

บทที่ 4

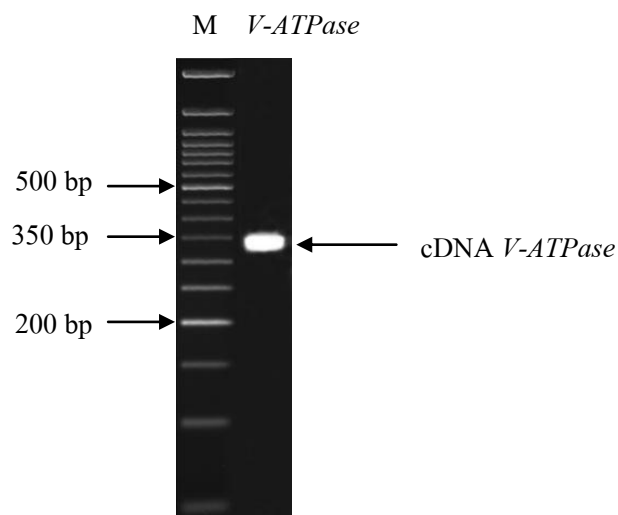
ผลการวิจัย

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ของยางพารา ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอของยีน *V-ATPase G Subunit* ในยางพารา

4.1.1 การเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* ในใบยางพาราสายพันธุ์ RRIT 251

จากการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* ด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ Primer ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับยีน *V-ATPase G Subunit* จากนั้นนำ PCR Product ไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรส 2 % ที่ย้อมด้วย EtBr (Ethidium Bromide) 0.1 mg/ml พบว่ามีแถบ cDNA ขนาดประมาณ 350 คู่เบสอย่างชัดเจน (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 การทำ Electrophoresis cDNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* จากปฏิกิริยา PCR (M)
เครื่องหมาย DNA ขนาด 50 คู่เบส (*V-ATPase*) cDNA ของยีน *V-ATPase G Subunit*

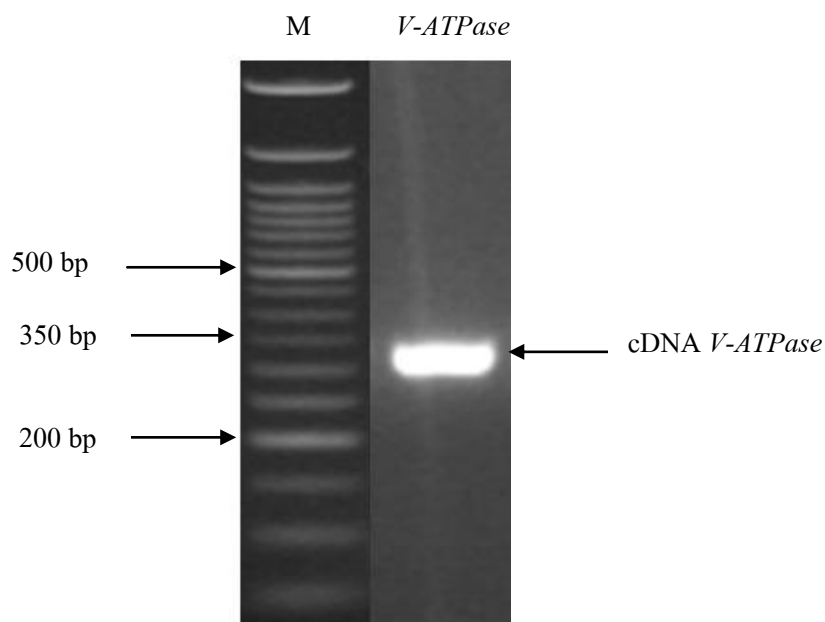
4.1.2 การเชื่อมต่อ cDNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* เข้ากับ pET100/D-TOPO[®]

Vector และถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* One Shot[®] TOP10

เมื่อนำ cDNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* เชื่อมต่อกับ pET100/D-TOPO[®] Vector โดยใช้เอนไซม์ TOPO Isomerase ได้รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ถ่ายโอน (Transformation) เข้าสู่ *E.coli* One Shot[®] TOP10 ด้วยวิธี Heat Shock แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani) ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/ml ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะการด้านต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin ของเซลล์แบคทีเรีย โดยเซลล์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* จะเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin สำหรับเซลล์ที่ไม่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ได้ (ภาพที่ 15) แล้วคัดเลือกโคโลนี *E.coli* One Shot[®] TOP10 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 พบว่า โคโลนีที่คัดเลือกมีแถบ DNA เพียงแถบเดียว ซึ่งมีขนาดประมาณ 350 คู่เบส (ภาพที่ 16) ที่คาดว่าเป็นแถบของยีน *V-ATPase G Subunit* จึงคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* นี้ไปเตรียมพลาสมิดต่อไป



