

ภาคผนวก

1 Buffer solution สำหรับเตรียม crude somatic extract antigen

1.1 0.15 M Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2

NaCl	8.00 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KCl	0.20 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g

ละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายครบ 1,000 ml หลังจากปรับ pH ของสารละลายเป็น 7.2 ด้วย 3 N NaOH เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

1.2 0.2 M Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) stock solution

PMSF (Sigma)	1.74 g
Ethanol	50 ml

เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C

1.3 0.1 M N-tosylamide-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) stock solution

TPCK (Sigma)	0.352 g
Ethanol	10 ml

เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C

1.4 10 mM trans-epoxysuccinal-L-leucylamido-(4-quinidino)-butane (E-64) stock solution

E-64	5.0 g
------	-------

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายครบ 13.9 ml

เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C

1.5 Working solution (0.15 M PBS, pH 7.2, 0.1 mM PMSF, 20 µM E-64)

0.15 M PBS, pH 7.2	20 ml
0.2 M PMSF stock solution	10 µl
0.1 M TPCK stock solution	20 µl
10 mM E-64 stock solution	40 µl

เตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้

2 สารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

2.1 Solution A

8% Na_2CO_3	1	ส่วน
0.4 N NaOH	1	ส่วน

2.2 Solution B

0.04% CuSO_4	1	ส่วน
0.08% K-Na tartrate	1	ส่วน

2.3 Working solution

Solution A	1	ส่วน
Solution B	1	ส่วน

เตรียม Solution A และ B ใหม่ทุกครั้ง ก่อนการใช้

2.4 Color reagent (1 N Folin & Ciocalteu's phenol)

2 N Folin & Ciocalteu's phenol (Sigma)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

เตรียม สารละลาย ใหม่ทุกครั้ง ก่อนการใช้

3 การหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

การหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนและแอนติบอดี ทำตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งได้มีการปรับปรุงและดัดแปลงบางประการ ขั้นตอนการทำมีดังนี้ คือ

1. เจือจางสารหรือสารละลายที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนด้วยน้ำกลั่นให้เหมาะสม
2. เติม working solution 3 ml ลงในหลอดแก้วที่มีสารละลายในข้อ 1 อยู่ 0.5 ml ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที
3. เติม color reagent 0.25 ml ลงในสารละลายผสมในข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที
4. วัดความเข้มข้นของสารละลายสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 3000 Array) ที่ความยาวคลื่น 625 nm
5. คำนวณหาปริมาณโปรตีน โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่อ่านได้กับ standard curve ซึ่งทำการ plot ระหว่างค่า OD ของแต่ละความเข้มข้นของสารละลาย bovine serum

albumin (BSA) ในน้ำกลั่น

4. การประเมินปริมาณโปรตีนโดยคำนวณจากค่า O.D. 260/280 nm

ในกรณีที่ต้องการทราบปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างคร่าวๆ หรือกรณีที่มิมีสารละลายตัวอย่างน้อยมาก ไม่เพียงพอที่จะตรวจวัดปริมาณ โดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) สามารถที่จะทำการประเมินปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 3000 Array) ใช้สารละลายชนิดเดียวกันแต่ไม่มีสารตัวอย่างเป็น reagent blank ทำการคำนวณปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง จากสูตรต่อไปนี้ (Layne, 1957 และ Peterson, 1983)

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)} = (\text{O.D. 280nm} \times 1.55) - (\text{O.D. 260nm} \times 0.76)$$

5. สารละลายที่ใช้ในการแยกชนิดโปรตีน โดยวิธี Isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis (IEF-PAGE)

5.1 29.1% acrylamide / 0.9% Bis solution

Acrylamide 29.1 g

N,N'-methylene bisacrylamide 0.9 g

ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน 75 ml คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer จนสารละลายใส แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนจนครบ 100 ml ถ้าสารละลายขุ่นให้กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 2 สัปดาห์

5.2 10% Ammonium persulfate solution

ละลาย Ammonium persulfate 0.1 g ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 ml ผสมให้เข้ากัน ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้

5.3 10% TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine)

เติมสารละลาย TEMED 1.0 ml ลงในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 9.0 ml ผสมให้เข้ากัน

5.4 Electrode solution

Anode solution (10 mM H_3PO_4)

เจือจาง 85% H_3PO_4 (MW 98, 1L = 1.71 Kg) 0.1146 ml ในน้ำกลั่นปราศจากอิออน 200 ml ผสมให้เข้ากัน

Cathode solution (20 mM NaOH)

