอีกครั้ง หลังจากนั้นจึงนำสิ่งที่ได้จากการบดผสมรวมกับสารละลายเกลือของโลหะ โดยจะทำการบ่มสารผสมดังกล่าวเป็นระยะเวลาหนึ่ง เพื่อให้สารละลายเกลือของโลหะทำหน้าที่ในการตกตะกอนส่วนที่เป็น BBMF จากนั้นจึงทำการปั่นสารผสมดังกล่าวที่ความเร็วรอบต่ำ โดยจะใช้ความเร็วรอบระหว่าง 2,000-3,000 x g เพื่อเป็นการกำจัดโครงร่างแข็งภายนอกของลูกน้ำยุงที่ยังอาจหลงเหลืออยู่ หลังจากนั้นจึงนำส่วนใสที่ได้ซึ่งเป็นส่วนที่มี BBMF มาทำการปั่นที่ความเร็วรอบสูง โดยจะใช้ความเร็วรอบอย่างน้อย 30,000 x g ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ส่วนที่เป็น BBMF นั้นตกลงมาอยู่ในส่วนที่เป็นตะกอน สุดท้ายจึงทำการละลาย (re-suspension) ตะกอนของ BBMF ด้วยสารละลาย MET ซึ่งเป็นสารละลายเดียวกันกับที่ใช้ในขั้นตอนการบดลูกน้ำยุง กระบวนการสกัดแยกส่วนที่เป็น BBMF ของลูกน้ำยุงดังกล่าว เป็นกระบวนการสกัดแยกที่ยึดหลักความเป็นธรรมชาติของสิ่งที่ต้องการสกัด กล่าวคือ บริเวณที่เป็น Brush border membrane ที่เป็นองค์ประกอบภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติจะเป็นบริเวณที่มีความเป็นประจุสูง อันเนื่องมาจากการที่พื้นผิวของเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณนั้นประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีความเป็นประจุ (charged amino acid residues) ดังนั้นจึงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ชนิดอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบบริเวณกระเพาะอาหารของลูกน้ำยุงซึ่งไม่มีความเป็นประจุหรืออาจมีความเป็นประจุน้อย จึงไม่ถูกตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือของโลหะ ซึ่งทำให้สารละลายเกลือของโลหะเป็นสารละลายที่มีประสิทธิภาพสำหรับนำมาใช้ในการสกัดแยก BBMF ออกจากเซลล์ชนิดอื่นๆ โดยสารละลายเกลือของโลหะที่ถูกนำมาใช้ในการเตรียม BBMF โดยทั่วไป มักเป็นเกลือของโลหะที่เป็น divalent salt ตัวอย่างเช่น $MgCl_2$ และ $CaCl_2$ เป็นต้น อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการสกัดแยก

BBMF สามารถทำซ้ำได้อย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของ BBMF ที่จะนำไปใช้ในการทดลอง

อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาสามารถทำการวิเคราะห์คุณภาพของ BBMF ที่ได้จากการสกัดโดยใช้เอนไซม์ที่มีอยู่บริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นเอนไซม์ชี้วัด (enzyme marker) เช่น เอนไซม์ Leucine amino peptidase (EC 3.4.11.2) เอนไซม์ Glutamyl transferase (EC 2.3.2.2) และเอนไซม์ Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) เป็นต้น การวัดค่ากิจกรรมที่จำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ดังกล่าว สามารถทำได้โดยการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และการคำนวณความเข้มข้นโปรตีนของตัวอย่างซึ่งได้จากแต่ละขั้นตอนของการสกัด BBMF ซึ่งจะให้ค่าที่มีความสัมพันธ์กับความบริสุทธิ์และปริมาณของ BBMF ที่สกัดได้ โดยค่ากิจกรรมที่จำเพาะของเอนไซม์ที่สูงมากขึ้นเท่าใด ก็จะแสดงให้เห็นว่า BBMF ที่ได้จากการสกัดเป็น BBMF ที่มีคุณภาพมากขึ้นเท่านั้น

การวิเคราะห์โปรตีนตัวด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

เทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยโปรตีนจะมีการเคลื่อนที่บนแผ่นเจลที่เป็น cross-linked polymer ซึ่งเกิดจากการสร้างโพลิเมอร์ระหว่าง Acrylamide และ N,N'-methylene-bis-acrylamide โดยมี Ammonium persulfate (APS) และ N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) เป็นสารเริ่มปฏิกิริยาและสารช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างโพลิเมอร์ ตามลำดับ เทคนิค SDS-PAGE มีหลักการพื้นฐานที่สำคัญคือ การเตรียมโปรตีนตัวอย่างให้อยู่ในโครงสร้างที่เสียสภาพธรรมชาติ (denatured form) และทำให้เป็นโมเลกุลโปรตีนที่มีประจุไฟฟ้า โดยเมื่อมีการให้สนามไฟฟ้า โปรตีนที่มีประจุจะมีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงกันข้ามด้วยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ ซึ่งอัตราเร็วจะขึ้นอยู่กับประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง รูปร่าง ขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างนั้นๆ และกระแสไฟฟ้า ดังนั้นโปรตีนตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จะถูกทำให้อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นด่างในสภาวะที่มีสารชนิดหนึ่งคือ Sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารชะล้างที่มีประจุลบ (-) (anionic detergent) เมื่อโปรตีนถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน ความร้อนจะมีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงจากโครงสร้างที่มีการม้วนขด (folding) เป็นโครงสร้างที่มีการคลายตัวและเป็นเส้นตรง โดยมีสาร

Dithiothreitol (DTT) ซึ่งเป็น reducing agent ช่วยในการทำลายพันธะ disulfide bond (S-S) ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และเติมหมู่ –SH เพื่อป้องกันไม่ให้กรดอะมิโนซิสเทอีนกลับมาสร้างพันธะระหว่างกันได้อีก ส่งผลให้โปรตีนคงอยู่ในโครงสร้างที่เป็นเส้นตรง นอกจากนี้โมเลกุล SDS ซึ่งมีประจุลบ จะเข้าจับกับกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีน ทำให้อัตราส่วนระหว่างขนาดและประจุ (mass/charge ratio) ของโปรตีนมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนแต่ละโมเลกุลบนสนามไฟฟ้าจึงขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างขนาดและประจุโดยตรง

การใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยทั่วไปมักกระทำในระบบที่มีลักษณะเป็น “discontinuous buffer system” ซึ่งหมายถึง ความไม่สม่ำเสมอกันของ pH และ ionic strength ของระบบบัฟเฟอร์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างโปรตีน (sample buffer) บัฟเฟอร์สำหรับเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์ และ บัฟเฟอร์ที่ใช้ในระบบการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีน (running buffer) เจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับใช้ในเทคนิค SDS-PAGE โดยทั่วไปจะประกอบด้วยเจล 2 ส่วนที่มีค่า pH แตกต่างกัน คือ stacking gel และ separating gel ซึ่งมีสารละลาย Tris-Cl เป็นองค์ประกอบ ที่มีค่า pH ของสารละลายเท่ากับ 6.8 และ 8.8 ตามลำดับ โดยบัฟเฟอร์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างโปรตีนจะมีสารละลาย Tris-Cl เป็นองค์ประกอบเช่นกัน และมีค่า pH เท่ากับ 6.8 เช่นเดียวกับเจลในส่วน stacking gel ในขณะที่บัฟเฟอร์สำหรับใช้ในระบบการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนจะมีสารละลาย Tris-glycine เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีค่า pH ของสารละลายเท่ากับ 8.3 โดยเมื่อมีการให้สนามไฟฟ้า ไอออนของโมเลกุลคลอไรด์ในบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างโปรตีนและที่เป็นองค์ประกอบของเจลในส่วน stacking gel จะเริ่มมีการจัดเรียงขอบเขตของการเคลื่อนที่จากส่วนบนสุด (leading edges) ในขณะที่บริเวณขอบเขตส่วนล่าง (trailing edges) จะประกอบไปด้วยโมเลกุลของไกลซีน (glycine) การเกิดขอบเขตของการเคลื่อนที่ดังกล่าวจะทำให้เกิดบริเวณที่มีความต้านทานกระแสไฟฟ้าได้สูงซึ่งจะส่งผลให้พื้นที่บริเวณนั้นมีระดับแรงดันไฟฟ้าที่สูงขึ้น ปรากฏการณ์ดังกล่าวมีผลทำให้โมเลกุลของโปรตีนถูกพาไปยังบริเวณผิวหน้าของ separating gel เกิดเป็นชั้นของโมเลกุลโปรตีนที่ทับซ้อนกัน (stack) หลังจากนั้นบริเวณพื้นที่ของ separating gel ซึ่งเป็นบริเวณที่มีค่า pH สูง จะสนับสนุนให้มีการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นไอออนของโมเลกุลไกลซีน ไอออนของโมเลกุลไกลซีนที่เกิดขึ้นดังกล่าวรวมทั้งไอออนของคลอไรด์จะมีการเคลื่อนที่ผ่านชั้นของโมเลกุลโปรตีนและผ่านไปยังบริเวณของ separating gel จากนั้นโมเลกุลของโปรตีนแต่ละโมเลกุลจะเคลื่อนผ่านโครงสร้างตาข่ายที่เกิดจากการสร้างโพลิเมอร์ระหว่าง Acrylamide และ N,N’-

methylene-bis-acrylamide ในบริเวณ separating gel โดยอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนแต่ละโมเลกุลจะขึ้นอยู่กับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งจะทำให้สามารถวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการได้

ภายหลังจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผู้ศึกษาสามารถตรวจสอบผลการวิเคราะห์ได้โดยการนำแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ไปทำการย้อมด้วยสีที่มีคุณสมบัติในการจับกับโมเลกุลของโปรตีน ตัวอย่างเช่น Coomassie Brilliant Blue stain (CBB) และ Silver stain เป็นต้น สีย้อมดังกล่าวมีความสามารถในการจับกับโปรตีนโดยจะไม่เกิดปฏิกิริยากับแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ ซึ่งจะทำให้สามารถมองเห็นแถบของโปรตีนบนแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ได้ โดยผู้ศึกษาสามารถวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่ต้องการได้โดยเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐาน (molecular marker) ซึ่งทราบขนาดที่แน่นอนแล้ว อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE อาจไม่สามารถใช้ได้กับโปรตีนบางชนิด เช่น โปรตีนที่มีการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (protein modification) เพื่อการทำหน้าที่ที่จำเพาะ ตัวอย่างเช่น โปรตีนที่มีการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่คาร์โบไฮเดรต (N-linked glycosylation หรือ O- linked glycosylation) ซึ่งจะมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ทำให้น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนดังกล่าวไม่ใช่น้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2-Dimensional gel Electrophoresis (2-DE)

เทคนิค 2 Dimensional gel-Electrophoresis (2D-E) เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนที่มีความซับซ้อน เช่น สารสกัดโปรตีนที่ได้จากการสกัดแยกจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เป็นต้น หลักการพื้นฐานที่สำคัญของเทคนิค 2D-E มีความเกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์โปรตีนในสองลักษณะ หรือ สองมิติ ภายในสองขั้นตอนที่เป็นอิสระต่อกัน การวิเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนแรก หรือ มิติที่ 1 (first dimension) เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า Isoelectric Focusing (IEF) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างโดยอาศัยความแตกต่างของค่า Isoelectric point (pI) ของโปรตีนแต่ละโมเลกุล การวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างในขั้นตอนนี้โปรตีนทุกๆโมเลกุลจะถูกทำให้มีการเคลื่อนที่บนเจลที่มีค่า pH ต่างๆ (pH gradient) บนสนามไฟฟ้า โดยโปรตีนจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อผ่านไปยังบริเวณที่มีค่า pH เท่ากับ pI ของโปรตีนชนิดนั้นๆ ซึ่งเป็นบริเวณที่จำนวนประจุสุทธิของโปรตีนมีค่าเท่ากับศูนย์ (0) จากนั้นจึงนำสิ่งที่ได้จากการวิเคราะห์ในขั้นตอนแรกไปทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนที่สอง หรือ มิติที่ 2 (second dimension) ซึ่ง

เป็นขั้นตอนการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนแต่ละโมลุกลโดยอาศัยวิธีการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังที่ได้กล่าวถึงในหัวข้อการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งภายหลังจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-E ผู้ศึกษาสามารถตรวจสอบผลการวิเคราะห์ได้โดยการนำแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ไปทำการย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue stain (CBB) หรือ Silver stain ซึ่งจะทำให้สามารถมองเห็นจุด (spot) ของโปรตีนบนแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ ซึ่งแต่ละจุดที่มองเห็นบนแผ่นเจลจะเป็นตัวแทนของโปรตีนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ดังนั้นสารสกัดโปรตีนที่ได้จากการสกัดแยกจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อซึ่งอาจมีโมเลกุลโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก จึงสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D-E ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D-E เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการที่จะได้มาซึ่งผลการวิเคราะห์ที่สมบูรณ์ วิธีการและขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างโปรตีนมีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของโปรตีน แหล่งที่มาของโปรตีน รวมถึงกระบวนการที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่จะนำมาวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้เทคนิค 2D-E ผู้ศึกษาจะต้องมีวัตถุประสงค์และขอบเขตที่ชัดเจนในการวิเคราะห์ตัวอย่าง เช่น การใช้เทคนิค 2D-E โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมดหรือเพียงเพื่อต้องการศึกษาโปรตีนที่จำเพาะซึ่งอยู่ในความสนใจเท่านั้น เป็นต้น ในกรณีที่ผู้ศึกษาต้องการศึกษาโปรตีนที่จำเพาะที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัดโปรตีนที่ได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อซึ่งมีความซับซ้อน โปรตีนที่จำเพาะนั้นจะต้องถูกทำให้ละลาย (solubilization) ได้อย่างสมบูรณ์ภายใต้สภาวะหนึ่ง ซึ่งโปรตีนจะมีความสามารถในการละลายภายใต้สภาวะใดสภาวะหนึ่งได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน ตัวอย่างเช่น โปรตีนบางชนิดเป็นองค์ประกอบอยู่ในบริเวณที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนบางชนิดมีการรวมกันกับกรดนิวคลีอิกหรือโปรตีนชนิดอื่นๆกลายเป็นโครงสร้างที่มีความซับซ้อน นอกจากนี้โปรตีนบางชนิดสามารถเกิดการจับกลุ่มกัน (aggregation) ได้อย่างไม่จำเพาะ และโปรตีนบางชนิดอาจเกิดการตกตะกอน (precipitation) เมื่อถูกแยกออกจากสภาวะในธรรมชาติ เป็นต้น ดังนั้นผู้ศึกษาจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเข้าใจธรรมชาติของโปรตีนที่ต้องการศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการละลายของโปรตีนยังขึ้นกับวิธีการที่เลือกใช้ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการศึกษา วิธีการในการแยกโปรตีนออกจากเซลล์ ความเข้มข้นของโปรตีน การเลือกใช้สารชะล้าง รวมทั้งองค์ประกอบของสารละลายตัวอย่าง หากวิธีการและสารเคมีที่เลือกใช้ในการ

เตรียมตัวอย่างไม่ได้มีการปรับเปลี่ยนให้มีความเหมาะสมกับชนิดของโปรตีนแล้ว อาจส่งผลให้การแยกโปรตีนบนเจลทั้งสองมิติเป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์และอาจทำให้ข้อมูลบางอย่างขาดหายไป

สำหรับในการศึกษานี้ โปรตีนตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง C6/36 (cell membrane proteins) ซึ่งมักจะอยู่ในสภาพที่ไม่ละลายและสามารถถูกละลายได้ยาก เนื่องจากโครงสร้างโดยทั่วไปมีลักษณะเป็น ampiphatic กล่าวคือ เป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophilic ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ยื่นออกสู่ภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ 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) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการชะโปรตีนให้หลุดออกจากเยื่อหุ้มเซลล์และรวมทั้งช่วยในการละลายโปรตีน นอกจากนี้สารละลายบัฟเฟอร์ยังประกอบด้วย Urea และ Thiourea ซึ่งจะทำหน้าที่ในการทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามวิธีการสำหรับใช้ในการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์สามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อของตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ วิธีการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดไม่รุนแรง (gentle lysis methods) และวิธีการรบกวนชนิดรุนแรง (vigorous lysis methods) วิธีการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดไม่รุนแรงมีความเหมาะสมกับเซลล์ที่สามารถถูกรบกวนได้ง่าย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในกรณีที่ผู้ศึกษาต้องการวิเคราะห์เฉพาะองค์ประกอบของเซลล์ที่สนใจ เช่น โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ (cytoplasmic proteins) หรือต้องการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ที่จำเพาะ ตัวอย่างเช่น ไมโตคอนเดรียหรือออร์กาเนลอื่นๆ เป็นต้น ซึ่งสามารถทำการแยกองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ได้โดยใช้การหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างๆกัน (differential centrifugation) สำหรับวิธีการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดรุนแรงมักใช้กับเซลล์ที่ถูกรบกวนได้ยาก เช่น เซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อที่มีความแข็ง เซลล์ที่มีผนังเซลล์ที่มีความแข็งแรง เป็นต้น ซึ่งวิธีการรบกวนเซลล์ทั้งสองชนิดดังกล่าว ประกอบด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 และตารางที่ 10

ตารางที่ 9

วิธีการทำให้เซลล์แตกชนิดไม่รุนแรง

วิธีการ	ชนิดของตัวอย่าง
การรบกวนด้วยแรงดันออสโมติก (Osmotic lysis): เป็นวิธีการที่เหมาะกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของส่วนต่างๆภายในเซลล์	เซลล์เม็ดเลือด, เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง
การรบกวนด้วยการแช่แข็งและการละลายที่อุณหภูมิห้อง (Freeze-thaw lysis): วิธีนี้สามารถใช้ได้กับเซลล์หลายชนิด โดยการนำเซลล์ที่ต้องการศึกษามาทำการแช่แข็งตามด้วยการทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นวิธีการที่สามารถทำซ้ำได้เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนอย่างสมบูรณ์	เซลล์แบคทีเรีย, เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง
การรบกวนโดยใช้สารชะล้าง : สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารชะล้าง เช่น CHAPS Triton X-100 และ SDS เป็นต้น จะทำหน้าที่ในการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์และช่วยในการละลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ อีกทั้งยังทำให้โปรตีนที่มีโครงสร้างบางส่วนฝังอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์หลุดออกจากเยื่อหุ้มเซลล์	เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง
การรบกวนโดยใช้เอนไซม์ : เซลล์ที่มีผนังเซลล์สามารถถูกรบกวนได้โดยการใช้เอนไซม์ในการกำจัดผนังเซลล์ อย่างไรก็ตามการรบกวนด้วยวิธีนี้จะต้องมีการเลือกใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะและเหมาะสมกับชนิดของเซลล์ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) เหมาะสมกับการใช้กับ	เนื้อเยื่อ/เซลล์พืช, เซลล์แบคทีเรีย, รา

เซลล์แบคทีเรีย เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) และ
เอนไซม์เพคติเนส (Pectinase) ใช้กับตัวอย่างที่เป็น
เซลล์พืช และ เอนไซม์ไลติเคส (Lyticase) ใช้กับ
ตัวอย่างที่เป็นเซลล์ยีสต์ เป็นต้น

ที่มา : GE Healthcare, 2004

ตารางที่ 10
วิธีการทำให้เซลล์แตกชนิดรุนแรง

วิธีการ	ชนิดของตัวอย่าง
การรบกวนโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication): คลื่นเสียงความถี่สูงสามารถใช้ในการรบกวนเซลล์ ได้ โดยคลื่นเสียงดังกล่าวจะมีการแทรกผ่านเยื่อหุ้ม เซลล์โดยตรง ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย อย่างไร ก็ตามการรบกวนเซลล์ด้วยวิธีนี้อาจทำให้มีความร้อน เกิดขึ้น ซึ่งอาจทำให้โปรตีนเกิดความเสียหายได้	เซลล์ที่มีการลอยตัวในสารเหลว (cell suspension)
การรบกวนโดยใช้แรงดัน (French pressure): เป็นการรบกวนโดยการบังคับให้เซลล์มีการ เคลื่อนผ่านช่องขนาดเล็กภายใต้แรงดันสูง	สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีผนังเซลล์ (แบคทีเรีย, สาหร่าย, ยีสต์)
การรบกวนโดยการบด (Grinding):	เนื้อเยื่อ (solid tissue), สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก
การรบกวนโดยใช้อุปกรณ์บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Mechanical homogenization): เป็นการรบกวนเซลล์โดยการบดด้วยอุปกรณ์เฉพาะ เช่น Dounce และ Potter-Elvehjem เป็นต้น การรบกวนเซลล์ ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้	เนื้อเยื่อ

อาจก่อให้เกิดความเสียหายแก่โปรตีนได้

การรบกวนด้วยเม็ดแก้วสำหรับบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Glass bead homogenization)	เซลล์ที่มีการลอยตัวในสารเหลว, สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก

ที่มา : GE Healthcare, 2004

อย่างไรก็ตามในขณะที่เซลล์ถูกรบกวนด้วยกระบวนการใดๆ เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Protease) ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในเซลล์จะถูกปล่อยออกจากเซลล์และอาจถูกกระตุ้นให้สามารถทำงานได้ เอนไซม์ย่อยโปรตีนดังกล่าวอาจทำการย่อยโปรตีน ซึ่งจะส่งผลให้ผลการวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างด้วยเทคนิค 2D-E มีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น โดยปัญหาดังกล่าวสามารถป้องกันได้โดยการเตรียมตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนอยู่ในสภาวะอุณหภูมิที่สามารถทำงานได้ หรืออาจทำได้โดยการเติมสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Protease inhibitor) เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการการตกตะกอนโปรตีนอาจเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D-E โดยโปรตีนซึ่งถูกละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการละลายโปรตีน อาจถูกนำมาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารที่มีคุณสมบัติในการตกตะกอนโปรตีน ตัวอย่างเช่น สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) สารละลาย TCA (Trichloroacetic acid) และ อะซิโตน (Acetone) เป็นต้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการแยกโปรตีนออกจากสิ่งเจือปนอื่นๆ เช่น เกลือ สารชะล้าง กรดนิวคลีอิก และ โมเลกุลไขมัน ซึ่งอาจขัดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนบนเจล ซึ่งภายหลังจากการขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีน ตะกอนของโปรตีนดังกล่าวจะถูกนำมาละลายกลับด้วยสารละลายสำหรับตัวอย่าง (rehydration buffer) ซึ่งประกอบด้วย ยูเรีย (Urea) Dithiothreitol (DTT) ซึ่งเป็น reducing agent สารชะล้าง เช่น CHAPS หรือ Triton X-100 เป็นต้น และ Bromophenol blue โดยสารละลายตัวอย่างจะถูกผสมกับสาร carrier ampholyte ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวพาให้โมเลกุลโปรตีนมีการเคลื่อนไปยังบริเวณ pH ต่างๆ โดยสารละลายของโปรตีนในขั้นตอนนี้เป็นสารละลายตัวอย่างที่พร้อมจะนำไปวิเคราะห์ในมิติที่ 1 ต่อไป

ดังที่ได้กล่าวถึงข้างต้น การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2D-E ในขั้นตอนแรก หรือมิติที่ 1 (first dimension) เป็นการแยกโปรตีนโดยเทคนิคที่เรียกว่า Isoelectric Focusing (IEF) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างโดยอาศัยความแตกต่างของค่า Isoelectric point (pI) ของ

โปรตีนแต่ละโมเลกุล โมเลกุลของโปรตีนมีลักษณะเป็น amphoteric molecules เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีทั้งประจุบวก (+) และ ประจุลบ (-) ซึ่งประจุสุทธิของโปรตีนแต่ละโมเลกุลจะมีค่าเท่ากับผลรวมประจุทั้งประจุบวกและประจุลบของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลโปรตีนนั้นๆ โดยจะขึ้นอยู่กับค่า pH ของสิ่งแวดล้อมที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน ณ สภาวะนั้นๆ ซึ่งค่า pI จะเป็นค่า pH ที่จำเพาะสำหรับโปรตีนแต่ละโมเลกุลที่จะทำให้โมเลกุลโปรตีนนั้นๆ มีประจุสุทธิเท่ากับศูนย์ (0) และเมื่อโปรตีนอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีค่า pH สูงและต่ำกว่า pI ที่จำเพาะจะทำให้โมเลกุลโปรตีนนั้นๆ มีประจุสุทธิเป็นลบ (–) และ บวก (+) ตามลำดับ ดังนั้นการทำให้โมเลกุลโปรตีนมีการเคลื่อนทีบนเจลที่มีค่า pH ต่างๆ ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า จะทำให้โปรตีนมีการเคลื่อนที่โดยโมเลกุลโปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นบวก (+) จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางของขั้วลบ (-) ในขณะที่โมเลกุลที่มีประจุสุทธิเป็นลบ (-) จะเคลื่อนที่ไปทิศทางของขั้วบวก โดยจะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเคลื่อนไปยังตำแหน่ง pI ซึ่งทำให้ประจุสุทธิของโมเลกุลโปรตีนนั้นๆ เท่ากับศูนย์ (0) และหากโมเลกุลโปรตีนมีการเคลื่อนที่ผ่านตำแหน่ง pI โปรตีนดังกล่าวจะได้รับประจุ ส่งผลให้โมเลกุลโปรตีนนั้นสามารถเคลื่อนที่กลับมายังตำแหน่ง pI ที่จำเพาะได้ ปรากฏการณ์ดังกล่าวเป็นผลจากการ “focusing” ของเทคนิค IEF ที่สามารถทำให้โมเลกุลโปรตีนเคลื่อนที่ไปยัง pI ของโปรตีนชนิดนั้นๆ ซึ่งจะทำให้โปรตีนแต่ละโมเลกุลสามารถถูกแยกออกจากกันได้ถึงแม้ประจุของโปรตีนแต่ละโมเลกุลจะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

ภายหลังจากการวิเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนแรก เจล (first dimension gel) ซึ่งผ่านการแยกโมเลกุลโปรตีนตามค่า pI ของโปรตีนจะถูกนำมาทำให้อิ่มตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ (equilibration buffer) ที่ประกอบด้วยสารละลาย Tris-HCl pH 8.8 ยูเรีย (Urea) กลีเซอรอล (Glycerol) Dithiothreitol (DTT)/หรือ Iodoacetamide (IAA) Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Bromophenol blue โดยสารยูเรียและกลีเซอรอลจะทำหน้าที่ในการลดปฏิกิริยา “electroendosmosis” ซึ่งเกี่ยวข้องกับการมีประจุบนเจลที่ผ่านการวิเคราะห์จากขั้นตอนแรก โดยประจุดังกล่าวสามารถขัดขวางการถ่ายโอนโปรตีนจากเจลในขั้นตอนแรกสู่เจลโพลิอะคริลาไมด์ในการวิเคราะห์ในขั้นตอนที่สองได้ นอกจากนี้กลีเซอรอลยังเป็นตัวช่วยทำให้การถ่ายโอนโปรตีนเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สาร DTT จะทำหน้าที่ในการทำลายพันธะระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีนในโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีน โดยทั้ง DTT และ IAA จะทำการเติมโมเลกุลไฮโดรเจนเข้าแทนที่ เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้กรดอะมิโนดังกล่าวกลับมาสร้างพันธะระหว่างกันได้อีก ในขณะที่สาร SDS จะทำหน้าที่ในการให้ประจุลบแก่โปรตีนแต่ละโมเลกุล ส่วนองค์ประกอบสุดท้ายคือ Bromophenol blue เป็นสารที่ช่วยทำให้ผู้ศึกษาสามารถติดตามการเคลื่อนที่ของ

โปรตีนบนเจลโพลิอะคริลาไมด์ได้ การทำให้เจลอิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวนี้จะทำให้เจลมีความพร้อมและมี pH ที่เหมาะสมในการที่จะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนที่สองต่อไป ซึ่งการวิเคราะห์โปรตีนขั้นตอนที่สอง หรือ มิติที่ 2 (second dimension) เป็นการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนแต่ละโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังที่ได้อธิบายในหัวข้อ “การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)” ซึ่งภายหลังจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนในขั้นตอนที่สอง ผู้ศึกษาสามารถตรวจสอบผลการวิเคราะห์ได้โดยการนำแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ไปทำการย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน เช่น Coomassie Brilliant Blue stain (CBB) หรือ Silver stain ซึ่งจะทำให้สามารถมองเห็นจุด (spot) ของโปรตีนบนแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ ซึ่งแต่ละจุดที่มองเห็นบนแผ่นเจลจะเป็นตัวแทนของโปรตีนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น โดยผู้ศึกษาสามารถวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่ต้องการได้โดยเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐาน (molecular marker) ซึ่งทราบขนาดที่แน่นอนแล้ว นอกจากนี้การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2D-E ยังทำให้สามารถทราบค่า pI โดยประมาณของโปรตีนที่สนใจได้โดยการเทียบมาตราส่วนกับเจลที่ใช้ในการวิเคราะห์ในมิติที่ 1

การตรวจหาโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Western blot

Western blot หรือ Immunoblot เป็นเทคนิคที่ใช้ในการติดตามโปรตีนที่สนใจในสารตัวอย่าง ซึ่งอาจเป็นสารสกัดโปรตีนจากเซลล์ เนื้อเยื่อ หรือ โมเลกุลโปรตีนอื่นๆ ซึ่งอาศัยความสามารถในการเข้าจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่จำเพาะ โดยขั้นตอนแรกสารสกัดโปรตีนหรือโมเลกุลโปรตีนจะถูกทำให้มีการเคลื่อนที่บนแผ่นโพลิอะคริลาไมด์เจลบนสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังที่ได้กล่าวถึงในหัวข้อการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) หรืออาจเป็นเจลโพลิอะคริลาไมด์ที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2 Dimensional gel-Electrophoresis (2D-E) จากนั้นโปรตีนซึ่งถูกแยกบนโพลิอะคริลาไมด์เจลจะถูกถ่ายโอนลงบนพื้นผิวรองรับหรือเมมเบรน ซึ่งในปัจจุบันการถ่ายโอนโปรตีนลงบนพื้นผิวของแผ่นเมมเบรนสามารถกระทำได้ใน 3 ลักษณะ คือ การถ่ายโอนโปรตีนแบบ Wet blot (immerse) Semi-dry blot และ Dry blot โดยประสิทธิภาพในการถ่ายโอนโปรตีน ระบบที่ใช้ในการถ่ายโอน รวมทั้งสารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการถ่ายโอนโปรตีนจะมีความแตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามพื้นผิวรองรับหรือแผ่นเมมเบรนที่ถูกนำมาใช้ในการทำ Western blot สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ แผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane) แผ่นไนลอน

(Nylon membrane) และ แผ่น Polyvinylidene difluoride (PVDF) ซึ่งแผ่นเมมเบรนทั้งสามชนิดดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีนได้แตกต่างกัน ดังนี้

แผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane) เป็นเมมเบรนที่นิยมใช้มากที่สุด โมเลกุลโปรตีนจะจับกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) นอกจากนี้ปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสยังมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรอดมิโนโซ่ข้าง (amino acid side chains) กับหมู่ไนโตร (nitro group) ของแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยความจุของแผ่นไนโตรเซลลูโลสหรือปริมาณของโปรตีนที่จะจับกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 80-250 µg protein /cm^2 ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน

แผ่นไนลอน (Nylon membrane) และ แผ่นไนลอนที่มีประจุบวก (+) (Positively charged nylon membrane) เป็นเมมเบรนที่มีความเหนียวและทนทานกว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลส และยังมีความสามารถในการจับกับโมเลกุลโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยแรงทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) โดยความจุของแผ่นไนลอนในการจับกับโปรตีนอย่างมีประสิทธิภาพอยู่ในช่วงระหว่าง 150-200 µg protein/cm^2 การเลือกใช้แผ่นไนลอนในการทำ Western blot มีข้อดีคือ เมื่อผู้ศึกษานำโปรตีนซึ่งถูกถ่ายโอนไปยังบนแผ่นไนลอนมาทำการโพรบ (probe) ด้วยแอนติบอดีชนิดหนึ่ง ผู้ศึกษายังสามารถนำแผ่นไนลอนนั้นมาทำการโพรบด้วยแอนติบอดีที่ต่างชนิดกันได้ อย่างไรก็ตามข้อเสียของการเลือกใช้แผ่นไนลอน คือ เมื่อได้ทำการถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่นไนลอนแล้ว ผู้ศึกษาไม่สามารถทำการย้อมสีโปรตีนซึ่งอยู่บนแผ่นไนลอนด้วยสีย้อมโปรตีนได้ นอกจากนี้การปกปิดพื้นที่ว่างที่นอกเหนือจากบริเวณที่จับกับโมเลกุลโปรตีนบนแผ่นไนลอนเป็นสิ่งที่กระทำได้ยาก ดังนั้นทำให้แอนติบอดีที่ใช้ในการโพรบมีแนวโน้มที่จะจับกับบริเวณพื้นที่ว่างนั้นอย่างไม่จำเพาะ ส่งผลให้มีพื้นหลัง (bachground) รบกวนสูงภายหลังจากขั้นตอนการติดตามผล (detection) จากการทำ Western blot โดยเฉพาะเมื่อใช้กับสารที่มีความไว (sensitivity) สูง ตัวอย่างเช่น enhanced chemiluminescence (ECL) เป็นต้น

แผ่น Polyvinylidene difluoride (PVDF) เป็นแผ่นเมมเบรนที่มีความแข็งแรง และมีความสามารถในการจับกับโปรตีนด้วยแรงไฮโดรโฟบิก ด้วยความจุของแผ่น PVDF ในการจับกับโปรตีนอย่างมีประสิทธิภาพที่มีค่าใกล้เคียงกับแผ่นไนลอน คือประมาณ 170 µg protein/cm^2 โดยแผ่น PVDF มีความสามารถในการจับกับโมเลกุลโปรตีนได้ดีกว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลสถึง 6 เท่า นอกจากนี้ยังคงโมเลกุลโปรตีนให้อยู่บนแผ่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ไม่เกิดการสูญหายของโมเลกุลโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการทำ western blot อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาสามารถตรวจผลการ

ทำอิเล็กโตรโฟเรซิสจากโปรตีนที่ถูกถ่ายโอนลงบนแผ่น PVDF ได้โดยการย้อมโปรตีนด้วยสีย้อม เช่น Amido Black India Ink Ponceau S หรือ Coomassie Brilliant Blue เป็นต้น

ภายหลังจากการถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่นเมมเบรน โปรตีนจะจับกับแผ่นเมมเบรน แต่ยังคงมีพื้นที่ว่างที่โปรตีนไม่ได้เข้าจับ ดังนั้นขั้นตอนต่อไปเป็นการเติมพื้นที่ว่างบนแผ่นเมมเบรน เพื่อป้องกันการจับของโปรตีนอื่นๆหรือแม้แต่แอนติบอดีกับแผ่นเมมเบรน โดยการปิดพื้นที่บริเวณนั้นด้วยโปรตีนชนิดอื่น ซึ่งโดยทั่วไปมักใช้ Bovine serum albumin (BSA) หรือ โปรตีนไร้ไขมัน (non-fat dry milk) โปรตีนดังกล่าวจะทำหน้าที่ในการจับกับพื้นที่ว่างบนเมมเบรนที่นอกเหนือจากบริเวณที่โปรตีนเข้าจับ จากนั้นโปรตีนบนแผ่นเมมเบรนจะถูกโพรบด้วยแอนติบอดี ซึ่งอาจมีการเชื่อมต่อแอนติบอดีด้วยเอนไซม์หรือสารเรืองแสงเพื่อใช้ในการตรวจหาหรือติดตามโปรตีนที่สนใจ โดยเมื่อเอนไซม์หรือสารเรืองแสงมีการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นใดๆ จะทำให้มีสีเกิดขึ้น (chromogenic detection) หรือมีการเรืองแสงเกิดขึ้น (chemiluminescence detection) ทำให้สามารถทราบตำแหน่งของโปรตีนที่สนใจได้

เทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

เทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF) หรือ Protein Fingerprinting เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีน โดยโปรตีนตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทำให้โปรตีนดังกล่าวกลายเป็นโปรตีนสายสั้นๆ หรือเปปไทด์ (peptide) โดยเปปไทด์แต่ละชิ้นจะถูกวิเคราะห์มวล (mass) ด้วยเครื่องมือที่มีความแม่นยำสูง เช่น MALDI-TOF เป็นต้น ผลที่ได้จากการวิเคราะห์คือ ชุดของข้อมูลที่ประกอบด้วยมวลของเปปไทด์แต่ละชิ้น ชุดข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลของโปรตีนที่ทราบชนิดแล้วซึ่งมีอยู่ภายในฐานข้อมูล ผลจากการเปรียบเทียบคือ ระดับคะแนนซึ่งเป็นผลทางสถิติของชุดข้อมูลของโปรตีนที่มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับชุดข้อมูลของโปรตีนตัวอย่างมากที่สุด การจัดจำแนกชนิดของโปรตีนตัวอย่างด้วยเทคนิค PMF มีข้อดีคือ สามารถทำการวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามข้อเสียของการจัดจำแนกชนิดของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค PMF คือ ชนิดของโปรตีนที่สนใจจะต้องมีอยู่ภายในฐานข้อมูล นอกจากนี้โปรตีนตัวอย่างที่ได้จากการสกัดแยกจากโพลิอะคริลาไมด์เจลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE หรือ 2-DE จะต้องเป็นโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์และไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่น เนื่องจากการวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค PMF มีข้อสมมติฐานคือ เปปไทด์ขนาดต่างๆภายในชุดข้อมูลของ

โปรตีนที่สนใจจะต้องมาจากโปรตีนเพียงชนิดเดียว ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่นๆ จะทำให้ชุดข้อมูลของเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีความบิดเบือน ส่งผลให้การวิเคราะห์ชุดข้อมูลดังกล่าวเพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีนที่สนใจมีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น การเตรียมโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิด โปรตีนดังกล่าวสามารถถูกตัดแยกจากโพลิอะคริลาไมด์เจลจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ 2-DE ได้โดยตรง จากนั้นโปรตีนตัวอย่างจะถูกนำไปผ่านขั้นตอนการการเปลี่ยนแปลงด้วยสารเคมี เช่น DTT และ IAA ซึ่งจะทำหน้าที่ในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอิน และทำหน้าที่เติมหมู่อัลคิลไปยังกรดอะมิโนซิสเทอินที่เป็นองค์ประกอบภายในโปรตีนตัวอย่าง ตามลำดับ ภายหลังจากขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว โมเลกุลโปรตีนจะถูกย่อยเป็นเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) เอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) เป็นต้น จากนั้นเปปไทด์จะถูกสกัดแยกจากโพลิอะคริลาไมด์เจลโดยสารอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) และถูกทำให้แห้งภายใต้สภาวะไร้อากาศ (vacuum) โดยจะถูกทำให้มีการแขวนลอยด้วยน้ำกลั่นก่อนจะนำไปทำการวิเคราะห์มวลของเปปไทด์ต่อไป โดยเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มวลสำหรับการศึกษานี้ แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ MALDI-TOF และ LC/MS/MS ซึ่งภายหลังจากการวิเคราะห์มวล (mass) ของเปปไทด์จะทำให้ได้ชุดข้อมูลของมวลของเปปไทด์แต่ละชิ้น โดยชุดข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลของโปรตีนที่มีอยู่ภายในฐานข้อมูลเพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีน โดยภายหลังจากขั้นตอนการวิเคราะห์ดังกล่าวจะทำให้ทราบได้ว่าโปรตีนที่ต้องการศึกษาดังกล่าวนี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นโปรตีนชนิดใด