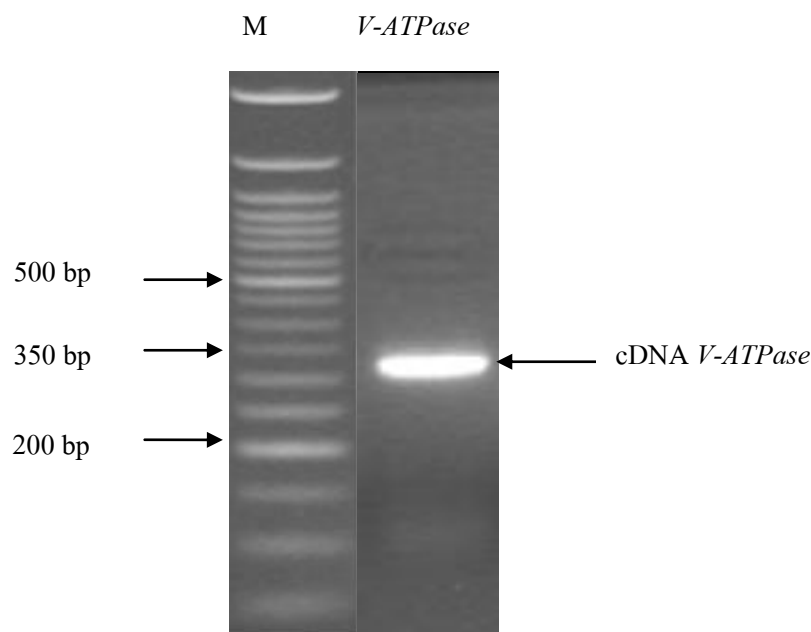
ภาพที่ 15 โคโลนีของ *E.coli* One Shot[®] TOP10 ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit*



ภาพที่ 16 การตรวจสอบโคลน *E.coli* One Shot[®] TOP10 ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* (M) เครื่องหมาย DNA ขนาด 50 คู่เบส (*V-ATPase*) โคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit*

4.1.3 การเตรียมพลาสมิด

หลังจากคัดเลือกโคลน *E.coli* One Shot[®] TOP10 ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* แล้ว นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่ได้ไปเตรียมพลาสมิดโดยใช้ QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (50) จากนั้นตรวจสอบยืนยันเป้าหมายโดยการนำพลาสมิดที่เตรียมได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะกับยีน *V-ATPase G Subunit* แล้วนำ PCR Product มาทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 % ที่ย้อมด้วย EtBr 0.1 mg/ml พบว่า มีแถบ DNA เป้าหมายเพียงแถบเดียว ซึ่งมีขนาดประมาณ 350 คู่เบส สอดคล้องกับขนาดของเครื่องหมาย DNA (ภาพที่ 17)



ภาพที่17 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* (M) เครื่องหมาย
DNA ขนาด 50 คู่เบส (*V-ATPase*) รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit*

4.1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V-ATPase G Subunit* ในรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

V-ATPase G Subunit

จากการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* ในยางพาราเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับเบสของ pET 100/D-TOPO[®] Vector เรียงลำดับต่อเนื่องกับลำดับเบสของยีน *V-ATPase G Subunit* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 330 คู่เบส ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน 110 กรดอะมิโน (ภาพที่ 18) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 12.35 กิโลดาลตัน(kDa) ค่า pI (Isoelectric Point) เท่ากับ 6.38 แสดงว่า pET 100/D-TOPO[®] Vector เชื่อมต่อกับยีน *V-ATPase G Subunit* ในตำแหน่งของ Open Reading Frame ที่ถูกต้อง

Poly Histidine Region

1	ATA	CAT	ATG	CGG	GGT	TCT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	GGT	ATG	GCT	AGC	ATG	45	
1	-	-	M	R	G	S	H	H	H	H	H	G	M	A	S	M	15	
46	ACT	GGT	GGA	CAG	CAA	ATG	GGT	CGG	GAT	CTG	TAC	GAC	GAT	GAC	GAT	AAG	GAT	90
16	T	G	G	Q	Q	M	G	R	D	L	Y	D	D	D	D	K	D	30
91	CAT	CCC	TTC	ACC	ATG	GAT	TCC	AAC	AGG	GGT	CAG	AAT	GGA	ATT	CAA	CTC	CTG	135
31	H	P	F	T	M	D	S	N	R	G	Q	N	G	I	Q	L	L	45
136	CTA	GCT	GCA	GAA	CAG	GAA	GCT	CAG	CAC	ATT	GTC	AAT	GCT	GCT	AGG	AAT	GCA	180
46	L	A	A	E	Q	E	A	Q	H	I	V	N	A	A	R	N	A	60
181	AAA	ATG	GCT	AGA	TTG	AAA	CAG	GCC	AAG	GAA	GAG	GCT	GAA	AAG	GAT	ATT	GCT	225
61	K	M	A	R	L	K	Q	A	K	E	E	A	E	K	D	I	A	75
226	GAA	TTC	CGT	GCC	CAT	ATG	GAA	GCT	GAG	TTC	CAG	AGG	AAG	GTT	GCA	GAG	AGT	270
76	E	F	R	A	H	M	E	A	E	F	Q	R	K	V	A	E	S	90
271	AGC	GGG	GAC	TCT	GGT	GCT	AAT	GTG	AAG	CGG	CTT	GAG	CAA	GAA	ACG	GAG	GCA	315
91	S	G	D	S	G	A	N	V	K	R	L	E	Q	E	T	E	A	105
316	AAG	ATT	CAT	CAC	CTC	GAG	ATA	GAG	GCA	GCA	AGA	ATA	TCT	CAC	GAT	GTG	GTA	360
106	K	I	H	H	L	E	I	E	A	A	R	I	S	H	D	V	V	120
361	CAT	ATG	CTT	CTG	AAG	CAT	GTG	ACT	ACA	GTG	AAG	AAC	TAG	AAG	GGC	GAG	CTC	405
121	H	M	L	L	K	H	V	T	T	V	K	N	stop	-	-	-	-	135

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V-ATPase G Subunit* ซึ่งประกอบด้วยเบส ATG เป็นรหัส
เริ่มต้น (Start codon) รหัสหยุด (Stop codon) คือ TAG (ตัวอักษรสีแดง)

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

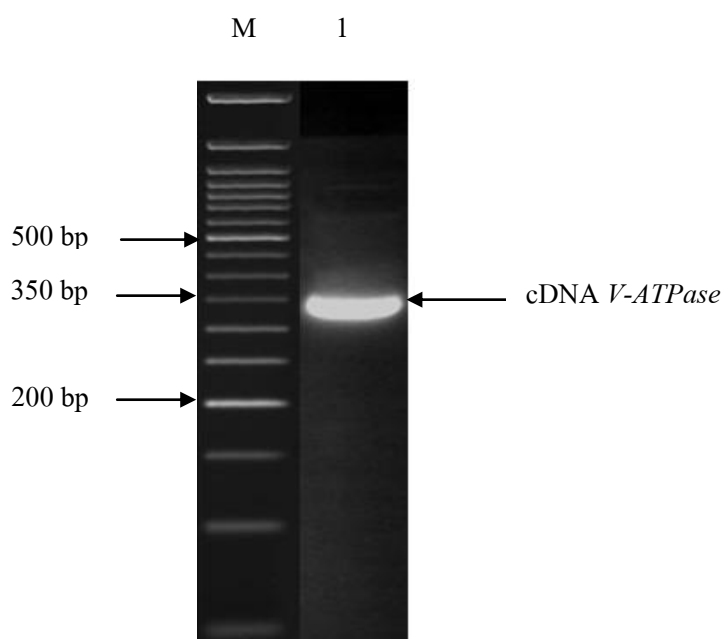
Shot® TOP10 เข้าสู่ *E.coli* BL21 Star™(DE3)

4.2.1 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เข้าสู่ *E.coli* BL21 Star™(DE3)

หลังจากนำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วจึงถ่ายโอน (Transformation) เข้าสู่ *E.coli* BL21Star™(DE3) One Short® ด้วยวิธี Heat Shock แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani) ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/ml เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4.2.2 การตรวจสอบโคลนีย์ของ *E.coli* BL21 Star™(DE3) ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* โดยวิธี PCR

หลังจากถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เข้าสู่ *E.coli* BL21 Star™(DE3) นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani) ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/ml ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะการต้านต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin ของเซลล์แบคทีเรีย โดยเซลล์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* จะเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin สำหรับเซลล์ที่ไม่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ได้ แล้วคัดเลือกโคโลนี *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 พบว่า โคโลนีที่คัดเลือกมีแถบ DNA เพียงแถบเดียว ซึ่งมีขนาดประมาณ 350 คู่เบสที่คาดว่าเป็นแถบของยีน *V-ATPase G Subunit* (ภาพที่19) จึงคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* นี้ไปชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน *V-ATPase G Subunit*

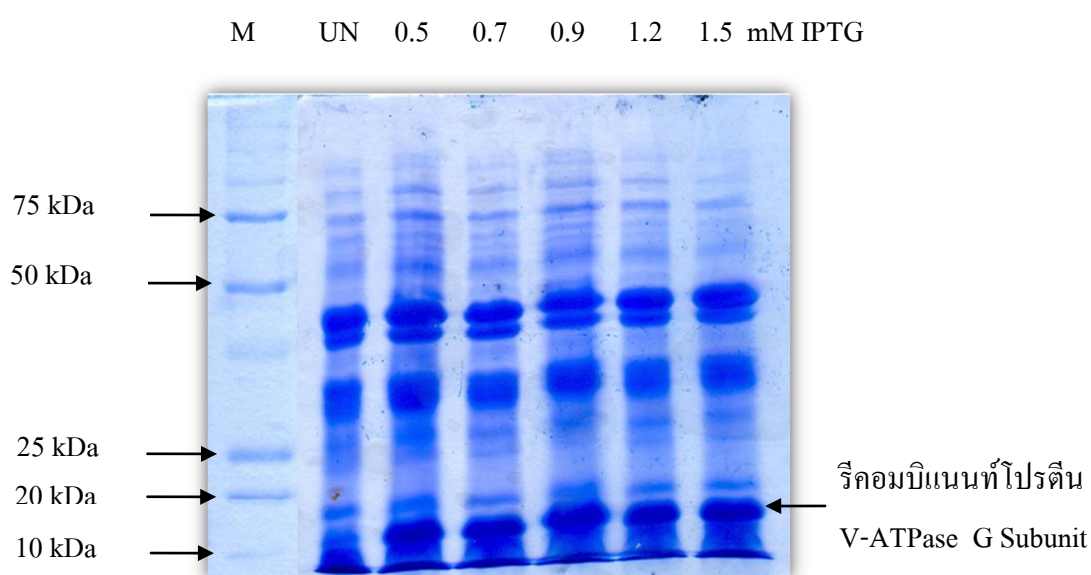


ภาพที่ 19 การตรวจสอบโคลนของ *E.coli* BL21 StarTM(DE3) ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* (M) เครื่องหมาย DNA ขนาด 50 คู่เบส
(1) รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit*

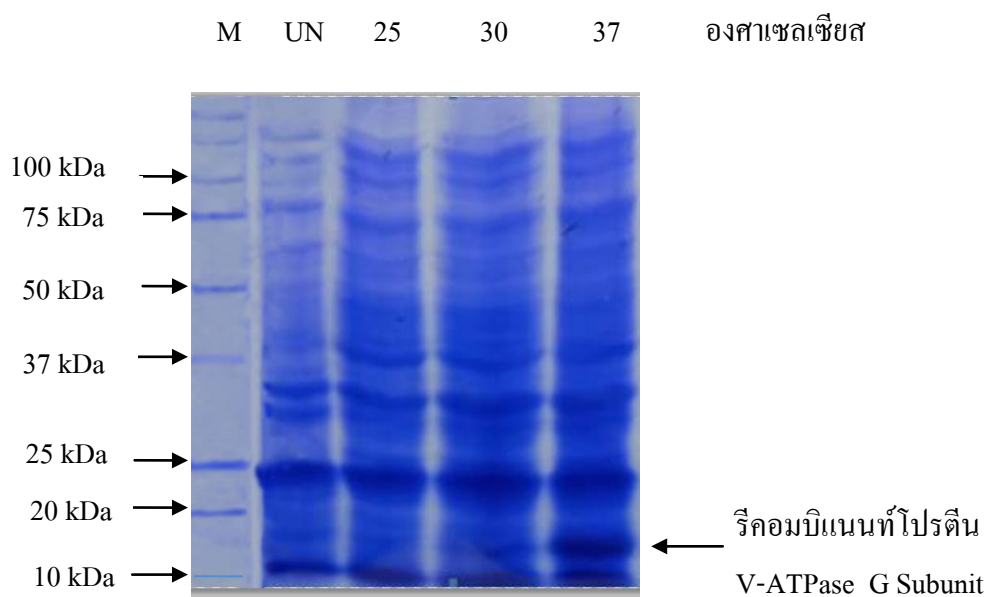
4.3 การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ใน *E.coli* BL21 StarTM(DE3)

นำโคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ไปเหนี่ยวนำให้เซลล์สังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit โดยใช้ IPTG (Isopropyl-B-D-Thiogalactopyranoside) เป็นสารเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน จากนั้นตรวจสอบด้วยการทำ Electrophoresis ในเจลอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 13 % ที่ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit มีขนาดประมาณกิโลดาลตัน 16 kDa แล้วจึงศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ประกอบด้วยความเข้มข้นของ IPTG อุณหภูมิในการบ่มเซลล์และเวลาที่ใช้ในการชักนำให้มีการสร้างโปรตีนซึ่งอาจมีผลต่อการสร้างโปรตีน พบว่า จากการเหนี่ยวนำให้เซลล์สังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่ความเข้มข้นของ IPTG 0.5, 0.7, 0.9, 1.2 และ 1.5 mM (Millimolar) ไม่เป็นผลให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit มีปริมาณการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามความ

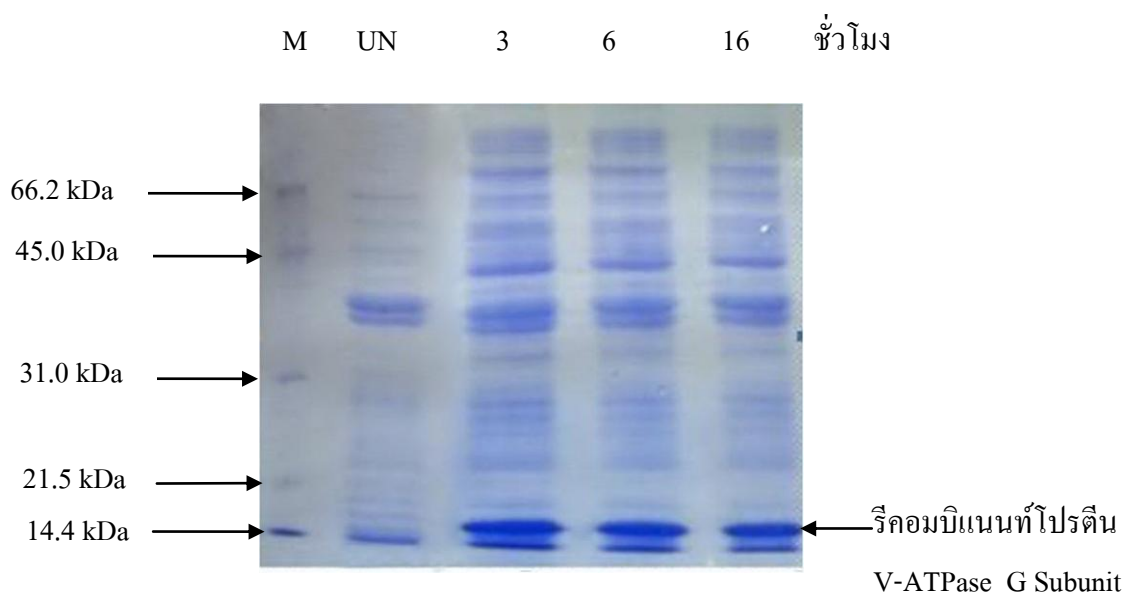
เข้มข้นของ IPTG) (ภาพที่ 20) และอุณหภูมิที่ใช้ในการชักนำให้มีการสังเคราะห์ รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 21) และเวลาที่ใช้ในการชักนำให้มีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่ 3 6 และ 16 ชั่วโมง พบว่าที่ 3 6 และ 16 ชั่วโมงไม่มีผลต่อการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 20 การทำ SDS-PAGE ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่สังเคราะห์ใน *E. coli* BL21 เหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5, 0.7, 0.9, 1.2 และ 1.5 mM และไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG (UN) (M) Protein Marker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



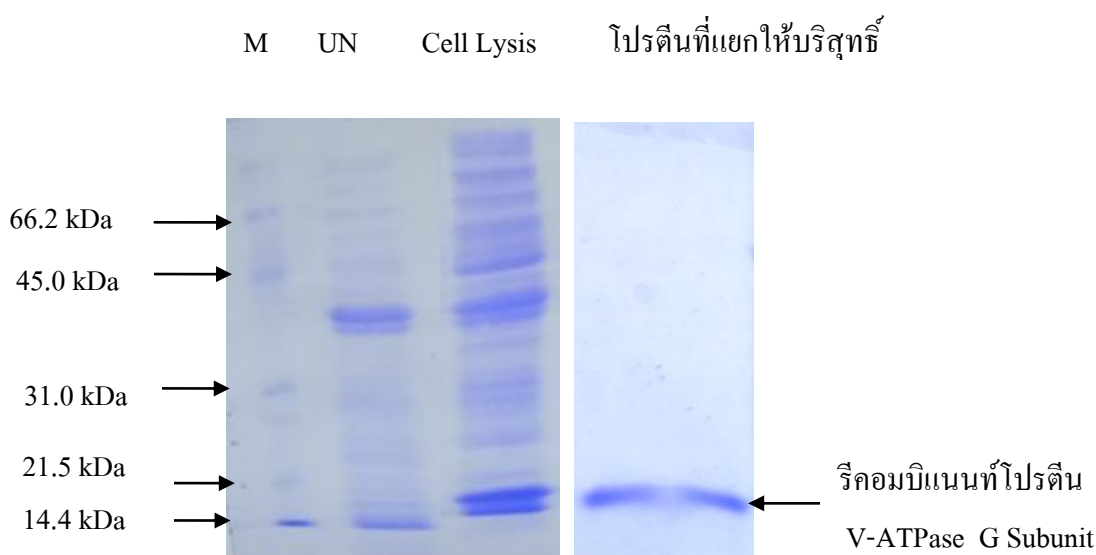
ภาพที่ 21 การทำ SDS-PAGE ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่สังเคราะห์ใน *E.coli* BL21 ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM และไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG (UN) ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส (M) Protein Marker



ภาพที่ 22 การทำ SDS-PAGE ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่สังเคราะห์ใน *E.coli* BL21 เหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM และไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG (UN) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3, 6 และ 16 ชั่วโมง (M) Protein Marker

4.4 การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ให้บริสุทธิ์

ในการแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ให้บริสุทธิ์นั้นใช้วิธี SDS-PAGE โดยการตัดแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit จากเจลอะครีลาไมด์ ใส่เจลไว้ใน 1 M PBS เป็นเวลา 1 คืน แล้วบดด้วย Glass Potter-Elvehjem Homogenizer จากนั้นนำเจลที่บดไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ว Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสเก็บไว้ตรวจสอบโปรตีนที่แยกมาได้ โดยการทำ SDS-PAGE บนเจลอะครีลาไมด์ ความเข้มข้น 13 % พบว่า แถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit มีเพียงแถบเดียวไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่น ซึ่งมีขนาดประมาณ 16 กิโลดาลตัน (kDa)(ภาพที่ 23) และนำไปฉีดกระตุ้นให้กับกระต่ายต่อไป



ภาพที่ 23 การทำ SDS-PAGE ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่แยกได้

(M) Protein Marker (UN) ไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG (Cell Lysis) *E.coli* BL21 ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG (โปรตีนที่แยกให้บริสุทธิ์) รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit

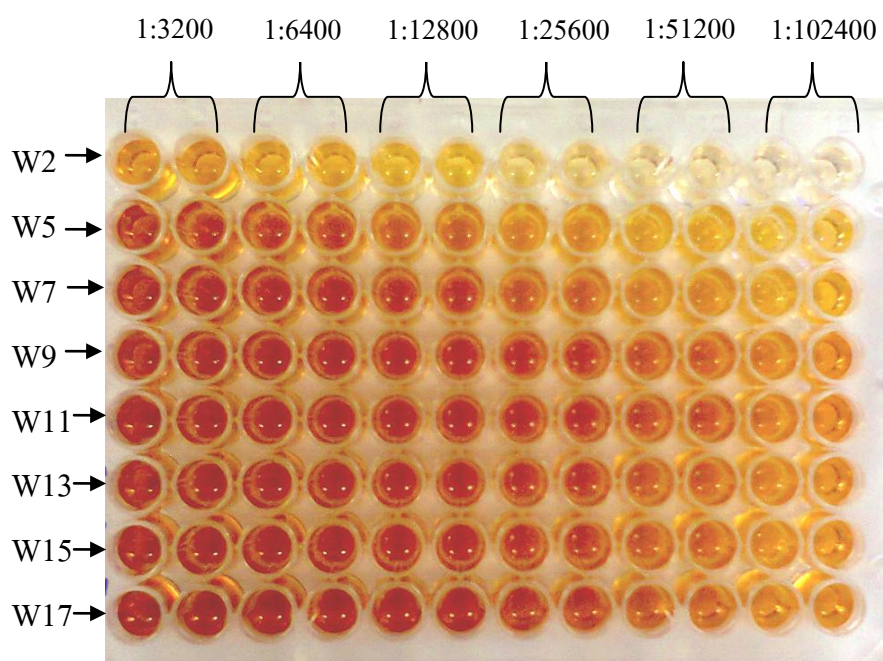
4.5 การผลิตโพลีคลอนอลแอนติบอดีในกระต่าย

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ผสมกับ Complete Freund's Adjuvant ในอัตรา 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอและสะโพกของกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White เป็นเวลา 17 สัปดาห์ และเก็บซีรัมกระต่ายมาทดสอบการผลิต Antibody Anti -V-ATPase

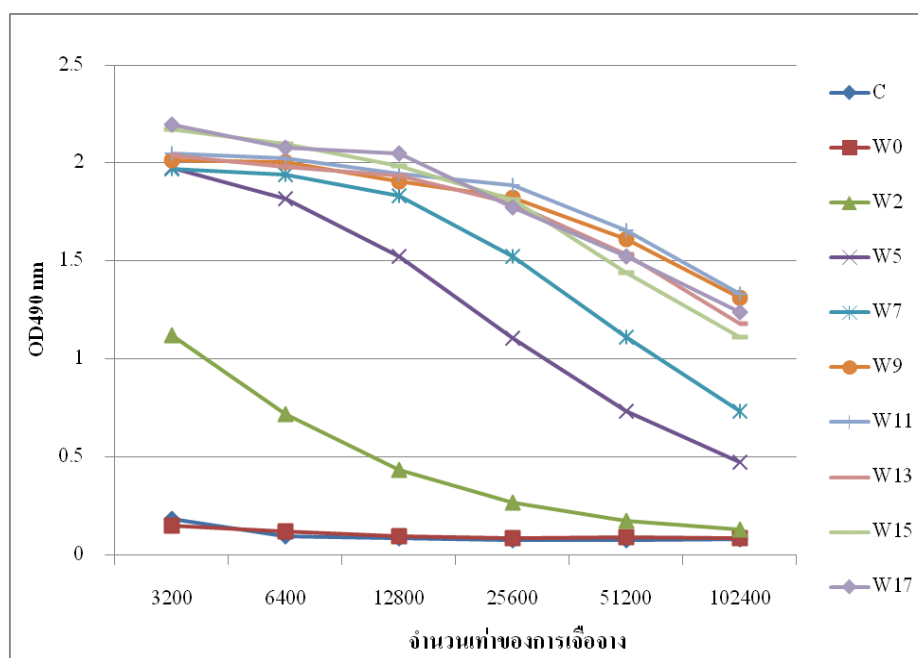
G Subunit ตรวจหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี Indirect ELISA และศึกษาความจำเพาะของซีรัม กระจายจะใช้วิธี Ouchterlony และ Western Blot ได้ผลการทดลองดังนี้

4.5.1 การตรวจหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี Indirect ELISA

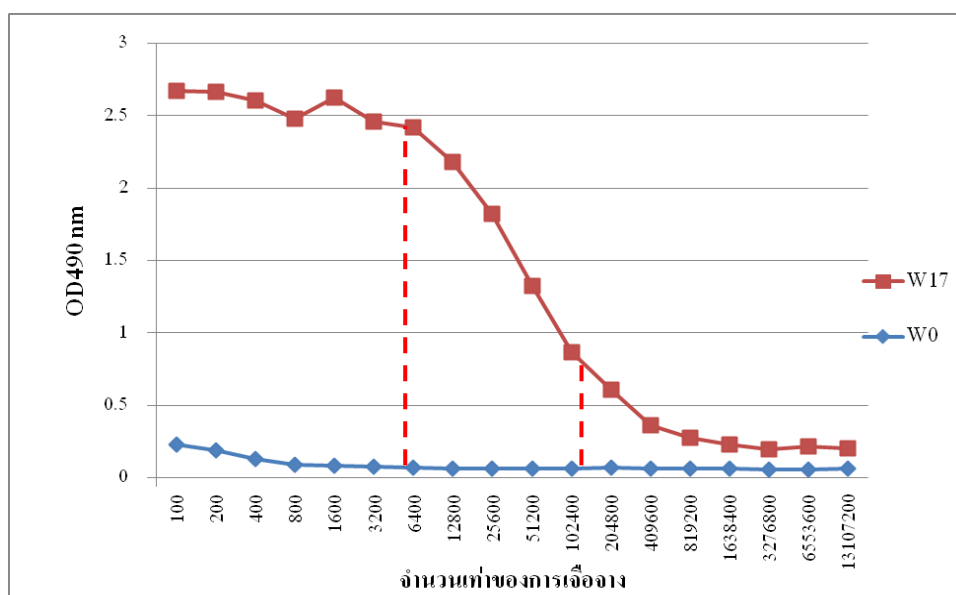
หลังจากฉีดกระจายเป็นเวลา 17 สัปดาห์แล้วเก็บเลือดมาหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Indirect ELISA (ภาพที่ 24) พบว่า กระจายเริ่มมีการสร้างแอนติบอดีในสัปดาห์ที่ 2 และสร้างเพิ่มขึ้นจนถึง สัปดาห์ที่ 17 ซึ่งจะมีการสร้างแอนติบอดีในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 25) จึงเลือกสัปดาห์ที่ 17 มาตรวจหาค่าไตเตอร์ที่เหมาะสมในการทำ Western Blot เพราะเป็นสัปดาห์ที่มีปริมาณของ แอนติบอดีมากที่สุด จากกราฟ (ภาพที่ 26) พบว่า ที่ระดับการเจือจาง 1:6400 – 1:102400 เท่าเป็น ช่วงไตเตอร์ที่เหมาะสมที่สุด จึงเลือกที่ระดับการเจือจาง 1:10000 เท่าไปทำ Western Blot ต่อไป



ภาพที่ 24 การตรวจหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี Indirect ELISA หลังการฉีดกระตุ้น (W2-W17) เป็นระยะเวลา 17 สัปดาห์



ภาพที่ 25 การตรวจหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี Indirect ELISA ก่อนการฉีดกระตุ้น (W0) และหลังการฉีดกระตุ้น (W2-W17) เป็นระยะเวลา 17 สัปดาห์



