

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็น cDNA ของยีน NS1 ของ A/little grebe/Thailand/Phichit-01/2004(H5N1) ซึ่งได้ลงตีพิมพ์เผยแพร่ใน GENBANK ได้หมายเลข DQ407248 [9] และเป็นตัวอย่างที่พบในประเทศไทยที่มีการระบาดเมื่อ พ.ศ. 2547 ตัวอย่างดังกล่าวได้มีการโคลนยีน NS1 เก็บไว้ใน TOPO plasmid vector และตัวอย่างนี้ได้มีการศึกษาความผันแปรของยีน NS1 ในประเทศไทย ซึ่งตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคเหนือตอนล่าง จ.พิษณุโลก กรมปศุสัตว์

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่อง Thermal cycle (Eppendrof mastercycler gradient)
2. เครื่องวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (ABI PRISM DNA sequencer version 310: Applied Biosystems)
3. ชุดถ่ายภาพ UV transmission (Biorad 2000)
4. Temperature Control ได้แก่ incubator, shaking incubator, water bath และ heat block
5. เครื่อง Universal Microplate Reader รุ่น ELx800 UV
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge : Eppendrof 5417R)
7. เครื่อง Gel dryer (Model 583 Gel Dryer : BioRAD)
8. เครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิสแนวตั้งขนาดเล็ก (BioRAD)
9. เครื่องย้ายโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (BioRAD)

วิธีการวิจัย

วิธีการวิจัยในภาพรวมทุกขั้นตอนของการวิจัยได้นำเสนอแสดงในภาพ 11 เพื่อให้เห็นภาพงานวิจัยทั้งหมดและรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนได้เสนอในลำดับต่อไป



ภาพ 11 แสดงขั้นตอนการวิจัยโดยภาพรวม

1. การสกัด recombinant plasmid NS1 จาก TOPO plasmid vector (Extraction of recombinant plasmid)

โดยเลือก single colony ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา ampicillin มา 4 โคโลนีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani ปริมาตร 2 ml ที่ผสม ampicillin บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัด recombinant plasmid NS1 ที่อยู่ใน TOPO plasmid vector ด้วย QIAprep Miniprep Kit (Qiagen) ซึ่งทำตามขั้นตอนที่ผู้ผลิตแนะนำ โดยนำ recombinant plasmid NS1 ที่เลี้ยงในข้างต้น บั่นเอา supernatant ออกที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm จากนั้นนำ pellet ผสมกับ buffer P1 ปริมาตร 250 µl ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม buffer P2 ปริมาตร 250 µl พลิกหลอดกลับไปมา 4 ครั้ง จากนั้นเติม buffer N3 ปริมาตร 350 µl พลิกหลอดกลับไปมา 4 ครั้ง บั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสใส่ลงใน QIAprep spin column บั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เติม buffer PB ปริมาตร 500 µl และบั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง column เติม buffer PE ปริมาตร 750 µl และบั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง column บั่นต่อที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ QIAprep spin column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม buffer EB ปริมาตร 50 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงบั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสที่ -20 °C เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction : PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน NS1 ด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ Platinum Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen) มีส่วนประกอบดังนี้ 10X PCR buffer ปริมาตร 5 µl (1X), 10 mM dNTPs ปริมาตร 1 µl (0.2 mM), 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 1.5 µl (15 mM), Platinum Taq DNA Polymerase ปริมาตร 0.2 µl (1 ยูนิต), Primer NS1 (ตาราง 2) ปริมาตร 1 µl (0.4 µM), cDNA ปริมาตร 2 µl (0.8 ng) เติม RNase free water ให้ได้ปริมาตร 50 µl นำเข้าเครื่อง thermal cycle (Eppendorf) ในสถานะ Initiation denaturation 94 °C เป็นเวลา 2 นาที, Denaturation 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing 50 °C เป็นเวลา 40 วินาที, Extension 72 °C เป็นเวลา 1.2 นาที จำนวน 35 รอบ และสุดท้าย Final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บ PCR Product ไว้ที่ -20 °C

ตาราง 2 แสดง primer สำหรับเพิ่มปริมาณยีน NS1

Primer	Oligonucleotide sequence (5' → 3')
NS1 - F CACC	CACCATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCT
NS1 - R 678	AACTTCTGACTCAATTGTTCTCGCC

3. การตรวจยืนยันขนาดของ PCR Product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (Electrophoresis)

จากนั้นนำ PCR product มาตรวจขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งเทียบขนาดกับ DNA marker โดยเตรียม agarose ที่ความเข้มข้น 1.5% โดยนำ agarose 1.5 g ผสมกับ 0.5X TAE buffer ปริมาตร 100 ml จากนั้นนำ agarose gel แช่ใน 0.5X TAE buffer ที่มี ethidium bromide เข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 30 นาที จึงนำ PCR Product ผสมกับ 1X loading buffer แล้วทำการ electrophoresis ที่มีความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ UV transmission

4. การทำให้ PCR Product บริสุทธิ์

เมื่อได้ขนาด PCR product ตามที่ต้องการ จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) ซึ่งทำตามวิธีผู้ผลิตแนะนำดังนี้ ผสม PCR product กับ PB buffer ในอัตราส่วน 1:5 ใส่ลงใน QIAquick spin column บั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่ตกลงมาล้างด้วย PE buffer ปริมาตร 750 µl บั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่ตกลงมาบั่นอีกครั้งเพื่อกำจัด PE buffer ที่เหลืออยู่ภายใน column บั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยน QIAquick column เป็น microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม EB buffer ปริมาตร 50 µl ตรงกลาง QIAquick membrane บ่มเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จึงบั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไว้ที่ -80°C เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

5. ปฏิบัติการวิเคราะห์หาลำดับเบสดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

นำ PCR product ที่บริสุทธิ์ ส่วนหนึ่งมาศึกษาหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer (ABI PRISM DNA sequencer version 310: Applied Biosystems) ซึ่งต้องผ่านการทำปฏิบัติการวิเคราะห์หาลำดับเบสดีเอ็นเอ โดยใช้ Big-dye terminator sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems) มีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ 0.8 ng, specific primer (ตาราง 3) ความเข้มข้น 3.2 µM ปริมาตร 1 µl (0.0032 ng), 5X

buffer (Big-dry buffer, Applied Biosystems) ปริมาตร 1 μl (1X), Big-dye terminator v3.1 ปริมาตร 2 μl (2X) เติม ddH₂O ให้ได้ปริมาตร 10 μl จากนั้นนำเข้าเครื่อง thermal cycle (Eppendorf) ที่สภาวะดังนี้ 96 °C เป็นเวลา 10 วินาที, 50 °C เป็นเวลา 5 วินาที, 60 °C เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 25 รอบ กรณีที่ยังไม่ตกตะกอนดีเอ็นเอทันทีให้เก็บดีเอ็นเอ sequencing product ในที่มีด อุณหภูมิ -80 °C ถ้าทำทันทีให้ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอเพื่อกำจัดส่วนของ dye terminator หรือส่วนประกอบอื่นๆ ที่เหลือจากปฏิกิริยาออกจากดีเอ็นเอด้วยวิธี Ethanol precipitation โดยใช้แอลกอฮอล์ 95% และโซเดียมอะซิเตทที่มีความเข้มข้น 3M pH 4.6 (Applied Biosystems) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ Ethanol 95% ปริมาตร 25 μl , โซเดียมอะซิเตท ปริมาตร 2 μl และ ดีเอ็นเอ sequencing product ปริมาตร 10 μl ผสมทั้ง 3 ส่วนใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ในที่มีด จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ซึ่งส่วนใสแล้วล้างด้วย Ethanol 70% ปริมาตร 250 μl ผสมเข้าให้กัน ปั่นด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ซึ่งส่วนใส บ่มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 1 นาที โดยไม่ต้องปิดฝา microcentrifuge tube แล้วเติม HiDi Formamide (Applied Biosystems) ปริมาตร 20 μl เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ บ่มใน heat block ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 2 นาที โดยต้องปิดฝา microcentrifuge tube เพื่อป้องกันการระเหย ย้ายลงน้ำแข็งทันที บ่มต่อเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนใสใส่ลงใน sample tube (Applied Biosystems) แล้วจึงนำเข้าเครื่อง automated DNA sequencer (ABI PRISM DNA sequencer version 310: Applied Biosystems)

ตาราง 3 แสดง specific primer สำหรับเวกเตอร์ และ recombinant plasmid NS1

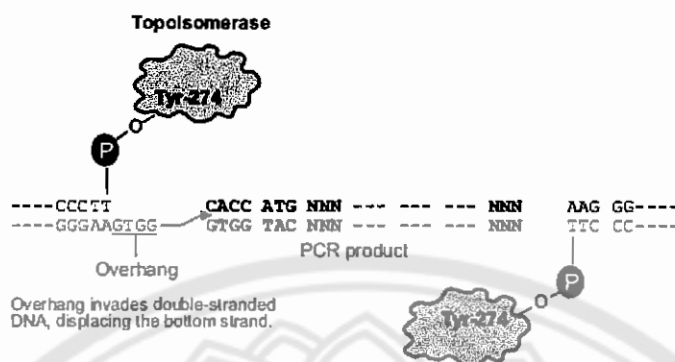
Primer	Oligonucleotide sequence (5' → 3')
NS1 – T7 - F	TAATACGACTCACTATAGGG
NS1 – T7 - R	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG
NS1 – F - CACC	CACCATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCT
NS1 – R - 320	TGATGACTTTATCCATTATTGCCTG
NS1 – F - 503	AATCTCACCATT(AG)CCTTCCCTTCCA
NS1 – R - 678	AACTTCT GACTCAATTGTTCTCGCC

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BIOEDIT (version 7.0.4.1) (<http://www.mbio.ncsu.edu.BioEdit.bioedit.html>) ซึ่งโปรแกรมนี้ใช้เปรียบเทียบข้อมูลและจัดลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 ของเชื้อไวรัส A/little grebe/Thailand/Phichit-01/2004(H5N1) ที่นำมาวิจัยกับลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 ที่จะนำไปโคลนเข้าสู่ *E.coli* TOP10 F' และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) จากนั้นใช้โปรแกรม BIOEDIT (version 7.0.4.1) วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NS1 มาหากราฟ Amino Acid Composition และกราฟ Mean Hydrophobicity ต่อไป

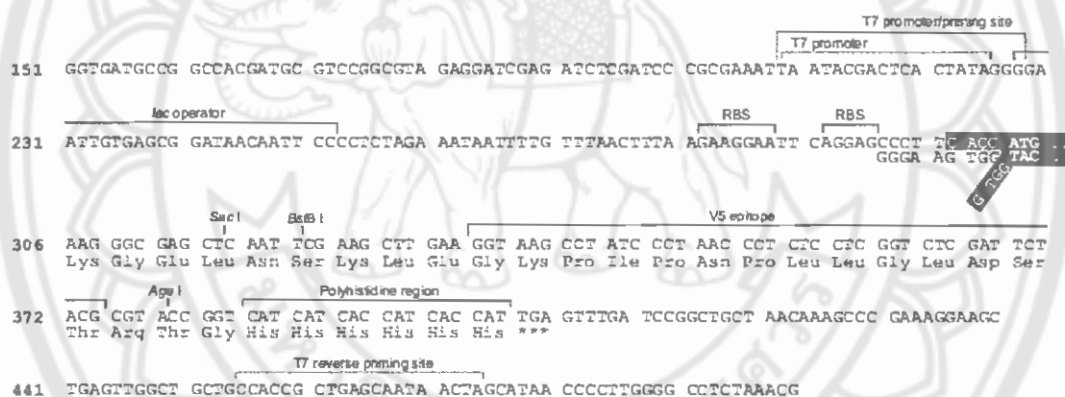
7. การโคลนยีน NS1 เข้าสู่เซลล์ *E.coli* TOP10 F' (Cloning and Transformation in *E.coli* TOP10 F')

หลังจากทำการวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 นำ PCR Product ที่ได้ใส่ใน pET T101/D TOPO[®] vector (Invitrogen) ซึ่งปลายด้าน 5' มี GTGG ที่มีความจำเพาะกับยีน NS1 ที่ออกแบบให้มีลำดับเบส CACC ทำให้ยีนสามารถจับกับเวกเตอร์ได้อย่างเหมาะสม ตามภาพ 12 โดยนำ PCR product 4 µl ผสมกับ Salt Solution 1 µl น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 1 µl และเวกเตอร์ pET101/D-TOPO[®] 1 µl ปั่นไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ recombinant plasmid NS1 มาทำการ transforms เข้าสู่ OneShot[®] TOP10F' competent cell (Invitrogen) ซึ่งมีคุณสมบัติเพิ่มจำนวนยีนให้มีปริมาณมากขึ้น และสามารถเก็บเป็น stock ได้ ด้วยวิธี heat-shock โดยใช้ recombinant plasmid NS1 2 µl ผสมกับ TOP10F' competent cell ปั่นในน้ำแข็ง 20 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 30 วินาที ย้ายลงน้ำแข็งทันที เติมหาอาหาร SOC ปริมาตร 250 µl นำไปปั่นในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมา 50 µl เพื่อ Spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) ชนิดแข็ง ที่มียา ampicillin (sigma) ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml ซึ่งมีชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งที่ไม่มียา ampicillin นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมียีน NS1 มาเลี้ยงลงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin เข้มข้น 100 µg/ml ปั่นที่ 37 °C เข้มข้น เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



ภาพ 12 แสดงส่วนที่เป็น overhang ด้านปลาย 5' และตำแหน่งที่ Topoisomerase I เกาะกับเวกเตอร์ pET101/D-TOPO®

ที่มา: [43]



ภาพ 13 แสดงบริเวณต่างๆของเวกเตอร์ pET101/D TOPO

ที่มา: [43]

8. การตรวจสอบ recombinant plasmid NS1

นำ recombinant plasmid NS1 ที่ได้จากข้อ 7 ส่วนหนึ่งมาตรวจสอบยืนยัน NS1 ด้วยเทคนิค PCR ข้อ 2 ถึง ข้อ 5

9. การโคลน recombinant plasmid NS1 เข้าสู่เซลล์ *E.coli* BL21 Star™ (DE3)

นำพลาสมิดมาทำการ Transformation สู่ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) โดยวิธี Heat shock ดังนี้ recombinant plasmid NS1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ 5 µl ใส่ลงใน BL21 Star™ (DE3)

ผสมให้เข้ากันบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที ย้ายลงน้ำแข็งทันที แล้วเติมอาหาร SOC ปริมาตร 250 μ l ปิดฝาหลอดให้สนิทนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เชย้าที่ 200 rpm เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 ml ที่มี ampicillin เข้มข้น 100 μ g/ml และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เชย้าที่ 200 rpm เพื่อใช้เป็นตัวเชื้อตั้งต้นสำหรับผลิตโปรตีนต่อไป

10. การแสดงออกของยีน NS1 ใน *E.coli* BL21 Star™ (DE3)

การทำให้มีการแสดงออกของยีน NS1 เริ่มจาก เชื้อจากตัวเชื้อตั้งต้นในอัตราส่วน 1:20 ในอาหารเหลว LB ที่มี carbenicillin เข้มข้น 100 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนกระทั่งค่า OD₆₀₀ ได้ 0.5 - 0.8 ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเจริญเติบโตดีที่สุด จึงเก็บน้ำเซลล์ 1 ml บั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนที่ตกตะกอนที่ -20°C เพื่อดูขนาดโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE จากนั้นเติมกลูโคส 2 ml แล้วแบ่งตัวเชื้อที่เชื้อจากออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 10 ml ส่วนที่หนึ่งเติม IPTG ที่มีความเข้มข้น 0.5 M ส่วนที่สองไม่เติม IPTG ที่มีความเข้มข้น 0.5 M จากนั้นแบ่งเก็บน้ำเซลล์ 500 μ l ของทั้ง 2 ส่วน บั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนที่ตกตะกอนที่ -20°C เพื่อดูขนาดโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE และนับเวลาของตัวอย่างเป็น ชั่วโมงที่ 0 ต่อจากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เชย้าที่ 200 rpm เป็นเวลา 6 แต่ละชั่วโมงให้เก็บน้ำเซลล์จากทั้ง 2 ส่วน ปริมาตร 500 μ l บั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนที่ตกตะกอนเพื่อดูขนาดโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE

11. การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมตัวอย่างโดยนำตัวอย่างมาปริมาตร 25 μ l ผสมกับ sample buffer ที่ผสม beta-Mercaptoethanol ปริมาตร 50 μ l นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที จึงนำมาใส่ลงในแต่ละหลุม ใส่หลุมละ 15 μ l โดยมี marker (BioRad) ในแต่ละแผ่น ซึ่งใส่ลงในหลุม 10 μ l ใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นย้อม gel ด้วย 0.1% coomassie blue solution (Amersham, USA) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงล้างออกด้วย destaining solution เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเปลี่ยน destaining solution ทุก 4 ชั่วโมง จากนั้นนำ gel ทำให้แห้งด้วยเครื่อง Gel dryer (BioRAD) ใช้ความร้อน 80°C เป็นเวลา 45 นาที

12. การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

นำตะกอน (pellet) ที่ได้จากการเลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) ที่โคลนยีน NS1 และ induce ด้วย 0.5mM IPTG และกลูโคส 1 % ปริมาณ 10 ml มาละลายด้วย Buffer B, pH 8.0 (Ni-NTA Spin kit, Qiagen) ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องและเชย้าเป็นเวลา 1

ชั่วโมง จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 11000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ -80°C แบ่ง 20 μl สำหรับดูขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำ buffer B ใส่ใน Ni-NTA Spin column ปริมาตร 600 μl ปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านกระบวนการทำให้เซลล์แตกจากข้างต้น ใส่ลงใน Ni-NTA Spin column ปริมาตร 600 μl ปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนใสเพื่อดูขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ล้าง Ni-NTA Spin column ด้วย buffer C ปริมาตร 600 μl ปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนใสเพื่อดูขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จำนวน 2 ครั้ง สุดท้ายทำให้โปรตีนที่มี Polyhistidine tag หลุดออกมาจาก Ni-NTA Spin column โดยการเติม buffer E ปริมาตร 200 μl ปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แบ่งส่วนใสเก็บเพื่อดูขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จำนวน 1 ครั้ง โปรตีนที่ได้นำไปเก็บที่ -80°C

13. Western Blot

แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ตามข้อ 3.10 จากนั้นล้าง resolving gel ด้วย transfer buffer ปริมาตร 100 ml เป็นนาน 30 นาที พร้อมทั้งแช่ Nitrocellulose membrane จำนวน 1 แผ่น และแช่ filter paper จำนวน 3 แผ่น เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำ filter paper แผ่นที่ 1 วางตรงกลางแผ่นที่ใช้สำหรับ Blot บนเครื่อง ให้นำ Nitrocellulose membrane วางด้านบน แล้ววาง resolving gel จากนั้นจึงนำ filter paper แผ่นที่ 2 และ 3 วางซ้อนแต่ละชั้นพยายามไม่ให้เกิดฟองอากาศ ปิดฝาครอบ ตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 15 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที เมื่อครบเวลานำ Nitrocellulose membrane แช่ใน Blocking Solution ปริมาตร 100 ml ที่ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้าง Nitrocellulose membrane ด้วย PBST ปริมาตร 100 ml เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง ปัม Nitrocellulose membrane ด้วย Anti-His(C-term) (Invitrogen) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5,000 ปริมาตร 7 ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง Nitrocellulose membrane ด้วย PBST ปริมาตร 100 ml เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ปัม Nitrocellulose membrane ด้วย Anti-His(C-term)-HRP (Anti-Mouse IgG HRP conjugate) (Invitrogen) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2,500 ปริมาตร 7 ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง Nitrocellulose membrane ด้วย PBST ปริมาตร 100 ml เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ใส่ TMB (Amersham) ปริมาตร 7 ml รอจนกระทั่งเกิดแถบโปรตีนสีเขียว จึงนำแผ่น Nitrocellulose membrane ถ่ายรูปและผึ่งให้แห้ง เก็บในที่มืดและอุณหภูมิห้อง

14. การวัดปริมาณโปรตีน NS1

วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ DC Protein Assay (Bio-RAD) ซึ่งใช้วิธี microplate assay ดังนี้ ในขั้นตอนแรก เตรียม Albumin from bovine serum ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยทำ 6 dilution คือ 2.88 g/l, 1.44 g/l, 0.72 g/l, 0.36 g/l, 0.18 g/l และ 0.09 g/l จากนั้นนำโปรตีน

มาตรฐานทุก dilution และสารละลาย recombinant protein NS1 ใส่ลงใน microplate หลุมละ 5 ul ทำ 2 ซ้ำ แล้วจึงเติม Reagent A ปริมาณ 25 ul และ Reagent B ปริมาณ 100 ul ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA ที่ความยาวคลื่น 650 nm