ชั่ง NaOH 0.16 g ละลายในน้ำกลั่นปราศจากอิออน 200 ml ผสมให้เข้ากัน

5.5 การเตรียม IEF gel

Acrylamide / Bis solution	1.88 ml
ampholyte pH 3-10 (Bio-Rad)	0.6 ml
deionized distilled water	4.95 ml

ทำการไล่อากาศหรือ ออกซิเจน (degas) ออกจากสารละลาย ภายใต้สุญญากาศนานประมาณ 5 นาที แล้วเติม

10% ammonium persulfate	37.5 μl
10% TEMED	37.5 μl

ผสมเบาๆ โดยแกว่งไปมา แล้วเทลงบนกระจกที่ กั้นขอบด้วย เทปพลาสติก (demo tape) หนา 0.6 mm ทั้งสองข้างห่างกัน 6.5 cm ยาว 14 cm แล้ววางแผ่น gel bond film ขนาด 6.5 x 14 cm ที่ติดกับกระจกขนาดเท่าแผ่นฟิล์ม ให้ด้าน hydrophilic เข้าหาส่วนผสมของ gel ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงแกะแผ่นฟิล์มออกจากกระจก gel ที่แข็งตัวจะจับอยู่บนแผ่นฟิล์ม เก็บแผ่นฟิล์มไว้ใน moisture chamber ที่อุณหภูมิ 4 °C ค้างคืน เพื่อให้เกิด complete polymerization

5.6 การเตรียมสีย้อม IEF gel

5.6.1 Fixing solution

Methanol	350 ml
Trichloroacetic acid	130 g
Sulphosalicylic acid	35 g

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml คนให้ทั่วด้วย magnetic stirrer จนละลายอย่างสมบูรณ์

5.6.2 Staining solution

Coomassie brilliant blue R 250	1.5 g
Ethanol, absolute	105 ml
Acetic acid	30 ml

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 300 ml คนให้ละลาย แล้วกรองใส่ขวดสีชา

5.6.3 Destaining solution

Ethanol, absolute	350 ml
Acetic acid	100 ml

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml แล้วคนให้เข้ากัน

5.6.4 Preserving solution

Glycerol	5 ml
Ethanol, absolute	175 ml
Acetic acid	50 ml

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml แล้วคนให้เข้ากัน

5.6.5 วิธีการย้อมสี IEF gel

1. หลังจากเสร็จขั้นตอน focusing ให้รีบวางแผ่น IEF gel แซะใน fixing solution นาน 5 นาที
2. ย้ายแผ่น gel มาแซะใน destaining solution นาน 5 นาที
3. ครบเวลา ย้าย แผ่น gel มาแซะใน staining solution นาน 5 นาที
4. จากนั้นนำแผ่น gel มาล้างสีด้วย destaining solution 2 ครั้งๆละ 10 นาที หรือจนกว่า background ใส
5. ย้ายแผ่น gel มาแซะใน preserving solution นาน 5 นาที
6. ตากแผ่น gel ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเก็บไว้วิเคราะห์ต่อไป

6. สารละลายที่ใช้ในการแยกชนิดโปรตีนโดยวิธี Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

6.1 30% acrylamide solution

acrylamide (Sigma)	30 g
N,N'-methylene-bis-acrylamide (Bis) (Sigma)	0.8 g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย	100 ml

กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง (Whatman no.4) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

6.2 20% Sodium dodecyl sulphate solution

Sodium dodecyl sulphate (SDS) (Sigma)	100 g
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายครบ	500 ml

เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6.3 4x Stacking gel buffer (0.5M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS)

Trizma-base (tris[Hydroxymethyl] aminomethane) (Sigma)	30.27 g
20% SDS solution	10 ml
น้ำกลั่น	300 ml

ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 6.8 ด้วย conc. HCl แล้วเติม TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Sigma) 1 ml เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายครบ 500 ml

6.4 4x Separating gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS)

Trizma-base (Sigma)	90.82 g
20% SDS solution	10 ml
น้ำกลั่น	300 ml

ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 8.8 ด้วย conc. HCl แล้วเติม TEMED (Sigma) 0.5 ml เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายครบ 500 ml

6.5 1% Ammonium persulphate solution

Ammonium persulphate (Sigma)	50 mg
น้ำกลั่น	5 ml

เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 °C ได้นาน 1 สัปดาห์

6.6 0.5M Tris-HCl pH 6.8

Trizma-base (Sigma)	6.05 g
---------------------	--------

เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 ml ภายหลังปรับ pH ของสารละลายเป็น 6.8 ด้วย conc. HCl

