การทดลอง : การทดสอบความสามารถในการจับกันระหว่างโปรตีน SCFV และ Dengue ในเซลล์มะเร็งปอด A549 ด้วยเทคนิค Western blot

วัตถุประสงค์ : เพื่อตรวจสอบการจับระหว่างโปรตีน SCFV และ Dengue

วิธีการทดสอบ

1. **การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง**

   ทำการแตกเซลล์โดยเติมน้ำยา lysis buffer เย็น(สำหรับโปรตีน) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนตะกอนเซลล์ ดูดเซลล์ขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์และนำไปเขย่าด้วย vortex แล้วทิ้งไว้ 30 นาที ในถังน้ำแข็งนำ cell lysate ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g ในอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อ ตกตะกอนเศษชิ้นส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนดูดสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ระวังอย่าให้ตะกอนติดมาแล้วถ่ายใส่ลงใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ เขียน label ที่หลอดโดยระบุชนิดตัวอย่าง วันที่ และรายละเอียดที่จำเป็น ในขั้นตอนนี้จะได้สารละลายโปรตีนเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

2. **การหาปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay**

1. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA และเจือจางสารละลายโปรตีนตัวอย่างตามปริมาตรที่ระบุในตารางลงใน 96-well plate อย่างละ 2 หลุม (duplicate)

ที่	ปริมาตร (µL)			BSA final Concentration (µg/µL)
	Stock 1 µg/µL of BSA	Lysis buffer	H_2O	
1	0	5	20	
2	1	5	19	
3	3	5	17	
4	5	5	15	
5	10	5	10	
6	เจือจางตัวอย่างลง 2 เท่าด้วย lysis buffer ปิเปตหลุมละ 5 µL		20	
7	เจือจางตัวอย่างลง 5 เท่าด้วย lysis buffer ปิเปตหลุมละ 5 µL		20	
8	เจือจางตัวอย่างลง 10 เท่าด้วย lysis buffer ปิเปตหลุมละ 5 µL		20	

2. จดบันทึกค่าการเจือจาง สุดท้ายของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง

3. เตรียม Working Reagent โดยผสม Reagent A : Reagent B ในอัตราส่วน 50:1
4. เติม WR ปริมาตร 200 µL ลงในแต่ละหลุมของ BSA และตัวอย่างโปรตีน ผสมให้เข้ากัน
5. บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C เวลา 30 นาที
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร
7. บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

3. SDS PAGE

3.1 การเตรียม SDS-polyacrylamide gel

เตรียมส่วนประกอบต่างๆ ของชุดทำเจลโพลีอะคริลาไมด์ ประกอบชุดอุปกรณ์ทำเจล ทดสอบการรั่วของชุดกระจก ระหว่างรอทดสอบการรั่วซึม ให้เตรียมสารละลาย 12% separating gel และ 4% stacking gel เมื่อพบว่าชุดกระจกไม่มีการรั่วซึม เทน้ำออกและซับให้แห้ง เติม TEMED ลงใน12% separating gel ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม separating gel ลงในช่องว่างแผ่นกระจกรอให้ separating gel แข็งตัว ประมาณ 20-30 นาที เติม TEMED ลงใน 4% stacking gel ผสมให้เข้ากัน แล้วค่อยๆเติม 4% stacking gel ลงไปทับชั้น separating gel จากนั้นใส่ comb ลงไปรอให้ stacking gel แข็งตัว ระหว่างรอ เจือจาง 10x running buffer ให้เป็น 1x running buffer เท 1x running buffer ลงไปในชุด electrode ให้ท่วมเจล และเทลงใน tank ให้สูงกว่าขีดระดับ

3.2 การแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้า

ค่อยๆดึงcomboออกจากเจลล้างหลุมเจลโพลีอะคริลาไมด์ (well) เติมสารละลายโปรตีนที่ได้เตรียมไว้ (ผสม dye และต้มแล้ว)ปริมาตรไม่เกิน 30 µl ลงในหลุมเจล โดยต้องเติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (Protein Ladder) ปริมาตร 3 µl ลงไปด้วยเพื่อใช้เปรียบเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ปิดฝาชุดอุปกรณ์การทำ SDS-PAGE แล้วต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า กำหนดความต่างศักย์ คงที่ที่ 150 โวลต์ (หรือตามต้องการ) เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าสีของ Laemmli sample buffer จะวิ่งมาจนสุดเจล (ระหว่างรอ ให้เตรียมสี Coomassie blue และ transfer buffer เทใส่ถาดรอไว้) เมื่อครบเวลาให้ปิดเครื่องก่อนเปิด ฝาแล้วยกชุด electrod eassembly ออกจากtankถอดชุด กระจก gel cassette sandwich ออกจาก electrode assembly แล้วล้างน้ำเบา ๆ ให้หายลื่น ใช้ gel releasers ค่อย ๆ งัดแผ่นกระจกด้านใดด้านหนึ่งออก แล้วตัดเจลส่วน stacking gel ออก

4. Protein Blotting/ Protein transfer

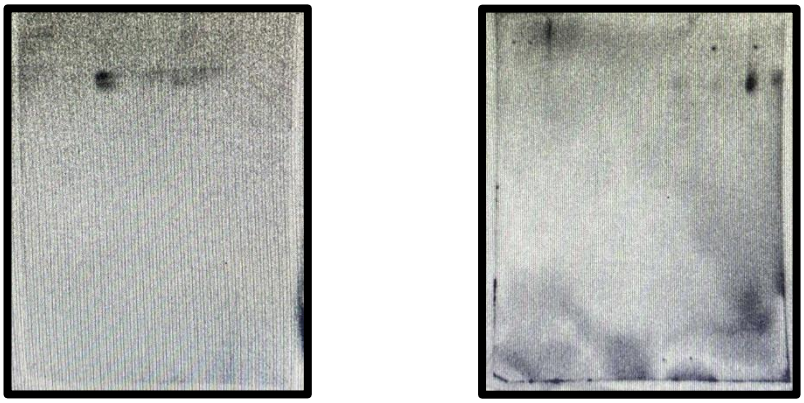
ตัด membrane และ กระดาษกรองให้มีขนาดเท่าเจล ขั้นตอน Equilibration membrane และกระดาษกรอง โดยแช่ membrane และ กระดาษกรอง ในtransfer buffer ประมาณ 30 นาที (เพื่อให้อิ่มตัวในบัฟเฟอร์) ทำเครื่องหมายหรือสัญลักษณ์เพื่อระบุด้านของเจลที่จะประกบกับ membrane ถอดฝาออกจากเครื่อง transfer และวางแผ่นกระดาษกรองที่แช่จนอิ่มตัวในบัฟเฟอร์สาม วาง membrane ไว้ด้านบนของแผ่นกระดาษกรองอย่างระมัดระวัง และตรวจดูให้แน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น วางเจลที่ด้านบนของ membrane และเกลี่ยให้เรียบเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีช่องอากาศ วางแผ่นกระดาษกรองที่เหลืออีกสามแผ่นที่ด้านบนของ membrane แล้วค่อยๆ เกลี่ยให้เรียบ วางฝาปิดของเครื่อง transfer ลงบนแซนวิช อย่างระมัดระวัง ต่อสายไฟเข้ากับตัวเครื่อง สายสีแดงต่อเข้ากับขั้วบวก และสานยสีดำต่อเข้ากับขั้วลบต่อสายไฟเข้ากับ power supply สายสีแดงต่อขั้วสีแดง สายสีดำต่อขั้วสีดำ

5. ตรวจสอบโปรตีนที่สนใจ

วางแผ่น nitrocellulose membrane ไว้ในถาดโดยหันด้านที่มีโปรตีนขึ้นด้านบน Block พื้นที่ว่างบนแผ่นmembraneด้วย blocking buffer ปริมาตร 5 ml แล้วเขย่าที่ความเร็ว 50 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อปกปิดพื้นหลังของ membrane และป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับ membrane (block non-specific binding) เท blocking buffer ทิ้งแล้วเติม primary antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนที่สนใจ เมื่อแช่ใน primary antibody จนครบเวลา จากนั้นล้างแผ่น membrane ด้วย 0.05 % PBST ปริมาตร 3ml จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะกับ primary antibody ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เทสารละลายที่มี secondary antibody ออกแล้วล้างแผ่น membrane ด้วย 0.05 % PBST ปริมาตร 3ml จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบหาสัญญาณต่อไป เติม TMB substrate ให้ท่วม membrane บ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จนเห็นสีน้ำเงินบนแผ่นmembrane ล้าง membrane ด้วนน้ำกลั่น ทำการถ่ายภาพและเก็บ membrane ไว้ในตู้เย็น 4 ° C

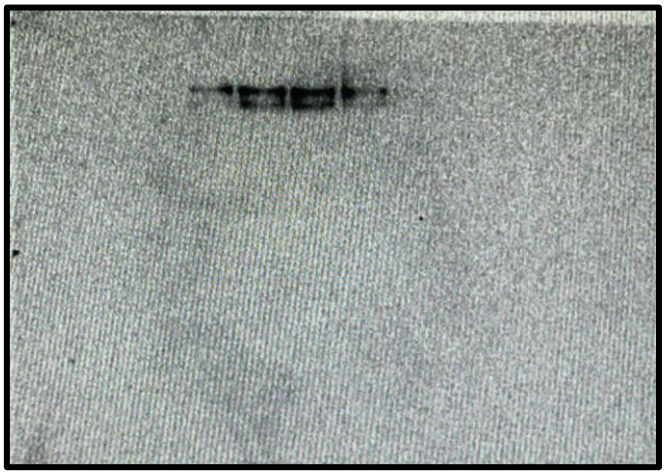
ผลการทดสอบ

ผลการศึกษาการจับของโปรตีน SCFV และ Dengue



(ก) **(ข)**

ภาพที่ 1 การตรวจสอบการจับของโปรตีนSCFV และ Dengue ด้วยเทคนิค Western blotting ด้วย antibody โดย Anti-Dengue (ก) และ SCFV (ข)



ภาพที่ 2 การตรวจสอบการจับของโปรตีน SCFV 20 µg/mL 1 : 1000

Anti-His-tag 1 : 1000

GAM 1 : 1000