

ภาคผนวก

การย้อมเจลด้วยสีย้อม CBB (Coomassie Brilliant Blue)

1. หลังจากทำอิเล็กโตรโฟเรซิสแล้ว นำเจลไปล้างในน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง
2. นำเจลวางลงบนถาดที่มีสีย้อม CBB แล้วนำถาดเจลไปวางบนแท่นของเครื่องเขย่า เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที
3. รินสีย้อม CBB ออกแล้วเติม destain solution ลงไปในถาดเจล เขย่าเบาๆ ประมาณ 1 ชั่วโมง ในระหว่างนี้เปลี่ยน destain solution หลายๆ ครั้ง จนเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏขึ้นอย่างชัดเจน
4. นำแผ่นเจลที่ย้อมสีเสร็จแล้วไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม NIH image

การย้อมเจลด้วย Silver Stain Plus

การย้อมเจลโดยใช้ Silver Stain Plus นี้ใช้ในกรณีที่ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสนั้นมีปริมาณน้อยมาก กล่าวคือสามารถย้อมโปรตีนที่มีความเข้มข้นในหน่วยนาโนกรัมได้

1. ขั้นตอนการเตรียมสีย้อม

การเตรียม Developmental accelerator solution

 - 1.1 เติมน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มี stirrer bar อยู่
 - 1.2 เติมสาร Development accelerator solution 50 กรัม ลงไป รอจนกว่าจะละลายหมด
 - 1.3 เติมน้ำกลั่นเพิ่มลงไปให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอนการย้อม
 - 2.1 Fixing step

หลังจากทำอิเล็กโตรโฟเรซิสแล้วนำเจลที่ได้มาใส่ในถาดที่มี Fixative enhancer solution อยู่ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 20 นาที
 - 2.2 Rinsing step

เท Fixative enhancer solution ทิ้ง แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร โดยจะล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
 - 2.3 Staining and Developing step

เตรียม staining solution โดยเติมสารละลายต่อไปนี้ตามลำดับ คือ

น้ำกลั่น 35 มิลลิลิตร

Silver complex solution 5 มิลลิลิตร

Reduction moderator solution 5 มิลลิลิตร

Image development reagent 5 มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทน้ำกลั่นในข้อ 2.2 ที่เติม staining solution และ Developmental accelerator solution ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเทลงไปในถาดเจลพร้อมๆกัน เขย่าเบาๆ จนกระทั่งมีสีของแถบโปรตีนเป็นสีน้ำตาลปรากฏขึ้น ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที

2.4 Stopping step

เทสารละลายในข้อ 2.3 ที่เติม 5% acetic acid ลงไปในถาดเจลทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่นอีกประมาณ 5 นาที

3. นำเจลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NIH image

การตรวจระดับโปรตีนด้วย Bio-Rad Protein Assay Kit

Standard Procedure (กรณีโปรตีนมีปริมาณมาก)

1. เตรียมโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
2. เตรียม dye reagent ในอัตราส่วน dye reagent : น้ำกลั่น เท่ากับ 1 : 4 ส่วน แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
3. เตรียมโปรตีนที่ต้องการวัดโดยเจือจางอีโมลิฟต์ที่เตรียมไว้ด้วยน้ำกลั่นและ dye reagent
4. ปิเปตโปรตีนมาตรฐานและอีโมลิฟต์ตัวอย่าง อย่างละ 20 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง ในการวัดค่าจะทำการวัด 3 ซ้ำ
5. เติม diluted dye reagent 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดแล้ว vortex
6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อยที่สุด 5 นาที แต่ไม่ควรทิ้งไว้เกิน 1 ชั่วโมง
7. นำโปรตีนมาตรฐานและอีโมลิฟต์ตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของอีโมลิฟต์ตัวอย่างมาเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานเพื่อหาระดับโปรตีน

Microassay Procedure (กรณีทีโปรตีนมีปริมาณน้อย)

1. เตรียมโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 1.2 ถึง 10.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
2. เตรียมฮีโมลิพตัวอย่างโดยใช้เจือจางฮีโมลิพที่เตรียมไว้ด้วยน้ำกลั่นและ dye reagent
2. ปิเปิดโปรตีนมาตรฐานและฮีโมลิพตัวอย่าง อย่างละ 800 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง ใน การวัดค่าจะทำการวัด 3 ซ้ำ
3. เติม dye reagent 200 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอดทดลองแล้ว vortex
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อยที่สุด 5 นาที แต่ไม่ควรทิ้งไว้เกิน 1 ชั่วโมง
5. นำโปรตีนมาตรฐานและฮีโมลิพตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จากนั้นนำค่า การดูดกลืนแสงของฮีโมลิพตัวอย่างมาเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานเพื่อหาระดับ โปรตีน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวจตุพร ตั้งจิตวิทยากุล
วัน เดือน ปีเกิด	8 มีนาคม 2520
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียน คำรณราษฎร์สงเคราะห์ จังหวัดเชียงราย ปีการศึกษา 2538 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2542
ทุนการศึกษา	ได้รับทุน Association of International Education, Japan (AIEJ) ภายใต้สัญญาความร่วมมือทางวิชาการระหว่างมหาวิทยาลัยเชียงใหม่และมหาวิทยาลัยคานาซาวา เพื่อไปศึกษาและทำวิจัยที่มหาวิทยาลัยคานาซาวา ประเทศญี่ปุ่น เป็นเวลา 1 ปี
ผลงานวิจัย	Tungjitwitayakul, J., Nettagul, A., Singtripop, T., Oda, Y., Sakurai, S. “Purification, Characterization and Developmental Profiles of the Storage Proteins, SP1 and SP2 in the Bamboo Borer, <i>Omphisca fuscidentalis</i> ”. Poster H007, 26 th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, 2000. Tungjitwitayakul, J., Nettagul, A., Singtripop, T., Oda, Y., Sakurai, S. “Purification, Characterization and Developmental Profiles of the Storage Proteins, SP1 and SP2 in the Bamboo Borer, <i>Omphisca fuscidentalis</i> ”. Poster. Zoological Science Meeting of Japan, Tokyo, 2000.