2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

ปลาตัวอย่าง

ปลาที่ใช้ในการศึกษาคือปลากระบอกดำ เป็นปลาที่มีขนาดลำตัวยาว 10-40 เซนติเมตร จับจากชายฝั่ง อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช และอ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี ปลาเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณวิรัตน์ จิตรแจ่ม และคุณชัชมณฑ์ แดงกนิษฐ์

ปลาทะเลอื่น ๆ ที่ใช้คือปลากระบอกหัวสิ่วหรือปลากระบอกหัวเสี้ยม (gold spotted mullet, *Lisa parsia*) ปลากระบอกท่อนใต้ (diamond-scaled grey mullet, *Lisa vaigiensis*) ปลากระบอกขาว (Longarm mullet, *Valamugil cunnesius*) ปลากระบอกปีกเหลือง (blue spot grey mullet, *Valamugil sehli*) ปลากะรัง ปลากะพงแดง และปลาดุกทะเล (sea catfish, *Plotosus lineatus*)

กระต่าย

กระต่ายที่ใช้สังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายเพศผู้ ตาแดง สายพันธุ์ New Zealand น้ำหนักประมาณ 1.2 กิโลกรัม อายุ 3 เดือน ซึ่งเลี้ยงไว้ในหน่วยสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และให้อาหารปกติ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	Merck
Acrylamide	Fluka
Agarose	Sigma
Amido black B	Sigma
Ammonium molybdate	Mallinckrodt
Ammonium persulphate	Merck
Ammonium sulphate	Fluka
Anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate	Sigma
Bisacrylamide (N,N′-methylene diacrylamide)	Fluka
Bovine serum albumin	Sigma
Broad range protein molecular weight marker	Promega
Bromophenol blue	Merck
Calcium chloride	Ajex Chemicals
Citric acid	Ajex Chemicals
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma
Coomassie plus protein assay reagent kit	Pierce
DEAE-Sephacel	Sigma
3,3′-Diaminobenzidine	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid	Fluka
Freund's adjuvant complete	Sigma
Freund's adjuvant incomplete	Sigma

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Gel code blue stain reagent kit	Pierce
Gel code glycoprotein staining kit	Pierce
Gel code phosphoprotein staining kit	Pierce
Glycerol	Sigma
Glycine	Fluka
Hydrochloric acid	Merck
β-Mercaptoethanol	Fluka
Methanol	Merck
p-Phenylenediamine	Sigma
Phenylmethylsulphonylfluoride	Sigma
Potassium bromide	Merck
Potassium dihydrogen phosphate	Merck
Sephadex G-200	Pharmacia
Silver stain Kit	Bio-Rad
Sodium chloride	Sigma
Sodium dodecyl sulphate	Riedel-de Haen
Sodium metabisulphite	Mallinckrodt
Standard bovine serum albumin	Pierce
Sudan black B	BDH chemicals Ltd.
Superdex 200 HR 10/30 column	Pharmacia
N,N, N′,N′-Tetramethylethylenediamine	Fluka
Trichloroacetic acid	Analyticals CARLO ERBA
Tris(hydroxymethyl) aminomethane	Sigma
Triton X-100	Merck

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	GT410	Ohaus
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-5	Mettler
Centrifuge	5415C	Eppendorf
	5804R	Eppendorf
ELISA plate reader	Elx808	Bio-Tek Instruments Inc.
Fast protein liquid chromatography	-	Pharmacia Biotech
Micropipette	-	Gilson
Microtube pump MP-3	MP-3N	Eyela
Mighty small™ Transphor	TE22	Hoefer Phamacia Biotech
Orbital shaker	OS 20	Boeco
pH meter	Accumet 15	Fisher Scientific
Power supply	1000/500	Bio-Rad
Refrigerated super speed centrifuge	J2-21	Beckman
Slab gel electrophoresis apparatus	*AE-6400*	*Atto*
Ultracentrifuge	L8-70M	Beckman
UV-VIS spectrophotometer	160A	Shimadzu
Vortex	G-560E	Scientific Industries

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมพลาสมาจากปลากระบอกดำ

ทำให้ปลาสลบในน้ำเย็นที่อุณหภูมิประมาณ 10-15 °ซ หลังจากนั้นเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณใต้กระดูกสันหลัง โดยใช้ acid citrate dextrose (ACD, 114 mM glucose-72 mM NaCl-27.2 mM sodium citrate - 2.62 mM citric acid) เป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำเลือดไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,610 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที เติม PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride) ในพลาสมาให้มีความเข้มข้นเป็น 1 mM แล้วเก็บไว้ที่ –20 °ซ

2.2 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างด้วยชุดหาโปรตีน (Coomassie plus protein assay reagent kit) จากบริษัท Pierce ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ใส่ไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate แบบ immuno™ maxisorp) โดยทำควบคู่ไปกับ BSA (bovine serum albumin) จากบริษัท Pierce ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน เจือจาง BSA มาตรฐานให้มีปริมาณโปรตีน 25-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับชุดหาโปรตีน เขย่าไมโครไตเตอร์เพลท นานครึ่งนาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader

2.3 การหาปริมาณฟอสเฟต

หาปริมาณฟอสเฟตของสารตัวอย่างซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Fisk and Subbarow (1925) นำสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย molybdic TCA (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก) จำนวน 180 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 x g นาน 10 นาที นำเฉพาะส่วนใส 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย

p-phenylenediamine (0.5% *p*-phenylenediamine dihydrochloride-5% sodium disulphite) จำนวน 200 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลท แบบ immuno™ maxisorp ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร (A680) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานฟอสเฟต ซึ่งทำในทำนองเดียวกัน

2.4 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร

2.4.1 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 4-10% หรือ 6% ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel	Separating gel		
	3% (5 ml)	4% (3 ml)	6% (3 ml)	10% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.40 ml	0.60 ml	1.00 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.63 ml	-	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.50 ml	1.50 ml	1.50 ml
10% Ammonium persulphate	50 µl	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Distilled water	3.82 ml	1.07 ml	0.87 ml	0.47 ml

2.4.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล (glycerol) และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ให้ได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นโปรตีนพอเหมาะ เตรียมโปรตีนมาตรฐานในทำนองเดียวกัน

2.4.1.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris–0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.4.2 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) ตามวิธีของ Laemmli (1970) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล (6-18%) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	6% (3 ml)	18% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.60 ml	1.80 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	0.75 ml	0.75 ml
0.2 M EDTA	50 µl	30 µl	30 µl
10 % SDS	50 µl	30 µl	30 µl
10% Ammonium persulphate	50 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl
Distilled water	3.10 ml	1.56 ml	0.36 ml

2.4.2.1 **การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน**

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานโดยผสมสารตัวอย่าง 2 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.375 M Tris-HCl, pH 6.8, 6 mM EDTA, 30% กลีเซอรอล และ 0.021% โบรโมฟีนอลบลู ให้ได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นโปรตีนพอเหมาะ

ในการเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานสภาพรีดิวซ์ (reduce) ทำโดยการผสมสารตัวอย่าง 2 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.375 M Tris-HCl, pH 6.8, 30% กลีเซอรอล, 0.6 M เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) และ 0.021% โบรโมฟีนอลบลู ให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นโปรตีนพอเหมาะ ต่อจากนั้นต้มในน้ำเดือด 2 นาที ก่อนทำอิเล็กโทรฟอรีซิส สำหรับโปรตีนมาตรฐานใช้ของบริษัท Promega ซึ่งอยู่ใน 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% กลีเซอรอล, 0.2 M เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล และ 0.007% โบรโมฟีนอลบลู ต้มในน้ำเดือดและทำวิธีการเดียวกัน

2.4.2.2 **การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส**

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องของเจลส่วนบนแยกกัน โดยใช้ 0.025 M Tris–0.192 M glycine-1% SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรฟอรีซิส เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.4.3 **การย้อมสีโปรตีน**

2.4.3.1 ***การย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูมาซีบลู***

ย้อมสีโปรตีนในเจลด้วยสีคูมาซีบลู (Coomassie brilliant blue R-250) โดยแช่เจลในสารละลาย 0.08% คูมาซีบลู-50% เมธานอล (methanol)-7.5% *กรด*น้ำส้ม (acetic acid) นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 18% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

2.4.3.2 **การย้อมสีโปรตีนแบบซิลเวอร์** (Silver stain)

ใช้สารละลายโปรตีน 0.5-2.0 ไมโครกรัมต่อช่องเจล หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส ตรึงโปรตีนในเจลด้วย 40% เมธานอล-10% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที จากนั้นแช่เจลในสารละลาย 5% เอธานอล (ethanol) นาน 15 นาที เปลี่ยนสารละลายอีกครั้ง จากนั้นใช้ชุดย้อมซิลเวอร์ (silver stain kit) ของบริษัท Bio-Rad โดยเติมสารละลายออกซิไดเซอร์ (oxidizer solution) เขย่านาน 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน (deionized water) จนสีเหลืองในเจลหมดไป แช่เจลในน้ำยาซิลเวอร์ (silver reagent) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดไอออนนาน 1 นาที เติมสารละลายดีวีโลเปอร์ (developer) เขย่าและเปลี่ยนสารละลายเมื่อสีของสารละลายเป็นสีเทาหรือสีน้ำตาล เมื่อปรากฏแถบโปรตีนหยุดปฏิกิริยาด้วย 5% กรดน้ำส้ม เก็บเจลใน 20% เมธานอล-10% กรดน้ำส้ม

2.4.3.3 **การย้อมสีโปรตีนแบบบลู** (Blue stain)

ย้อมสีโปรตีนในเจลด้วยสีบลู โดยล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน นาน 5 นาที 2-3 ครั้ง ย้อมเจลด้วยน้ำยาย้อมสีบลู (gel code blue stain reagent) ของบริษัท Pierce เขย่าเบา ๆ เมื่อปรากฏแถบโปรตีนล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน โดยเปลี่ยนน้ำปลอดไอออนหลาย ๆ ครั้ง จนปรากฏแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจนในเจลใสสีฟ้า

2.4.4 **การย้อมสีไกลโคโปรตีน**

ย้อมสีไกลโคโปรตีนด้วยชุดย้อมไกลโคโปรตีน (gel code glycoprotein staining kit) ของบริษัท Pierce โดยหลังจากทำ SDS-PAGE สภาพรีดิวซ์ ตรึงโปรตีนในเจลด้วย 50% เมธานอล นาน 30 นาที ล้างเจลด้วย 3% กรดน้ำส้ม 10 นาที 2 ครั้ง ย้ายเจลลงในสารละลายออกซิไดเซอร์ นาน 15 นาที ล้างเจลด้วย 3% กรดน้ำส้ม หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นแช่เจลในชุดย้อมไกลโคโปรตีน นาน 15 นาที แช่เจลในสารละลายรีดิวซ์ นาน 5 นาที ล้างเจลด้วย 3% กรดน้ำส้ม แล้วตามด้วยน้ำกลั่น เมื่อปรากฏแถบสีชมพูม่วง (magenta band) ของไกลโคโปรตีน เก็บเจลในสารละลาย 3% กรดน้ำส้ม

2.4.5 การย้อมสีลิโพโปรตีน

ย้อมสีลิโพโปรตีนด้วยสีซูดานแบล็คบี ตามวิธีของ Prat *et al.* (1969) โดยนำเจลแช่ในสารละลายซูดานแบล็คบี (0.5% ซูดานแบล็คบี-50% เอธานอล-50% กลีเซอรอล ซึ่งผสมกับ 2% KOH ในอัตราส่วน 3:2) นาน 40 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น แล้วล้างต่อด้วย 2% เอธานอล-2% กรดน้ำส้ม นาน 25 นาที ล้างเจลต่อด้วยน้ำกลั่น จนเห็นแถบลิโพโปรตีนเป็นสีฟ้าน้ำเงินชัดเจน

2.4.6 การย้อมสีฟอสโฟโปรตีน

หลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซิส ย้อมฟอสโฟโปรตีนในเจลด้วยชุดย้อมฟอสโฟโปรตีน (gel code phosphoprotein staining kit) ของบริษัท Pierce ตามขั้นตอนดังนี้ ล้างเจลในน้ำปลอดไอออนนาน 10 นาที เทน้ำออก แช่เจลในสารละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก (sulphosalicylic acid) นาน 15 นาที เทออก เติมสารละลายผสมระหว่างกรดซัลโฟซาลิไซลิกกับ $CaCl_2$ นาน 30 นาที จากนั้นล้างเจลอย่างรวดเร็วด้วยน้ำปลอดไอออน เพื่อล้าง $CaCl_2$ ที่ผิวเจลออก เติมสารละลาย 0.5 N NaOH นำไปวางในเตาอบ (oven) ที่อุณหภูมิ 65 $^{\circ}$ซ นาน 20 นาที เทสารละลายออก เติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท (ammonium molybdate) เขย่า 10 นาที เปลี่ยนสารละลายอีกครั้ง แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างแอมโมเนียมโมลิบเดทกับ HNO_3 เขย่านาน 20 นาที จากนั้นแช่เจลในสารละลายเมธิลกรีน (methyl green solution) นาน 20 นาที ล้างเจลด้วยสารละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก นาน 15 นาที เปลี่ยนสารละลายอีกครั้งเมื่อปรากฏแถบสีเขียวของฟอสโฟโปรตีนบนพื้นเจลสีเขียวชัดเจน บ่มเจลใน 7% กรดน้ำส้ม เขย่านาน 10 ชั่วโมง เปลี่ยนสารละลายเดิมอีกครั้งเมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว

2.4.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนใน Nondenaturing PAGE

หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนใน nondenaturing PAGE ตามวิธีของ Rodbard (1976) และ Ferguson (1964) โดยใช้หลักการว่า โปรตีนจะเคลื่อนที่ในอิเล็กโทรฟอรีซิสได้มากน้อยขึ้นกับประจุสุทธิของโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในเจลส่วนล่าง กล่าวคือ นำสารละลายตัวอย่าง

สารละลายโปรตีนมาตรฐานซึ่งเตรียมตามวิธีข้อ 2.4.1.1 ไปทำ nondenaturing PAGE โดยเจลแต่ละแผ่นมีความเข้มข้นของเจลส่วนบนเท่ากัน (3%) แต่เจลส่วนล่างแต่ละแผ่นมีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์แตกต่างกัน แผ่นละหนึ่งความเข้มข้น 4, 5, 6, 7, 8 และ 9% หลังการย้อมสีโปรตีน วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐาน และแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนตัวอย่างจากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์อะคริลาไมด์ในเจลส่วนล่าง (4-9%) กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ที่คำนวณได้ จากกราฟที่ได้คำนวณหาค่าความชัน (slope) ของแต่ละแถบโปรตีน แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความชันกับ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานซึ่งได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (thyroglobulin, M_r 669,000), เฟอร์ริทิน (ferritin, M_r 440,000), คาทาเลส (catalase, M_r 232,000), เลคเททดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase, M_r 140,000) และอัลบูมิน (albumin, M_r 67,000) นำค่าความชันของแถบโปรตีนในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลในสารตัวอย่างได้

2.5 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมา

2.5.1 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เตรียม DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ขนาด 2.6 X 15 เซนติเมตร มีปริมาตรของเรซิน (resin) ในคอลัมน์เป็น 90 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วย 0.2 M sodium citrate-0.2% Triton X-100 (Wallace, 1965) แล้วปรับให้คอลัมน์สมดุล (equilibrate) ด้วยบัฟเฟอร์ TB (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมพลาสมาปลาเพศเมียมีไข่ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการไดแอไลซ์ (dialyse) ด้วย TB-1 mM PMSF (TB-PMSF) ลงในคอลัมน์ แล้วล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิ

ลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 4 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ล้างคอลัมน์จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นแบบต่อเนื่องจาก 0-0.35 M (300 มิลลิลิตร + 300 มิลลิลิตร) ใน TB-PMSF ด้วยอัตราไหลเท่าเดิมและเก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และทดสอบการมีไวเทลโลจีนินด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรัง รวมสารละลายหลอดที่มีไวเทลโลจีนินเข้าด้วยกันเป็นพีค (peak) ทำให้สารละลายแต่ละพีคเข้มข้นในถุงไดแอไลซ์ (dialysis bag) โดยใช้ CM-cellulose จนสารละลายในถุงไดแอไลซ์เหลือเพียงเล็กน้อย นำไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE หาปริมาณฟอสเฟต และนำสารละลายพีค D2 และ D3 ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 และนำสารละลายพีค D3 ไปทำ preparative PAGE (ตามวิธีข้อ 2.5.5)

2.5.2 **โดยคอลัมน์** Sephadex G-200

ล้างและปรับคอลัมน์ Sephadex G-200 (1.6 X 90 เซนติเมตร) ซึ่งมีปริมาตรเรซิน 180 มิลลิลิตร ให้สมดุลด้วยบัฟเฟอร์ TBS-PMSF (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-150 mM NaCl-1 mM PMSF) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำสารละลายเข้มข้นของพีค D2 และ D3 ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel (จากข้อ 2.5.1) ไปไดแอไลซ์ใน TBS-PMSF นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ จากนั้นนำแต่ละพีคไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ปรับให้มีอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 รวมสารละลายที่มี A280 สูงของแต่ละพีคเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose นำไปทดสอบการมีไวเทลโลจีนินด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังและทำ nondenaturing PAGE

2.5.3 **โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง 2 ครั้ง**
(Double ultracentrifugation)

นำพลาสมาปลาเพศเมียมีไข่ที่มีปริมาณโปรตีน 10 มิลลิกรัม (0.5 มิลลิลิตร) เติม KBr 0.25 กรัม ลงในพลาสมาผสมจน KBr ละลายหมด ดูดสารละลายใส่หลอดเซนตริ

ฟิวจ์ เติมสารละลาย KBr ที่มีค่าความหนาแน่น (d) 1.29 กรัมต่อมิลลิลิตร (d=1.29), 1.23 กรัมต่อมิลลิลิตร (d=1.23) และ 1.15 กรัมต่อมิลลิลิตร (d=1.15) ค่าความหนาแน่นละ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิดทับสารละลายชั้นบนด้วย 0.9% NaCl หลังจากนั้นนำไปทำ ultracentrifugation ในโรเตอร์ (rotor) TW41Ti ด้วยความเร็ว 14,433 x g นาน 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ หลังการเซนตริฟิวจ์ ดูดสารละลายออกครั้งละ 0.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในแต่ละหลอดแยกกัน นำสารละลายแต่ละหลอดไปไดแอไลซ์ใน TB-PMSF นาน 48 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ แล้วนำไปหาโปรตีน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิส และทำ Western blot กับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรัง ตามวิธีข้อ 2.8.1

นำสารละลายหลอดที่มีไวเทลโลจีนินรวมเข้าด้วยกัน แล้วทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose และไดแอไลซ์ ใน TB-PMSF นาน 12 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ ก่อนนำไปทำ ultracentrifugation ครั้งที่ 2 โดยเติม KBr 0.15 กรัม ผสมจน KBr ละลายหมด ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ เติมสารละลาย KBr ที่ค่าความหนาแน่นต่าง ๆ ตามวิธีข้างต้น แต่ใช้ปริมาตรลดลงเหลือความหนาแน่นละ 1.5 มิลลิลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์เช่นเดิม จากนั้นดูดสารละลายแยกแต่ละหลอดและไดแอไลซ์ ติดตามแถบโปรตีนไวเทลโลจีนินโดยการทำ nondenaturing PAGE และทำ Western blot เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ

2.5.4 **โดยคอลัมน์** Superdex 200 HR 10/30

ใช้คอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 ขนาด 1 X 30 เซนติเมตร ปริมาตรเรซินประมาณ 24 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับเครื่อง fast protein liquid chromatography (FPLC) ล้างและปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วยบัฟเฟอร์ TBS-PMSF ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายรวมหลอดที่ 14-16 ที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงครั้งที่ 1 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นและไดแอไลซ์ใน TBS-PMSF นาน 12 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ เรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 150 ไมโครลิตร (153 ไมโครกรัม) ฉีดใส่คอลัมน์ Superdex 200 ชะคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF ให้มีอัตราไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.2 มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละหลอด 20 ไมโครลิตร ไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีข้อ 2.2 และติดตามแถบโปรตีนโดยการทำ nondenaturing PAGE แล้วรวมสารละลายหลอดที่มีไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์เข้าด้วยกัน นำไปเตรียมแอนติบอดีตามวิธีการข้อ 2.6.2

2.5.5 **โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (Preparative PAGE)**

ทำการแยกสารละลายรวม d=1.23 (มีค่าความหนาแน่น 1.23 กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงครั้งที่ 1 (ข้อ 2.5.3) และสารละลายพีค D3 ที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ไปแยกต่อโดย preparative PAGE ซึ่งเป็น nondenaturing PAGE โดยเตรียมเจลให้มีขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในเจลส่วนบน 3% และเจลส่วนล่าง 6% เจลส่วนบนเตรียมให้มีช่องใส่สารตัวอย่างเพียงช่องเดียวขนาด 0.1 x 9 เซนติเมตร จากนั้นผสมสารละลายรวม d=1.23 หรือสารละลายพีค D3 กับบัฟเฟอร์ตัวอย่างในอัตราส่วน 3:1 (ตามวิธีข้อ 2.4.1.1) นำสารละลายที่ได้เติมลงในช่องใส่สารตัวอย่าง แล้วเปิดกระแสไฟคงที่ที่ 15 mA ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 2 ชั่วโมง ปิดกระแสไฟ ตัดเจลตรงกลาง ขอบซ้าย และขอบขวาเป็นแถบกว้าง 0.2 เซนติเมตร ยาวตลอดแผ่นเจล นำเจลทั้ง 3 ชิ้นไปย้อมด้วยชุดย้อมสีบลูตามวิธีข้อ 2.4.3.3 เมื่อเห็นแถบโปรตีน นำไปเทียบตำแหน่งกับเจลส่วนที่เหลือซึ่งไม่ได้ย้อมสี แล้วตัดเจลเฉพาะแถบโปรตีนไวเทลโลจีนินที่ต้องการออกจากเจลที่ไม่ได้ย้อมสีตามขวาง จากนั้นทำการชะไวเทลโลจีนินออกจากชิ้นเจลโดยนำชิ้นเจลที่มีแถบไวเทลโลจีนินที่ต้องการใส่ในถุงไดแอไลซ์ แล้วนำไปวางตามแนวขวางในเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวนอนซึ่งมีบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 ท่วมทุกถุงแบบใต้น้ำ (submarine) เปิดกระแสไฟคงที่ที่ 15 mA เมื่อครบ 8 ชั่วโมง นำสารละลายในถุงไดแอไลซ์ไปทำให้เข้มข้น หาปริมาณโปรตีน ทดสอบความบริสุทธิ์ของไวเทลโลจีนินโดยวิธี nondenaturing PAGE และทำ Western blot กับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังและแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ

2.6 การเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

2.6.1 การกระตุ้นการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะรังในกระต่าย

กระต่ายที่ใช้สังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายขาว ตาแดง 2 ตัว หนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะรังที่ใช้ฉีดกระต่ายเตรียมได้จากห้องปฏิบัติการของรองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์ ตามวิธีของ Utarabhand และ Bunlipatanon (1996) นำไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ไปฉีดกระตุ้นกระต่ายโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง 4-5 จุด ปริมาณไวเทลโลจีนินที่ใช้และระยะเวลาการกระตุ้น เป็นดังนี้ สัปดาห์ที่ 1 ฉีดไวเทลโลจีนิน 1 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร และอีก 2 สัปดาห์ถัดมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 1 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 1 มิลลิลิตร และอีก 2 สัปดาห์ต่อมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 0.5 มิลลิกรัม ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตร ของ TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.15 M NaCl)

เจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดบริเวณหู 5 มิลลิลิตร ทุกครั้งก่อนฉีดไวเทลโลจีนินแต่ละครั้ง และหลังจากการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ตั้งเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 18 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 x g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บซีรัมไว้ที่ –20 °ซ เพื่อใช้ทดสอบแอนติบอดี

2.6.2 การกระตุ้นการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากระบอกดำในกระต่าย

นำไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ซึ่งเตรียมได้จากคอลัมน์ Superdex 200 (ข้อ 2.5.4) ไปฉีดกระตุ้นกระต่ายขาวตาแดง หนักประมาณ 1.2 กิโลกรัม อายุประมาณ 3 เดือน โดยฉีดในผิวหนัง 3-4 จุด และใต้ผิวหนัง 2-3 จุด โดยใช้ปริมาณไวเทลโลจีนินและระยะเวลาการกระตุ้น ดังนี้ สัปดาห์ที่ 1 และ 2 ฉีดไวเทลโลจีนินสัปดาห์ละ 20 ไมโครกรัม ซึ่งผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร และอีก 2 สัปดาห์ต่อมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 0.8 มิลลิลิตร

เจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดบริเวณหูทุกครั้งก่อนฉีดไวเทลโลจีนินแต่ละครั้ง และหลังจากการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ เจาะเลือดกระต่ายปริมาณ

มากนำไปทำต่อเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1

2.6.3 การทดสอบการมีแอนติบอดี

ทดสอบการมีแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน ด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1956) ดังนี้ เท 0.3% อะกาโรส (agarose) ใน 0.9% NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ (slide) ทิ้งให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบที่ 80 °ซ จนอะกาโรสแห้งติดแผ่นสไลด์ จากนั้นเท 1.5% อะกาโรส ใน 0.9% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์เดิม ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเจาะอะกาโรสให้เป็นหลุม ทดสอบการมีแอนติบอดี โดยการเติมไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ในหลุมกลาง แล้วเติมซีรัมของกระต่ายก่อนและหลังฉีดไวเทลโลจีนิน หลุมข้างรอบ ๆ หลุมกลาง เก็บสไลด์ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 ชั่วโมง ถ้ามีแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายจะเห็นแถบการตกตะกอน (precipitin band) ของแอนติเจนและแอนติบอดี ระหว่างหลุมที่ใส่ซีรัมกับหลุมที่ใส่แอนติเจน เพื่อให้เห็นแถบการตกตะกอนนี้ชัดเจน แช่สไลด์ใน 0.9% NaCl 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างโปรตีนที่ไม่ตกตะกอนออกโดยการเปลี่ยนน้ำกลั่นบ่อย ๆ วางสไลด์ที่ 20 °ซ เพื่อให้อะกาโรสแห้งติดแผ่นสไลด์ แล้วย้อมสไลด์ด้วยสีอะมิโดแบล็คบี (amido black B) (0.02% อะมิโดแบล็คบี-50% เอธานอล-5% กรดน้ำส้ม) นาน 2 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น

2.6.4 การแยกแอนติบอดี

หลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่าย 10-15 มิลลิลิตร ตั้งเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 18 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 x g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนซีรัม แล้วแยกแอนติบอดีจากซีรัมตามวิธีของ Warden และ Giese (1984) โดยนำซีรัมไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) ที่ความอิ่มตัว 50% นาน 10 ชั่วโมง แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 22,000 x g นาน 30 นาที ที่ 4 °ซ ละลายตะกอนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 แล้วนำไปไดแอไลซ์ในบัปเฟอร์ชนิดเดิม นาน 10 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 22,000 x g นาน 50 นาที นำสารละลายที่ได้ผ่านลงคอลัมน์ DEAE-Sephacel (ขนาด

2.6 x 10 เซนติเมตร) ที่ปรับให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร แอนติบอดี (IgG, immunoglobulin G) จะหลุดออกมาในพีคแรก (Wallace, 1965) รวมสารละลายของพีคแรกเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose แล้วทดสอบการมีแอนติบอดีโดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion

2.7 การเตรียมสารสกัดจากเนื้อเยื่อของปลา

2.7.1 สารสกัดตับ

นำตับไปโฮโมจีไนซ์ (homogenize) ใน TBS-PMSF ตั้งไว้ 1 คืน ที่ 4 °ซ แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางหนา 8 ชั้น นำสารละลายไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 18,900 x g ที่ 4 °ซ นาน 20 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดตับไปทำ double immunodiffusion (ตามวิธีข้อ 2.6.3)

2.7.2 สารสกัดโปรตีนโยล์คจากโอโอไซท์

นำรังไข่ปลากระบอกดำล้างด้วย TBS-PMSF แยกเอาเฉพาะส่วนโอโอไซท์ โดยกรองผ่านตาข่ายไนลอนที่มีรูขนาด 320/420 ไมโครเมตร นำไปโฮโมจีไนซ์ในบัฟเฟอร์ ก (20 mM Tris-HCl, pH 8-1.5 M NaCl-2 mM $CaCl_2$-1 mM PMSF และ 2 μM leupeptin) กรองเอาเศษเซลล์ออก นำสารละลายไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 15 นาที สารละลายส่วนใสนำไปเซนตริฟิวจ์ต่อที่ความเร็ว 11,200 x g นาน 20 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดโปรตีนโยล์คไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ ส่วนตะกอนนำไปเตรียมสารสกัดเมมเบรนในข้อ 2.7.3 ต่อไป

2.7.3 สารสกัดเมมเบรนจากโอโอไซท์

นำตะกอนจากข้อ 2.7.2 ไปละลายในบัฟเฟอร์ ก แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ต่อที่ความเร็ว 1,000 x g นาน 15 นาที ทำซ้ำขั้นตอนการเซนตริฟิวจ์หลาย ๆ ครั้ง เพื่อล้างโปรตีนโยล์คออก แล้วละลายตะกอนด้วย 250 mM Tris-HCl, pH 6-2 mM $CaCl_2$-1 mM PMSF-2 μM leupeptin เติมบัฟเฟอร์สกัด (2 mM $CaCl_2$, 320 mM NaCl และ 2%

Triton X-100) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าที่ 4 °ซ นาน 10 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 18,900 x g ที่ 4 °ซ นาน 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายส่วนใส (สารสกัดเมมเบรน) เพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีน

2.8 การทำ Western blot

2.8.1 **การตรวจหาแถบไวเทลโลจีนิน**

แยกสารตัวอย่างด้วย nondenaturing PAGE จากนั้นขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลส ตามวิธีของ Towbin *et al.* (1979) โดยทำในบัฟเฟอร์ Towbin (0.025 mM Tris-0.192 mM glycine-10% เมธานอล, pH 8.3) และใช้กระแสไฟที่ 500 mA นาน 1 ชั่วโมง ติดตามการขนถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลสโดยย้อมด้วย 0.5% Ponceau S-1% กรดน้ำส้ม ล้างสี Ponceau S ออกด้วยน้ำกลั่น แล้วล้างต่อด้วย TBS จนสีออกหมด นำแผ่นไนโทรเซลลูโลสไปบ่มด้วย 3% BSA ใน TBS (TBS-3% BSA) ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง หรือที่ 4 °ซ นาน 10 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วย TBS ที่มี 0.05% Tween 20 (TTBS) นาน 10 นาที 3 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินใน TTBS-1% BSA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย TTBS นาน 10 นาที 3 ครั้ง บ่มด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเปอร์ออกซิเดส (anti-rabbit IgG peroxidase conjugate) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TTBS นาน 10 นาที 3 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย TBS นาน 10 นาที 2 ครั้ง จากนั้นย้อมด้วยสารละลาย 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ซึ่งมี 0.005% H_2O_2 เป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยา

2.8.2 **การตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนจากโอโอไซท์**

นำสารสกัดเมมเบรนจากโอโอไซท์ และสารสกัดโปรตีนโยล์คไปแยกด้วย SDS-PAGE สภาพไม่รีดิวซ์ จากนั้นขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลสตามวิธีข้อ 2.8.1 แล้วติดตามการขนถ่ายแถบโปรตีนบนแผ่นไนโทรเซลลูโลสโดยย้อมด้วยสี Ponceau S หลังจากล้างสีออกจนหมด นำไปบ่มใน TBS-3% BSA ที่อุณหภูมิห้องนาน

4 ชั่วโมง หรือที่ 4 °ซ นาน 10 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย TBS นาน 10 นาที 3 ครั้ง ตัดแบ่งแผ่นไนโทรเซลลูโลสออกเป็น 2 ส่วนที่เหมือนกัน เพื่อย้อมเปรียบเทียบกัน นำส่วนแรกไปตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนิน โดยบ่มแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน binding buffer (12.5 mM Tris-HCl, pH 8-25 mM NaCl-2 mM $CaCl_2$-1.6% BSA) ส่วนที่ 2 เป็นชุดควบคุมโดยนำไปบ่มใน binding buffer ที่ไม่มีไวเทลโลจีนินที่ 4 °ซ เมื่อครบ 16 ชั่วโมง นำแผ่นไนโทรเซลลูโลสทั้งสองส่วนล้างด้วย TBS จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินใน TBS-1% BSA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย TTBS นาน 10 นาที 3 ครั้ง บ่มด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเปอร์ออกซิเดสใน TTBS-1% BSA นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TTBS นาน 10 นาที 2 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย TBS นาน 10 นาที 2 ครั้ง จากนั้นย้อมด้วยสารละลาย DAB ตามวิธีข้อ 2.8.1