ภาพที่ 26 การตรวจหาค่าแอนติบอดีไตเตอร์ในสัปดาห์ที่ 17 แสดงค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอล แอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit

4.5.2 การตรวจสอบแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit โดยวิธี Ouchterlony

เมื่อนำซีรัมที่ผลิตได้จากกระต่ายมาทำปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่ใช้ให้กับฉีดกระตุ้นกระต่าย หลุมตรงกลางจะหยอดรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit และหลุมที่อยู่รอบๆจะหยอดซีรัมจากกระต่าย พบว่าซีรัมสามารถทำปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit เกิดเป็นแถบสีขาวขุ่นระหว่างหลุมตรงกลางและหลุมที่อยู่รอบๆ (ภาพที่ 27 ก) แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของกระต่ายที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit จึงไม่พบแนวตะกอนระหว่างหลุมตรงกลางและหลุมที่อยู่รอบๆ (ภาพที่ 27 ข)



ก

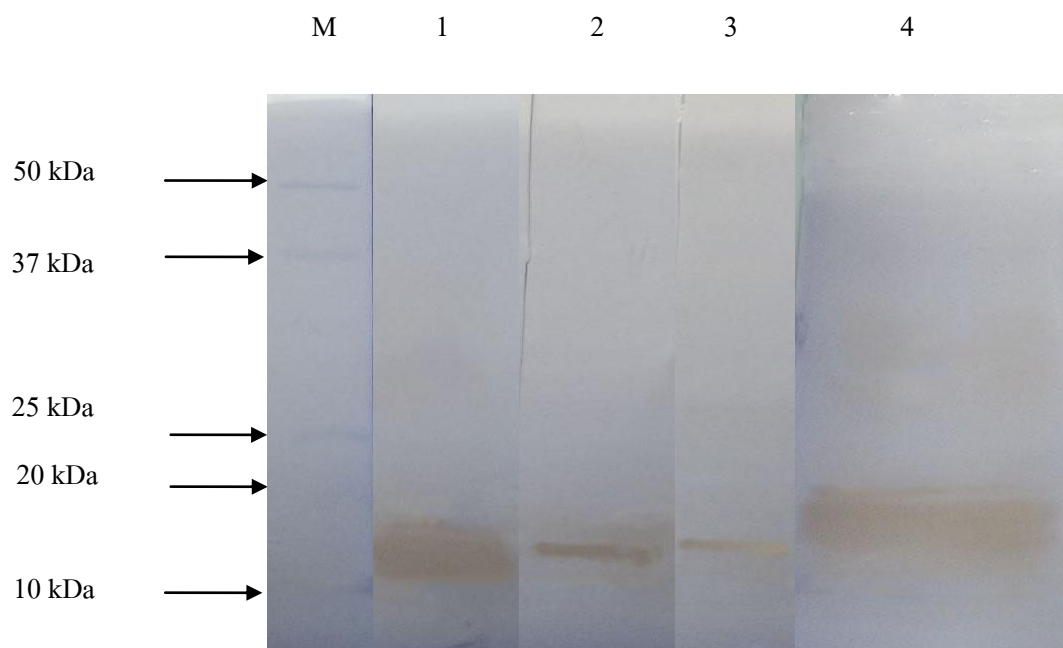


ข

ภาพที่ 27 การศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit โดยวิธี Ouchterlony หลุมตรงกลาง คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit หลุมรอบๆคือซีรัมที่ผลิตได้จากกระต่าย (ก) ซีรัมของกระต่ายที่ได้รับฉีดกระตุ้น (ข) ซีรัมของกระต่ายที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้น

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

จากการตรวจสอบความจำเพาะของซีรัมกระต่ายต่อโปรตีน V-ATPase G Subunit ในยางพารา โดยใช้เทคนิค Western Blot พบว่า ซีรัมกระต่ายที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับโปรตีน V-ATPase G Subunit ในยางพารา เกิดแถบสีน้ำตาลดำ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16 kDa แถวที่ 1 เซลล์ Cell Lysis *E.coli* BL21 StarTM(DE3) One Short[®] ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ V-ATPase G Subunit แถวที่ 2 โปรตีนจากน้ำยางพารา แถวที่ 3 โปรตีนจากใบยางพารา แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่ทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 28 ความจำเพาะของโพลีโคลนอล Antibody Anti -V-ATPase G Subunit ต่อโปรตีน

V-ATPase G Subunit ในยางพาราโดยใช้เทคนิค Western Blot (1) Cell Lysis *E.coli* BL21

Star™(DE3) One Short® ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit*

(2) โปรตีนจากน้ำยางพารา (3) โปรตีนจากใบยางพารา (4) รีคอมบิแนนท์โปรตีน

V-ATPase G Subunit ที่ทำให้บริสุทธิ์ (M) Precision Standard