6.7 2x sample solubilizing solution (20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS 0.125M Tris HCl, pH 6.8)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	12.5 ml
-----------------------	---------

20% SDS solution	10 ml
glycerol	10 ml
2-mercaptoethanol (Sigma)	5 ml
น้ำกลั่น	12.5 ml

เติม Bromphenol blue (3',3'',5',5''-tetrabromophenolsulfonphthalien) (Sigma) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.001%

6.8 10x electrode buffer (0.25 M Tris, 1.92 M glycine)

Trizma-base (Sigma)	30 g
glycine (aminoacetic acid) (Sigma)	144 g
น้ำกลั่น	800 ml

ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 8.3 ด้วย conc. HCl แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายครบ 1,000 ml เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 °C

6.9 Electrode buffer (Running buffer) (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS)

10x electrode buffer	200 ml
น้ำกลั่น	1,600 ml
20% SDS solution	10 ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 2,000 ml เก็บสารละลายที่ 4 °C

6.10 3% stacking acrylamide solution

30% acrylamide solution	3.0 ml
4x stacking gel buffer	7.5 ml
น้ำกลั่น	18.75 ml
1% ammonium persulphate solution	0.75 ml

เตรียมสารละลายทันทีที่ใช้งาน

6.11 10% separating acrylamide solution

30% acrylamide solution	6.7 ml
4x separating gel buffer	5.0 ml
น้ำกลั่น	7.8 ml
1% ammonium persulphate solution	0.5 ml

เตรียมสารละลายทันทีที่ใช้งาน

6.12 18% separating acrylamide solution

30% acrylamide solution	12.0 ml
4x separating gel buffer	5.0 ml
น้ำกลั่น	2.5 ml
1% ammonium persulphate solution	0.5 ml

เตรียมสารละลายทันทีที่ใช้งาน

6.13 0.2% Coomassie brilliant blue R-250 solution

Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)	2.0 g
Methanol, absolute	500 ml
Acetic acid, glacial	100 ml

เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายครบ 1,000 ml กวนสารละลายตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ข้ามคั้นจนสีละลายดีแล้ว กรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman no.1) แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

6.14 Destaining solution (5% methanol, 7% acetic acid)

Acetic acid, glacial	140 ml
Methanol, absolute	100 ml

เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายครบ 2,000 ml เก็บสารละลายในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

6.15 Reagent สำหรับ Silver stain

1. 12 mM silver nitrate

Silver nitrate (MW 169.9)	0.407 g
เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ครบ	200 ml

2. 0.28 M sodium carbonate และ 0.5 ml/L formaldehyde

Na_2CO_3 (MW 105.99)	14.84 g
Formaldehyde	0.25 ml
เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ครบ	500 ml

3. 3.4 mM Potassium dichromate และ 3.2 mM Nitric acid

Potassium dichromate (MW 294.18)	0.2 g
Nitric acid (M= 15.99)	40 μ l
เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ครบ	200 ml

7. สารละลายที่ใช้ใน Western blot analysis

7.1 Towbin transfer buffer (stock solution)

Trizma-base (Sigma)	15.15 g
Glycine (Sigma)	72.0 g

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 ml เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 °C

7.2 Towbin transfer buffer (working solution)

Towbin transfer buffer (stocking solution)	100 ml
น้ำกลั่น	700 ml
Methanol, absolute	200 ml

7.3 Washing buffer (Tris pH 7.5 Tween)

Trizma-base (Sigma)	12.11 g
NaCl	17.53 g

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 1,800 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย conc. HCl แล้วเติม

Tween 20 1.0 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 2,000 ml ด้วยน้ำกลั่น

7.4 Blocking solution (Tris pH 7.5 Tween, 1% blocking reagent)

Tris pH 7.5 Tween	300 ml
Blocking reagent (Boehringer Mannheim)	3 g

กวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer และให้ความร้อนประมาณ 50 °C จะทำให้ละลายได้ดีขึ้น ควรเตรียมใช้ภายใน 1 วัน

7.5 0.15 M Tris pH 9.6 buffer

Trizma-base (Sigma)	18.17 g
---------------------	---------

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 900 ml ปรับ pH ให้ได้ 9.6 ด้วย conc. HCl แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น

7.6 5% acetic acid

Acetic acid , glacial	5 ml
น้ำกลั่น	100 ml

7.7 BCIP & NBT Substrate solution

5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate (BCIP) (Sigma)	
5 mg / ml ในน้ำกลั่น	500 μ l
Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma)	5 mg
1 M $MgCl_2$	200 μ l
น้ำกลั่น	50 ml

ผสมให้เข้ากัน และเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน