

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

วัสดุ ไบยางพาราสายพันธุ์ RRIT251

สารเคมีที่ใช้มีดังนี้ Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits จากบริษัท Invitrogen, QIAquick® Gel Extraction Kit จากบริษัท QIAGEN, QIAprep® Spin Miniprep Kit จากบริษัท QIAGEN, Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate จากบริษัท Bio-Rad

3.2 อุปกรณ์

ตารางที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์สำคัญที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท
Autoclave	HA-300MII	HIRAYAMA
Gel documentation	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Gel electrophoresis Apparatus	Sub-Cell GT MINI	Bio-Rad
Incubator	KB115	WTB-binder
Microcentrifuge	D3024R	SCILOGEX
Micropipette	Finnpipette®	ThermoLabsystems
PCR Instrument	iCycler iQ™	Bio-Rad
SDS-PAGE Apparatus	Mini PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad
Transblot Apparatus	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
UV-VIS Spectrophptometer	Perkin Elmer Lambda 25/UV Visible	Perkin Elmer
Water Bath	FTE10DE	TECHNE

3.3 วิธีการศึกษา

3.3.1 การสังเคราะห์คอมบินาเรชั่นที่เอ็นของยีน *V-ATPase G Subunit* ในยางพารา

เปลื้อง สุวรรณมณีและคณะ (2552 : 93) วิเคราะห์การแสดงออกของยีนในใบยางพารา ระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและต่ำด้วยเทคนิค cDNA-AFLP สามารถคัดเลือก Transcription Derived Fragments (TDFs) ที่มีความเข้มมากในกลุ่มสายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงได้ จำนวน 22 TDF โดย TDFLEP083 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ Homology กับ Vacuolar ATP Synthase Subunit G Plant ของ *Ricinus communis* (accession no. GAHK01014188.1, E value = $1e-25$) ต่อมา Pluang Suwanmanee, Wanphen Nanthanuwat and Waraporn Kun-ngeon (2013: 182) ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *V-ATPase* โดยใช้เทคนิค RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) ซึ่งมีขนาด 642 คู่เบส จึงได้ออกแบบ Primer ให้ครอบคลุมในส่วน ของ Open Reading Frame ซึ่งมีขนาด 330 คู่เบส สกัด Total RNA จากใบยางพาราสายพันธุ์ RRIT251 แล้วนำ Total RNA ไปสังเคราะห์ ssDNA (Single strand complementary DNA) โดยใช้ เอนไซม์ Reverse Transcriptase จากนั้นเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* ในยางพาราโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งมี Forward Primer และ Reward Primer ดังนี้ (ภาพที่ 12)

Forward Primer 5'-CACCATGGATTCCAACAGGGGT-3'

Reward Primer 5'-CTAGTTCTTCACTGTAGTCACATGCTTCAGAAG-3'

ที่จำเพาะกับยีน *V-ATPase G subunit* จากนั้นเพิ่มปริมาณของยีน โดยมีองค์ประกอบดังนี้

Deionized water	40	μl
10x Advantage® 2 Polymerase Mix	5	μl
dNTP Mix (10 mM)	1	μl
Forward primer	1	μl
Reward primer	1	μl
V-ATPase pGEM®-1	1	μl
50x Advantage® 2 PCR buffer	1	μl
ปริมาตรรวมเท่ากับ	50	μl

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Micropipette ดูดขึ้นลงเบาๆ จากนั้นนำไปทำ PCR โดยใช้เครื่อง Thermo Cycler ที่ปรับตั้งโปรแกรมการทำงาน โดยพิจารณาจากค่า T_m ของ Primer จึงปรับตั้ง โปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส

เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที นำ PCR Product ไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 % ที่ย้อมด้วย Ethidium Bromide (EtBr) ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ตัดแถบ cDNA เป้าหมายใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เพื่อนำไปแยก cDNA ออกจากเจลอะกาโรสต่อไป

5'-ATGGATTCCAACAGGGGTCAGAATGGAATTCAACTCCTGCTAGCTGCAGAACAGGAAGCT
3'-TACCTAAGGTTGTCCCGAGTCTTACCTTAAGTTGAGGACGATCGACGCTTGTCTTCGA
5'-CACCATGGATTCCAACAG-3'

CAGCACATTGTCAATGCTGCTAGGAATGCAAAAATGGCTAGATTGAAACAGGCCAAGGAA
GTCGTGTAACAGTTACGACGATCCTTACGTTTTTACCGATCTAACTTTGTCCGGTTCCTT

GAGGCTGAAAAGGATATTGCTGAATTCGTCGCCATATGGAAGCTGAGTTCCAGAGGAAAG
CTCCGACTTTTCTATAACGACTTAAGGCACGGGTATACCTTCGACTCAAGGTCTCCTTC

GTTGCAGAGAGTAGCGGGGACTCTGGTGCTAATGTGAAGCGGCTTGAGCAAGAAACGGAG
CAACGTCTCTCATCGCCCTGAGACCACGATTACACTTCGCCGAACTCGTTCTTTGCCTC

GCAAAGATTTCATCACCTCGAGATAGAGGCAGCAAGAAATATCTCACGATGTGGTACATATG
CGTTTCTAAGTAGTGAGCTCTATCTCCGTCGTTCTTATAGAGTGCTACACCATGTATAC

3-GAAGACTTTCGTACACTGATGTCACTTCTTGATC-5'
CTTCTGAAGCATGTGACTACAGTGAAGAAC-3'
GAAGACTTTCGTACACTGATGTCACTTCTTG-5'

ภาพที่ 12 ตำแหน่งลำดับเบสบริเวณ Coding Region ของยีน *V-ATPase G Subunit* ที่สังเคราะห์ขึ้น เพื่อใช้เชื่อมกับ pET100/D-TOPO[®] Vector (ตัวอักษรสีแดงเป็นรหัสเริ่มต้น ATG และ ATC เป็นรหัสหยุด)

3.3.2 การแยก cDNA *V-ATPase G Subunit* ออกจากเจลอะกาโรส

ใช้ QIAquick[®] Gel Extraction Kit (50) จากบริษัท QIAGEN โดยตัดแถบ DNA ออกจากเจลอะกาโรสใส่หลอด 1.5 ml แล้วนำไปล้างด้วย Buffer QG (100 mg gel~100 µl) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พร้อมทั้งเขย่าทุกๆ 2 นาที เติมน้ำ Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าแล้วผสมให้เข้ากัน คัดสารละลายใส่ใน QIAquick Spin Column แล้วนำไป Centrifuge ด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน QIAquick Spin Column ออกไป เติมน้ำ Buffer QG ปริมาตร 500 µl ลงใน QIAquick Spin Column และนำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน QIAquick Spin Column ออกไป ล้าง QIAquick Spin Column ด้วย Buffer PE ปริมาตร 750 µl นำไป

Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน QIAquick Spin Column ออกไป แล้ว Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำ QIAquick Spin Column ใส่ในหลอด 1.5 ml ละลายตะกอน DNA ด้วย Buffer EB ปริมาตร 50 μ l นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาทีและเติม Buffer EB ปริมาตร 30 μ l แล้วตั้งไว้ 5 นาที เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DNA นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายในหลอด 1.5 ml ใส่หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

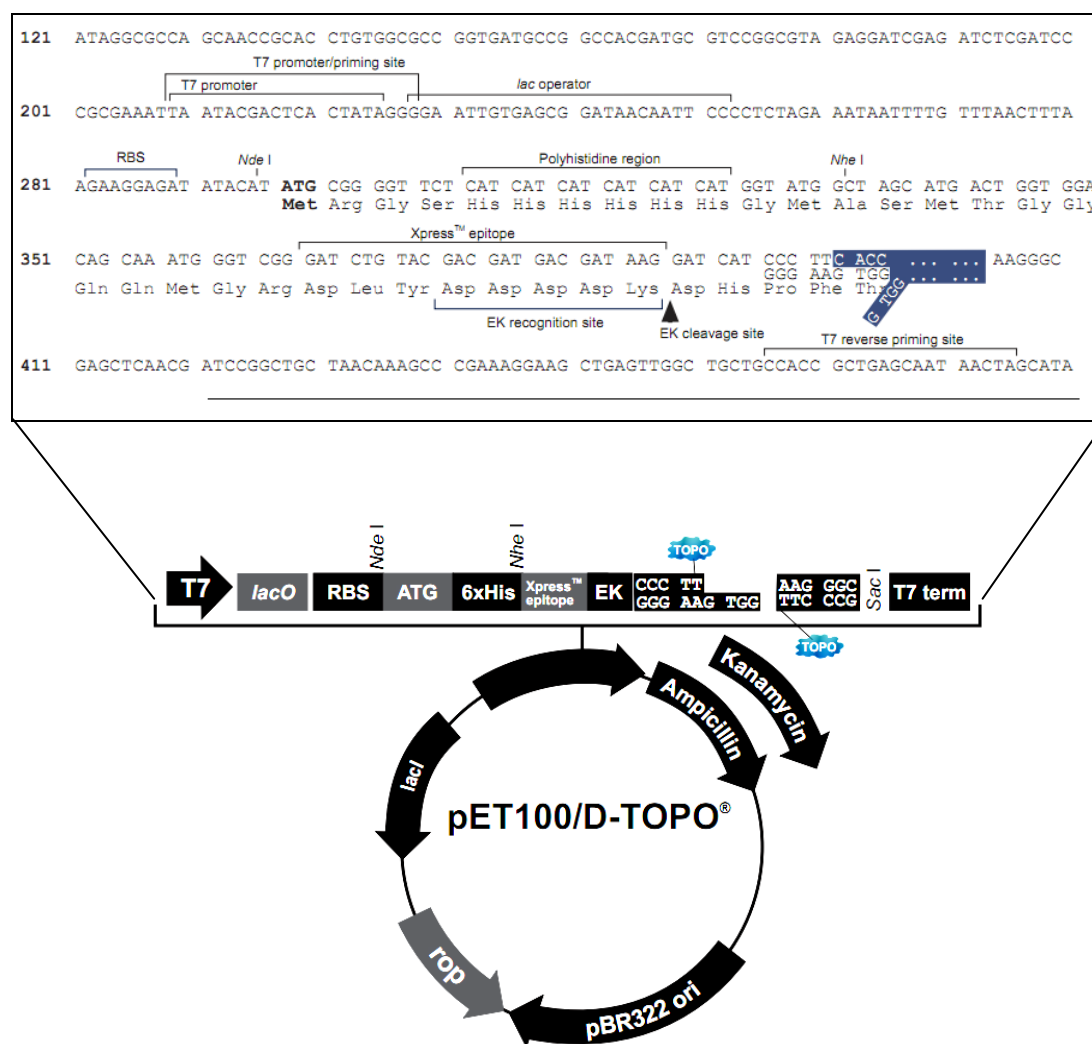
3.3.3 การเชื่อมต่อ cDNA *V-ATPase G Subunit* เข้ากับ pET 100/D-TOPO[®] vector และถ่าย รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* One Short[®] TOP10

เมื่อแยก cDNA *V-ATPase G Subunit* ออกจากเจลแล้ว นำไปเชื่อมต่อกับ pET 100/D-TOPO[®] Vector (ภาพที่ 13) โดยอาศัยเอนไซม์ TOPO Isomerase ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีดังนี้

PCR Product	2	μ l
Salt Solution	1	μ l
Sterile Water	2	μ l
pET 100/D-TOPO [®] Vector	1	μ l
ปริมาตรรวม	6	μ l

ผสมสารเคมีข้างต้นด้วย Micropipette ดูดขึ้นลงเบาๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เข้าสู่ แบคทีเรีย *E.coli* One Short[®] TOP10 Competent Cell ด้วยวิธี Heat Shock โดยวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำมาวางบนน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม S.O.C Medium (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อมาทาด (Spread) บนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani) ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin 50 mg/ml แล้ววางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน คัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีการ PCR ซึ่งใช้ Primer ที่จำเพาะกับยีน *V-ATPase G Subunit* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* จึงนำเซลล์แบคทีเรียไปเตรียมพลาสมิดโดยการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วน DNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 mg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมงแล้วตรวจสอบโคโลนี

ของ *E.coli* One Short® TOP10 ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ Primer ที่จำเพาะกับยีน *V-ATPase G Subunit* แล้วนำ PCR Product มาทำ Electrophoresis ใน เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ที่ย้อมด้วย EtBr 0.1 mg/ml



ภาพที่ 13 แผนที่ของเวกเตอร์ pET100/D-TOPO®

นำโคลนของ *E.coli* One Short® TOP10 ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* มาเตรียมพลาสมิด โดยใช้ QIAprep® Spin Miniprep Kit (50) จากบริษัท QIAGEN นำ แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว LB ไป Centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดอาหารเหลว LB ที่ แล้วเติม Buffer P1 ปริมาตร 250 µl ผสมให้เข้ากัน เติม Buffer P2 ปริมาตร

250 μ l ผสมให้เข้ากันเบาๆ เติม Buffer N3 ปริมาตร 350 μ l ผสมให้เข้ากันเบาๆนำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่ QIAprep Spin Column ที่วางอยู่ใน Collection Tube นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสใน Collection Tube ที่นั่ง นำ QIAprep Spin Column มาวางไว้ใน Collection Tube เติม Buffer PB ปริมาตร 500 μ l ลงใน QIAprep Spin Column นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสใน Collection Tube ที่นั่ง นำ QIAprep Spin Column มาวางไว้ใน Collection Tube เติม Buffer PE ปริมาตร 750 μ l นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสใน Collection Tube ที่นั่ง นำ QIAprep Spin Column มาวางไว้ใน Collection Tube และ Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำ QIAprep Spin Column มาวางในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติม Buffer EB ปริมาตร 50 μ l วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ ตรวจสอบยืนยันเป้าหมายโดยการนำพลาสมิดที่เตรียมได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะกับยีน *V-ATPase G subunit* แล้วนำ PCR Product มาทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ย้อมด้วย EtBr 0.1 mg/ml ตรวจสอบ Integrity ของพลาสมิดโดยการทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 % ย้อมเจลด้วย EtBr (0.1 mg/ml) การวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของพลาสมิดนำพลาสมิดที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงระหว่างความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) พลาสมิดที่บริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 2.0 คำนวณหาความเข้มข้นของพลาสมิดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (1 OD = 50 μ g/ml) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

3.3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V-ATPase G Subunit* ในรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

เอ *V-ATPase G Subunit*

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V-ATPase G Subunit* ในรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* และลำดับกรดอะมิโน คำนวณน้ำหนักโมเลกุล ค่า pI (Isoelectric Point) โดยใช้โปรแกรม http://web.expasy.org/compute_pi/

3.3.5 การเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* จาก *E.coli* One

Shot® TOP10 เข้าสู่ *E.coli* BL21 Star™(DE3)

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสแล้วจึงถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* BL21 Star™(DE3) One Short® เพื่อให้มีการสังเคราะห์โปรตีน *V-ATPase G Subunit* โดยเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* BL21 Star™(DE3) One Short® ด้วยวิธี Heat Shock โดยวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที นำมาวางบนน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม S.O.C medium (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) นำเชื้อไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาวาด(Spread) บนอาหารแข็ง LB(Luria Bertani) ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 mg/ml แล้ววางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืนแล้วคัดเลือกโคโลนี *E.coli* BL21 Star™(DE3) ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* โดยวิธีการ PCR ซึ่งใช้ Primer ที่จำเพาะกับยีน *V-ATPase G Subunit* แล้วนำ PCR Product มาทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ที่ย้อมด้วย EtBr 0.1 mg/ml

3.3.5.1 วิเคราะห์ความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสม

นำเชื้อ *E.coli* BL21 Star™(DE3) One Short® ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 ml ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นจากนั้นนำเซลล์เริ่มต้น ปริมาตร 60 µl เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 6 ml ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (OD₆₀₀~0.6) จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 6 หลอด หลอดละ 1 ml โดยหลอดที่ 1 ไม่มีการเหนี่ยวนำ (Uninduced) ให้มีการสร้างโปรตีน *V-ATPase G Subunit* จึงไม่เติม Isopropyl O-D-Thiogalactopyranoside (IPTG) สำหรับหลอดที่ 2-6 เหนี่ยวนำ (Induced) ให้มีการสร้างโปรตีน *V-ATPase G Subunit* โดยเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 mM, 0.7 mM, 0.9 mM, 1.2 mM และ 1.5 mM ตามลำดับ จากนั้นเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อมา Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเตรียมโปรตีนด้วยวิธี Freeze-Thaw Lysis โดยนำตะกอนเชื้อ *E.coli* BL21 Star™(DE3) One Short® ทั้ง Uninduced และ Induced ด้วย IPTG ที่ละลายด้วยสารละลาย STE (0.1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH6.8, 1 mM EDTA) ปริมาตร 100 µl ที่ผสมด้วย 1

mM PMSF, 1 mg/ml lysozyme, 5U DNase และ 10 mg/ml RNase วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำออกมาวางที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายตะกอนเชื้อละลาย บ่มในก๊าซไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 นาที และบดด้วย Glass Potter-Elvehjem Homogenizer แล้ว Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายโปรตีนสำหรับวิเคราะห์โปรตีนที่ละลาย (Soluble Protein) สำหรับตะกอนเชื้อเติม SDS Loading Buffer (0.35M Tris-HCl pH 6.8, 10.28% SDS, 36% glycerol, 5% β -mercaptoethanol และ 0.012% Bromophenol Blue) ปริมาตร 50 μ l แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสวโน้ตขึ้นบน (Supernatant) จากนั้นจึงนำสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ไปทำ SDS-PAGE (Acrylamide:bisacrylamide; 29:1) ที่ความเข้มข้นของ Polyacrylamide Gel ชั้นบน (Stacking) 4% และชั้นล่าง (Separating) 13% จากนั้นย้อมแถบโปรตีนด้วย 0.2% Coomassie Blue R250 (ละลายใน 40% Methanol และ 10% Acetic Acid)

3.3.5.2 วิเคราะห์อุณหภูมิบ่มเซลล์ที่เหมาะสม

นำเชื้อ *E.coli* BL21 StarTM(DE3) One Short[®] ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ปริมาตร 40 μ l เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 4 ml ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (OD₆₀₀~0.6) จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 4 หลอด หลอดละ 1 ml โดยหลอดที่ 1 ไม่เติม IPTG (Uninduced) หลอดที่ 2-4 Induced ด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 mM จากนั้นเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บตะกอนเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเตรียมโปรตีนจากส่วนต่างๆ และตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE ตามวิธีการที่กล่าวในตอนต้น

3.3.5.3 วิเคราะห์ระยะเวลาบ่มเซลล์ที่เหมาะสม

นำเชื้อ *E.coli* BL21 StarTM(DE3) One Short[®] ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ปริมาตร 40 μ l เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 4 ml ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (OD₆₀₀~0.6) จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 4 หลอด หลอดละ 1 mL โดยหลอดที่ 1 ไม่เติม IPTG หลอดที่ 2-4 Induced โดยเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 mM จากนั้นเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง และ 16 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมา Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา

10 นาที และเก็บตะกอนเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเตรียมโปรตีนจากส่วนต่างๆ และตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

3.3.6 การเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ *E.coli* BL21 Star™(DE3) One Short® ที่ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน V-ATPase G Subunit แล้วเลี้ยงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จน OD600 ~ 0.6 แล้วเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน V-ATPase G Subunit โดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไป Centrifuge ที่ 5,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูอาหารออก เติม Lysis Buffer (0.5 M Tris-HCl pH 8.6, Glycerol, 10% SDS, Bromophenol Blue, B-mercapoethanol) ต้มในน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำ SDS-PAGE ตัดแถบโปรตีน V-ATPase G Subunit จากเจลอะคริลามัด แช่ใน 1M PBS ปริมาตร 1 ml เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บดด้วย Glass Potter-Elvehjem Homogenizer นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสชั้นบนไปตรวจสอบโปรตีนที่แยกมาได้โดยวิธี SDS-PAGE

3.3.7 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่ทำให้บริสุทธิ์ปริมาณ 500 µg ผสมกับ complete Freund's Adjuvant ในอัตรา 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอและสะโพกของกระต่ายสายพันธุ์นิวซีแลนด์ ไวท์ อายุประมาณ 6 เดือน และฉีดกระตุ้นทุกๆ 2 สัปดาห์เป็นจำนวน 9 ครั้ง โดยครั้งแรกจะใช้ Complete Freund's Adjuvant ในครั้งที่ 2-9 ใช้ Incomplete Freund's Adjuvant ฉีดกระต่ายทั้งหมดจำนวน 3 ตัว หลังจากฉีดกระตุ้นทุกๆ 2 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่ายโดยการดูดเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหู (Marginal Ear Vein) ไปเตรียมซีรัมพร้อมทั้งตรวจหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์ และทดสอบความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit โดยวิธี Ouchterlony และวิธี Western Blot

3.3.8 การตรวจหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี Indirect ELISA

เคลือบ Microtiter Plate ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ความเข้มข้น 10 µg/ml หลุมละ 150 µl วางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทิ้งสารละลายใน Microtiter Plate และล้างด้วย 0.05 M PBS (Phosphate Buffer Saline) ที่มี 0.05 % Tween - 20(PBST) จำนวน 3 ครั้ง เติม Blocking Solution (5% Skim Milk, 0.1 M PBS+ Tween 20) ปริมาตร

หลุมละ 200 μ l วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งสารละลายใน Microtiter Plate และล้างด้วย 0.05 M PBS (Phosphate Buffer Saline) ที่มี 0.05 % Tween -20(PBST) จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม Primary Antibody ที่ผลิตได้จากกระต่ายที่ระดับการเจือจาง 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200, 1:102400, 1:204800, 1:409600, 1:819200, 1:1638400, 1:3276800, 1:6553600 และ 1:13107200 เท่า หลุมละ 150 μ l วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งสารละลายใน Microtiter Plate และล้างด้วย 0.05 M PBS (Phosphate Buffer Saline) ที่มี 0.05 % Tween 20 (PBST) จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม Second Antibody (Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Conjugate) เจือจาง 1:3000 เท่า หลุมละ 150 μ l วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งสารละลายใน Microtiter Plate และล้างด้วย 0.05 M PBS (Phosphate Buffer Saline) ที่มี 0.05 % Tween -20(PBST) จำนวน 3 ครั้ง เติม Developer (50 mM Citrate Phosphate Buffer pH 5.0, 0.4 mg/ml OPD, 0.012% H_2O_2) หลุมละ 150 μ l ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยา โดยการเติม 2 M H_2SO_4 หลุมละ 50 μ l นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm ด้วยเครื่อง ELISA Reader Plate

3.3.9 การตรวจสอบแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit โดยวิธี Ouchterlony

การตรวจสอบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit โดยดูแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ในแผ่นวุ้นตามวิธีของ Ouchterlony (1949) ซึ่ง Agar 1.5 กรัม ละลายใน 0.9 % Normal Saline ปริมาตร 100 ml ต้มให้เดือด และหยอดลงบนกระจกสไลด์ขนาด 25 x 75 mm กระจายทั่วแผ่นกระจกสไลด์อย่างสม่ำเสมอ ปริมาตร 3 ml/แผ่น วางไว้ให้เกิดการแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที และวางไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเจาะรูและดูดวุ้นออกโดยปั๊มสูญญากาศ หยอดรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่ใช้ฉีดกระต่ายปริมาตร 10 μ g ลงหลุมที่อยู่ตรงกลางและหยอดซีรัมจากกระต่ายในหลุมที่อยู่รอบๆ หลุมละ 0.8 mg นำกระจกสไลด์วางในงานแก้ว ใช้สำลีชุบน้ำพอหมาดๆ ทำเป็นก้อนวางข้างๆ สไลด์ 2 ก้อน วางงานแก้วไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12 ชั่วโมง จึงนำกระจกสไลด์มาสังเกตดูแถบโปรตีน

3.3.10 การตรวจสอบแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน

V-ATPase G Subunit และโปรตีน V-ATPase Subunit G ในยางพารา โดยวิธี Western Blot

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 60 µg มาทำ SDS-PAGE นอกจากนี้ใช้โปรตีนจากใบยาง น้ำยางและ Cell Lysis จาก Cell *E.coli* BL21 Star™(DE3) One Short® ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยัง Nitrocellulose Membrane โดยใช้ Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) ใน 1X Towbin Buffer pH 8.3 (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % Methanol) ที่ 100 โวลต์ (350 มิลลิแอมแปร์) เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง นำแผ่นเจลมาย้อมด้วย 2 % Coomassie Brilliant Blue R250 เพื่อตรวจสอบว่า โปรตีนได้เคลื่อนย้ายไปยังแผ่น Nitrocellulose Membrane ได้สมบูรณ์หรือไม่ นำแผ่น Nitrocellulose Membrane ที่มีโปรตีน V-ATPase Subunit G มา Block ด้วย Blocking Solution ที่ประกอบด้วย 3% BSA ใน 0.025 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.02% Sodium Azide และ 0.05% Tween 20 (TTBS) เขย่าไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่น Nitrocellulose Membrane ที่มีโปรตีน V-ATPase Subunit G มาบ่มด้วย Primary Antibody รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่ผลิตได้จากกระต่าย (Dilute 1:1000 เท่า) ใน 1 %BSA ที่ละลายในสารละลาย TTBS เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างส่วนของ Non-Specific Binding Protein ออกจากแผ่น Nitrocellulose Membrane ด้วยสารละลาย TTBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้นบ่มกับ Secondary Antibody Goat Anti-Rabbit IgG (H+R)-HRP Conjugate (1:3,000 เท่า) ใน 1% BSA ที่ละลายในสารละลาย TTBS ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างส่วนที่จับกันไม่จำเพาะออกด้วย TTBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที ตรวจสอบโปรตีนโดยย้อมด้วยสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ประกอบด้วย 0.05% O-Dianisidine, 16.8 % Methanol, 50 mM Sodium Acetate Buffer pH 5.4, 0.1 M H₂O₂ จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา