ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ (Grad-research)

การโคลนและการแสดงออกของยีน NS1 ของเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 ใน *ESCHERICHIA COLI*

CLONING AND EXPRESSION OF NS1 GENE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H5N1 IN *E.COLI*

ปริณทรา เพ็ญสุวรรณ[*], ดลฤดี สงวนเสริมศรี[**], จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด[***], พรชัย ชำนาญพูด[****]
พรรณนิภา อุดวิรุฬห์[**], ดวงกมล ขันธเลิศ[**], พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี[*].
[*]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000
[**]ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000
[***]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง พิษณุโลก 65000
[****]สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง แขวงลาดยาว เขตจตุจักรกรุงเทพฯ 10900

Purinthra Pensuwan[*], Donruedee Sanguansermsri[**], Chanpen Chamnanpood[*],
Pornchai Chamnanpood[***], Pannika Ritviroal [**], Duangkamol Kunthalert[**],
Phanchana Sanguansermsri[*].
[*]Department of Biochemistry, Facity of Medical Science, Naresuan University,
Phitsanulok 65000 Thailand
[**]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University,
Phitsanulok 65000 Thailand
[***]Northern Veterinary Research and Development Centre,Phitsanulok 65130 Thailand
[****]National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and
Cooperative,Bangkok 10900 Thailand

Abstract

The purpose of this study is to construct of the non-structural protein of avian influenza H5N1 isolated from Thailand by genetic engineering. The 700 bp of PCR product of the NS1 gene was cloned into the *E.coli* strain BL21(DE3). The transformed bacteria are capable of express and accumulate the protein in the pellet portion. The optimum period for expression of NS1 gene with IPTG was 4 hours. The NS1 protein will be used in ELISA test for detection NS1 antibody in order to differential infected and vaccinated animal.

บทนำ

การระบาดของเชื้อไข้หวัดนก ในสัตว์ปีกเกิดขึ้นเมื่อกลางเดือนธันวาคม ปี 2003 โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ซึ่งมีรายงานการเกิดโรคที่แอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศเกาหลี เวียดนาม ญี่ปุ่น ไทย ปากีสถาน กัมพูชา ลาว อินโดนีเซีย และจีน [1] การระบาดครั้งนี้ทำให้ต้องกำจัดสัตว์ปีกไปมากกว่า 150 ล้านตัว สูญเสียรายได้ไปมากกว่า 250 ล้านดอลลาร์ และยังคงมีการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 จนถึงปัจจุบัน [2] สำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สามารถแยกความร้ายแรงในการก่อโรคโดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดก่อโรคโดยรุนแรง (Highly pathogenic AI, HPAI) และชนิดก่อโรคไม่รุนแรง (Low pathogenic AI, LPAI) ซึ่งในชนิดแรกมีรายงานการระบาดอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน ในขณะที่ชนิดหลังมีรายงานการพบเชื้ออยู่เป็นระยะ [3] การระบาดอย่างต่อเนื่องของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกทำให้มีการพิจารณาเรื่องการใช้วัคซีนในการควบคุมไวรัสไข้หวัดนก แต่การใช้วัคซีนอาจมีผลกระทบต่อการค้าซึ่งทางการค้ามีนโยบาย ไม่ให้ใช้วัคซีนในสัตว์ปีกที่ส่งออกไป

ยังต่างประเทศ [4] เนื่องจากวัคซีนที่จะนำมาใช้ยังไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างสัตว์ที่ได้รับเชื้อโดยธรรมชาติกับสัตว์ที่ได้รับวัคซีนได้ [5] จึงมีการพัฒนาวัคซีนที่สามารถแยกความแตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยธรรมชาติกับการได้รับวัคซีน (Differential Infected from Vaccinated Animal, DIVA) ซึ่งในปัจจุบันการใช้วัคซีนที่เป็น DIVA มีอยู่ 2 ชนิด คือ heterologous neuraminidase และ nonstructural protein 1 (NS1) [6, 7]

อนุภาคของไวรัสไข้หวัดนกมียีน 8 segment ที่มีความแตกต่างกัน คือ PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M (M1,M2), NS (NS1, NEP) [8] RNA ของ NS มีขนาด 890 นิวคลีโอไทด์ และโปรตีน NS1 มีความยาวของกรดอะมิโน 230 อะมิโนแอซิด มีน้ำหนัก 26.8 kDa ยีน NS1 พบครั้งแรกในปี 1971 เป็นยีนที่พบได้ในสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อไข้หวัดนก แต่ไม่พบใน virions [7,8] โปรตีน NS1 มีหน้าที่ยับยั้งกระบวนการ post-transcription ของยีนสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่ต่อต้านไวรัส [9] โปรตีน NS1 สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน โดยแต่ละส่วนมีหน้าที่ย่อยต่างกันดังนี้

ส่วนของ N-terminus amino acid ตำแหน่งที่ 1-74 ส่วนนี้เรียกว่า RNA – binding domain มีตำแหน่งที่สำคัญ 2 ตำแหน่งคือ arginin ตำแหน่งที่ 38 และ lysine ตำแหน่งที่ 41 ทั้ง 2 ตำแหน่งสามารถจับกับ dsRNA ของสิ่งมีชีวิตได้ ทำให้ยับยั้งการทำงานของ Protein Kinase R (PKR) ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งโดยทั่วไป PKR ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัส ในขบวนการ viral replication

ส่วน C-terminal เริ่มจาก amino acid ตำแหน่งที่ 74 - 237 ส่วนนี้เรียกว่า effector domain มีตำแหน่งที่สำคัญๆ หลายตำแหน่งซึ่งแบ่งได้ดังนี้

1. amino acid ตำแหน่งที่ 186 เป็นตำแหน่งที่จับกับ cleavage และ polyadenylation specificity factor (CPSF) ของสิ่งมีชีวิตที่ติดเชื้อ

2. amino acid ตำแหน่งที่ 223-237 เป็นตำแหน่งที่จับกับ poly(A)- binding protein II (PABII) ของสิ่งมีชีวิตที่ติดเชื้อ

3. amino acid ตำแหน่งที่ 137-146 เป็นตำแหน่งของ nuclear export signal (NES) เมื่อส่วนของ NS1-binding site กับ CPSF มีผลให้ NES ทำงาน ซึ่งหน้าที่ของ NES อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้โปรตีน NS1 ออกจากนิวเคลียสเป็นลำดับแรกเมื่อมีการติดเชื้อ ซึ่งการรวมของโปรตีน NS ในไซโตปลาสซึม จำเป็นสำหรับการยับยั้งการทำงานของ PKR [9]

โปรตีน NS1 เป็นโปรตีนชนิดแรกที่ถูกสังเคราะห์ออกมาเมื่อมีการติดเชื้อ [10] โปรตีน NS1 จึงสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดที่แยกความแตกต่างระหว่างสัตว์ที่ติดเชื้อจากธรรมชาติกับสัตว์ที่ได้รับวัคซีนป้องกัน avian influenza virus (A) ได้ [7] ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน NS1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 *E.coli* ด้วยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

ไวรัสที่ใช้ศึกษาเป็นไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 ที่มีการระบาดในประเทศไทย เตรียมโดยนำเชื้อไวรัสฉีดเข้าไข่ไก่ฟักที่มีอายุ 9-10 วัน จากนั้นสกัดเอา RNA ออกจากน้ำไข่ไก่ฟักหรือที่เรียกว่า allantoic fluid โดยใช้ RNeasy Mini Kit (Qiagen) จากนั้นเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ Omniscript reverse transcription Kit (Qiagen) โดย primer ที่ใช้เป็น Uni 12 (5' AGCAAAAGCAGG 3') [11] จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Platinum *Taq* DNA Polymerase kit (Invitrogen) ซึ่งใช้ primer ของยีน NS1 ได้แก่ WG-NS1-1 (5' ATGGATTCCAACA CTGTGTCAAGC3') และ WG-NS1-1-R678 (5' TCAAACTTCT GACTCAATTGTTCTCG 3') นำPCR Product ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยาการวิเคราะห์หาลำดับของดีเอ็นเอ โดยใช้ Big-dye

terminator sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystem, California, USA) ใช้ primer WG-NS1-1 และ primer WG-NS1-1-R678 และนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI PRISM Genetic analyzer 310 (Applied Biosystems), BIOEDIT (version 7.0.4.1) (http://www.mbio.ncsu.edu.BioEdit.bioedit.html) ซึ่งโปรแกรมนี้ใช้เปรียบเทียบข้อมูลและจัดลำดับเบสของไวรัสไข้หวัดนกที่ศึกษา หลังจากได้ลำดับเบสของไวรัส นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (http://www. ncbi. nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)

Vector ที่ใช้เป็น TOPO vector (pCR T7 TOPO TA Cloning reagents) (Invitrogen) ซึ่งมี Histidine tag 6 ตัว อยู่ด้าน N-terminal และ *E.coli* ที่ใช้ ได้แก่ *E.coli* competent cell มี 2 strain คือ strain TOP10F'และ strain BL21(DE3) (Invitrogen)

นำ PCR Product ที่ได้ใส่ใน TOPO vector โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงย้ายเข้าสู่ *E.coli* strain TOP10F' จากนั้นเลี้ยงในอาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin ผสมอยู่ 100 µg/ml บ่มที่ 37°C ข้ามคืน และเขย่าที่ 200 rpm เลือกโคโลนีที่คาดว่ามียีน NS1 มาเลี้ยงลงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin ผสมอยู่ 100 µg/ml บ่มที่ 37°C ข้ามคืน และเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm จากนั้นจึงสกัดพลาสมิด DNA โดยใช้ QIAprep Miniprep Kit (Qiagen) จากนั้นจึงย้ายเข้าสู่ *E.coli* strain BL21(DE3)

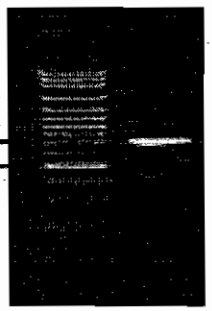
จากนั้นคัดเลือก recombinant clone ในอาหารแข็ง LB ที่ใส่ ampicillin ปริมาณ 100 µg/ml โดยใช้ Restriction enzyme คือ Hind III and BamHI (New England BIOLAB) ตัดดูส่วนของยีน NS1, และตรวจยืนยันโดยดูลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencer โดยใช้ primer WG-NS1-1 และ primer WG-NS1-1-R678 ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (ABI PRISM DNA sequencer version 310: Applied Biosystems)

เมื่อพลาสมิด DNA ถูกใส่เข้าไปใน *E.coli* strain BL21[DE3] ได้มีการชักนำให้ยีนมีการแสดงออกโดยใช้ IPTG ที่มีความเข้มข้น 0.5 M โดยเก็บเซลล์ก่อนเติม IPTG และหลังเติม IPTG ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และนำ lysis supernatant และ lysis pellet ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกโดยวิธี freeze-thaw (freeze ใน liquid nitrogen และ traw ที่อุณหภูมิ 42 °C) มาแยกโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE (Bio-rad Laboratories)

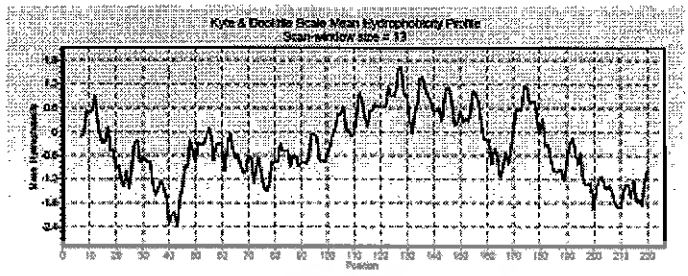
ผลและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณยีนของ NS1

การเพิ่มปริมาณยีน NS1 โดยวิธี reverse transcritption polymerase [RT-PCR] ได้ขนาดนิวคลีโอไทป์ 700 bp ดังรูปที่ 1 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอและจัดลำดับเบสของไวรัสโดยโปรแกรม BIOEDIT [version 7.0.4.1] พบว่ายีน NS1 มีความยาวของกรดอะมิโน 220 ตัว และเมื่อใช้โปรแกรมวิเคราะห์หาค่า mean hydrophobicity พบว่าโปรตีน NS1 มีทั้งส่วนที่ละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ ในรูปที่ 2 ถ้าเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ส่วนที่ไม่ละลายน้ำมีมากถึง 43 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเลือกกรดอะมิโนในส่วนที่ละลายน้ำและเป็นส่วนที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนมาใช้ ในการผลิตโปรตีน NS1 เพื่อจะนำไปใช้ในการศึกษาครั้งต่อไปได้



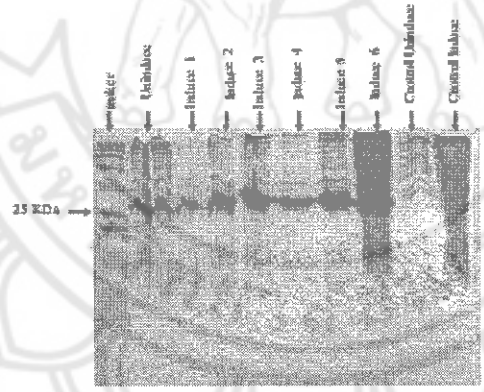
รูป 1 แสดงยีน NS1 ใน 1.5% Agarose gel



รูป 2 แสดงกราฟ Mean Hydrophobicity ของโปรตีน NS1

การโคลนยีน NS1และการแสดงออกของโปรตีน NS1

E.coli ที่ใช้มี 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ TOP10F' cell และ สายพันธุ์ BL21[DE3] ซึ่ง *E.coli* กลุ่มแรกทำหน้าที่เพิ่มจำนวนยีน NS1 ให้มีจำนวนมากขึ้นและสามารถเก็บเป็น stock เชื้อได้ ส่วน *E.coli* อีกกลุ่มมีหน้าที่ทำให้ยีน NS1 มีการแสดงออกโดยกระตุ้นด้วย IPTG ที่มีความเข้มข้น 0.5 mM เมื่อดูจากภาพที่ 3 พบว่า มีแถบโปรตีนที่หนาและมีขนาดที่ใกล้เคียงกับโปรตีน NS1 ประมาณ 26.8 kDa ส่วน tag มีน้ำหนัก 3 - 5 kDa เมื่อรวมกันทำให้มีน้ำหนักประมาณ 29.8 – 31.8 kDa และเมื่อสังเกตุช่วงเวลาพบว่า ชั่วโมงที่ 5 เป็นชั่วโมงที่เหมาะที่สุด ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 และเป็นช่วงเวลาที่เหมาะที่สามารถเก็บเซลล์เพื่อนำเซลล์ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป เนื่องจากแถบโปรตีนเป็นแถบเดียวชัดเจน ไม่มีแถบโปรตีนอื่นขนาบข้าง



รูป 3 แสดง Expression ของโปรตีน NS1

สรุป

การศึกษาครั้งนี้โปรตีน NS1 ขนาด 29 – 31 kDa สามารถแสดงออกได้ใน *E.coli* โดยใช้ TOPO cloning vector ในสภาวะถูกชักนำโดย IPTG เวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ 4 ชั่วโมง หลังเติม NS1 IPTG

คำขอบคุณ

การศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการศึกษาวัคซีนเพื่อควบคุมโรคไข้หวัดนกในประเทศไทยของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตว์แพทย์ ภาคเหนือตอนล่าง จังหวัดพิษณุโลก กรมปศุสัตว์ ร่วมกับมหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์กรมหาชน) (สวก) และขอขอบคุณโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

บรรณานุกรม

[1] Viseshakul, N., et al. (2004). The genome sequence analysis of H5N1 avian influenza A virus isolated from the outbreak among poultry populations in Thailand. **Virology.** 328(2), 169-176.

[2] Harder, T. C. & Werner, O., (2006) Avian Influenza, In B.S. Kamps, C. Hoffmann, and W. Preiser (Eds) **Influenza Report 2006,** Paris: Flying Publisher. 48-86.

[3] ทวีศักดิ์ ส่งเสริม และคณะ.(2004). ไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก (Avain Influenza):พยาธิวิทยาและการวินิจฉัยโรค. Thai Veterinary Medicine.55(1), 1-5.

[4] Lee, C. W., Senne, D. A., & Suarez, D. L. (2004). Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza. **Vaccine.** 22(23-24), 3175-81.

[5] Capua, I. & Marangon, S. (2003) The use of vaccination as an option for the control of avian influenza. In **Technical Item of the 71st General Session of the OIE, May 2003.** Paris.

[6] Suarez, D. L. (2005). Overview of avian influenza DIVA test strategies. **Biologicals Special section (pp. 201-254): Marker vaccines and differential diagnostic tests in disease control and eradication).** 33(4), 221-226.

[7] Tumpey, T. M., et al. (2005). Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. **J Clin Microbiol.** 43(2), 676-83.

[8] Lamb, R. M. & KRUG, R. M., (1996) **Orthomyxoviridae,** In 3 (Ed) **Fields Virology,** Philadelphia.

[9] Marion, R. M., et al. (1997). The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. **Nucleic Acids Res.** 25(21), 4271-7.

[10 Krug, R. M., et al. (2003). Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. **Virology.** 309(2), 181-189.

[11]Hoffmann, E., et al. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Arch Virol.** 146(12), 2275-89.

ภาคผนวก ข สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียม 50X TAE buffer

Tris Base	242.00 g
$NA_2EDTA\text{-}2H_2O$	37.20 g
Glacial acetic acid	57.10 ml

ละลาย Tris Base และ $NA_2EDTA\text{-}2H_2O$ ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 800 ml เมื่อสารทั้งสองละลาย เติม Glacial acetic acid และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตร 1 l เก็บที่ณหภูมิห้อง ก่อนนำไปเจือจางเป็นสารละลาย 1X TAE buffer สำหรับเตรียม agarose gel เพื่อนำไปใช้ใน electrophoresis ต่อไป

2. การเตรียม Loading dye

Sucose	40.00 g
Bromophenol blue	0.50 g

ละลาย Sucose และ Bromophenol blue ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

3. การเตรียม 0.75% agarose gel

ผง agarose gel	1.00 g
ethidium bromide (0.5 µg/ml.)	3.75 µl

ละลาย agarose gel ใน1X TAE buffer ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ต้มจนผง agarose gel ละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน เติม ethidium bromide

4. การเตรียม 1M IPTG

IPTG	2.38 g

ละลายในน้ำกลั่น 10 ml แบ่งเก็บหลอดละ 1 ml ที่ –20 °C

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ hight salt Luria- Bertani medium (hight salt LB medium)

Tryptone	10.00 g
Yeast extract	5.00 g
NaCl	10.00 g

ละลายทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 950 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH เติมน้ำให้ได้ 1,000 ml เข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ hight salt Luria-Bertani plate (hight salt LB plate)

Tryptone	10.00 g
Yeast extract	5.00 g
NaCl	10.00 g

ละลายทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 950 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH เติมน้ำให้ได้ 1,000 ml เติม agar 10 g เข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. การเตรียม ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml

ชั่ง ampicillin 100 mg ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 ml กรองด้วย filter 0.20 µm เก็บที่ -20 °C

8. การเตรียมคาร์เบนิซิลลินเข้มข้น 100 µg/ml

ชั่งคาร์เบนิซิลลิน 100 mg ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 ml กรองด้วยตัวกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 0.20 µm เก็บที่ -20 °C

9. การเตรียมสารละลายกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 40

ชั่งกลูโคส 40 g นำมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 110 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

10. การเตรียม 10% SDS

นำ SDS 10 g ละลายในน้ำกลั่น 90 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

11. การเตรียม 1.5 M Tric-HCl,pH 8.8

Tris base	18.15 g
น้ำกลั่น	100.00 ml

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น 90 ml ปรับ pH สารละลายเป็น 8.8 ด้วย 6 N HCl และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

12. การเตรียม 0.5 M Tric-HCl,pH 6.8

Tris base	6.00 g
น้ำกลั่น	100.00 ml

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น 90 ml ปรับ pH สารละลายเป็น 6.8 ด้วย 6 N HCl และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

13. การเตรียม Sample Buffer

0.5 M Tric-HCl,pH 6.8	1.25 ml
Glycerol	2.50 ml
10% SDS	2.00 ml
0.5% Bromophenol blue	0.20 ml
น้ำกลั่น	3.55 ml

ละลายสารทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปใช้งานตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในปริมาตร 1 ml เติม β-Mercaptoethanol 50 µl ใน Sample Buffer 950 µl จากนั้นนำไปใส่ตัวอย่าง 1 ส่วน Sample Buffer 2 ส่วน (อัตราส่วนที่ต่ำสุด) และนำไปให้ความร้อนด้วย heat block ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 4 นาที

14. การเตรียม 10% APS (fresh daily)

ammonium persulfate	100.00	mg

ละลายในน้ำกลั่น 1 ml แบ่งเก็บหลอดละ 250 µl เก็บที่ –20 °C

15. การเตรียม 10X electrode (runing) buffer, pH 8.3 (1 L.)

Tris base	30.30	g
Glycine	144.00	g
SDS	10.00	g

ละลายสารทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ไม่ต้องปรับ pH เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำไปเจือจางเป็นสารละลาย 1X electrode (runing) buffer, pH 8.3 เพื่อไปใช้ใน electrophoresis ต่อไป

16. การเตรียม gel SDS-PAGE

เตรียม resolving gel 12 เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 3.4 µl 30% Acrylamide/Bis (BioRad) ปริมาตร 4 µl resolving gel 1.5 M Tris-HCl,pH 8.8 ปริมาตร 2.5 µl 10% SDS ปริมาตร 100 µl 10%APS (Sigma)ปริมาตร 50 µl TEMED (Amercham) ปริมาตร 5

µl นำส่วนผสมใส่ลงใน gel cassette sandwich ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เตรียม stacking gel 4 เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 3.05 µl 30% Acrylamide/Bis (BioRad) ปริมาตร 650 µl resolving gel 0.5 M Tris-HCl,pH 6.8 ปริมาตร 1.25 µl 10% SDS ปริมาตร 50 µl 10% APS (Sigma)ปริมาตร 25 µl TEMED (Amercham) ปริมาตร 5 µl นำส่วนผสมใส่ลงใน gel cassette sandwich พร้อมใส่หวี ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ Mini tank (BioRad) และใส่ 1X buffer running, pH 8.3

17. การเตรียมสารละลาย Destaining

Methanol	400.00	ml
Glacial Acetic acid	100.00	ml

นำทั้งส่วนผสมลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml เก็บที่ 4 °C

18. การเตรียมสารละลาย coomasie blue เข้มข้นร้อยละ 0.2 สำหรับ Staining

นำ coomasie blue ชนิดเม็ด จำนวน 1 เม็ด ใส่ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 80 ml ผสมให้เข้ากันประมาณ 10 นาที จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 200 ml ด้วย methanol เก็บที่ 4 °C

19. การเตรียม Transfer buffer

Tris base ความเข้มข้น 25 mM	3.03	g
Glycine ความเข้มข้น 192 mM	14.04	g

นำทั้งสองส่วนละลายใน Methanol ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 ในปริมาตร 200 ml จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

20. การเตรียมสารละลาย PBST

นำ Tween 20 ปริมาตร 500 µl ผสมลงใน PBS ปริมาตร 1,000 ml เก็บไว้ใช้เป็นสารละลายสำหรับ western blot

21. การเตรียมสารละลาย Blocking

ชั่ง skim milk จำนวน 5 g ละลายลงใน PBST ปริมาตร 70 ml และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml