บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1. สารเคมีชนิดการวิเคราะห์ (Analytical grade)

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt (BCIP)	Sigma
Absolute ethanol	BDH
Acetic acid	J.T. Baker
Acrylamine	Fluka
Ammonium persulfate	Fluka
Bovine serum albumin(BSA)	Sigma
Brilliant blue R	Sigma
Chloroform	LAB-SCAN
Dithiothreitol(DTT)	USB
Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)	Merck
Glucose	Fluka
Glycerol	Fisher
Glycine	BDH
Hydrochloric acid	Merck
Magnesium chloride	Merck

สารเคมีชนิดการวิเคราะห์ (Analytical grade) ต่อ

Methanol	LAB-SCAN
N,N'-methylene-bis-acrylamide	Merck
Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)	Sigma
Potassium acetate	Merck
Potassium chloride	Fluka
Sodium acetate	Merck
Sodium azide	Fluka
Sodium chloride	LAB-SCAN
Sodium hydroxide pellets	BDH
Sodium Lauryl sulphate	Aps Ajax Finechem
Tris base	Fluka
Tryptone	Himedia
Tween 20	USB
Yeast extract	USB

1.2. สารเคมีชนิดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
100 bp DNA ladder	Promega
Agarose	Promega
Ampicilin	Sigma
Anti-human IgG conjugated Alkaline Phosphtase	Promega
*BamH*I	Promega
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTP)	Promega
*EcoR*I	Promega
Ethidium bromide	Sigma

สารเคมีชนิดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade) ต่อ

Glutathione sepharose 4 Fast Flow	GE-health care
Isopropyl β-D-thiogalacto-pyranosi(IPTG)	USB
Lysozyme	Sigma
*Not*I	Promega
QIAprep® Miniprep Kit	Qiagen
*Sal*I	Promega
T4 DNA Ligase	Promega
Taq DNA polymerase	Qiagen
Thrombin solution	Sigma
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system	Promega

2. แบคทีเรีย

Escherichia coli สายพันธุ์ Top 10 F' มีลักษณะ Genotype: F' (Tet^r), mcrA delta (mrr-hsdRMS-mcrBC), phi 80 delta lac delta M15, delta lacX74deoR, recA1, araD139, delta (ara, leu) 7697, galU, galK, lambda$^-$, rpSL (str^r) endA1, nupG จากบริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

Escherichia coli สายพันธุ์ BL21 มีลักษณะ Genotype: F^- ompT, $hsdS_B$ (r_{B-} , m_{B-}), gal, dcm จากบริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

Burkholderia pseudomallei ยังไม่มีการระบุสายพันธุ์ แยกได้จากผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส หน่วยจุลชีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. ดีเอ็นเอพาหะ

pGEM®-T Easy บริษัท Promega

pGEX-4T-1 บริษัท GE-Health Care

4. ดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้นๆ (Oligonucleotide primer)

Primers name	Forverse primer	Reverse primer
Bp7	CGGATCCATGCAACTGATCGAAG	GGGTACCACGGCCGGATGCGTT
bipD	CGGATCCATGAACATGCATGTCG	GCGGCCGCTCAGATCTGCAG
Bp3 Sc1	GGATCCATGCGCTAGTGGCTGAT	CGAATTCTCACTTCATCAGGCGCT
Bp3 Sc2	GGATCCATGACGAAAAAATCCGC	GTCGACTCACTTCATCTGCACCGA

5. ตัวอย่างซีรัม

ตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้ ซีรัมจากผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส 27 ตัวอย่าง และซีรัมจากผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเมลิออยโดซิส 90 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ 46 ราย ซีรัมของผู้ที่ไม่ได้ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ 24 ราย และซีรัมจากผู้บริจาคเลือด 20 ราย

อุปกรณ์

หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์สำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น 2200 C SCS (Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 (Mettler Toledo)

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น Lambda 25 (Perkin Elmer)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (BIO – RAD)

เครื่องหมุนแรงเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (SORVALL-Pico)

เครื่องหมุนแรงเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น RC 5B (SORVALL)

เครื่องเขย่าแบบตั้งโต๊ะ The Belly Dancer (STOVALL)

เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex – 2 GENIE (Scientific Industries)

เครื่องจ่ายกระแสไฟ Power Supply รุ่น 1000/500 (BIO – RAD)

เครื่อง Horizblot electrophoresis transfer รุ่น AE – 6675 & AE – 6675L (ATTO)

ตู้ Laminar flow รุ่น Nu – 425 – 400E (NUAIRE)

เครื่องวัด pH (Cyberscan)

ตู้บ่มเชื้อ (Heraeus)

ตู้แช่แข็ง – 70°C (SANYO ULTRA FLOW)

ตู้แช่แข็ง – 20°C (SANYO)

ตู้แช่เย็น (SANYO)

เครื่องผลิตคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator)

หม้อนึ่งความดันรุ่น HA – 300MII (Fourday)

ตู้อบแห้ง (Labline)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง UV รุ่น Ultraspec III (Pramacia)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Gene Amp® PCR System 9700)

Nitrocellulose membrane (BioTrace®NT)

กระดาษกรองเบอร์ 3 (Whatman®)

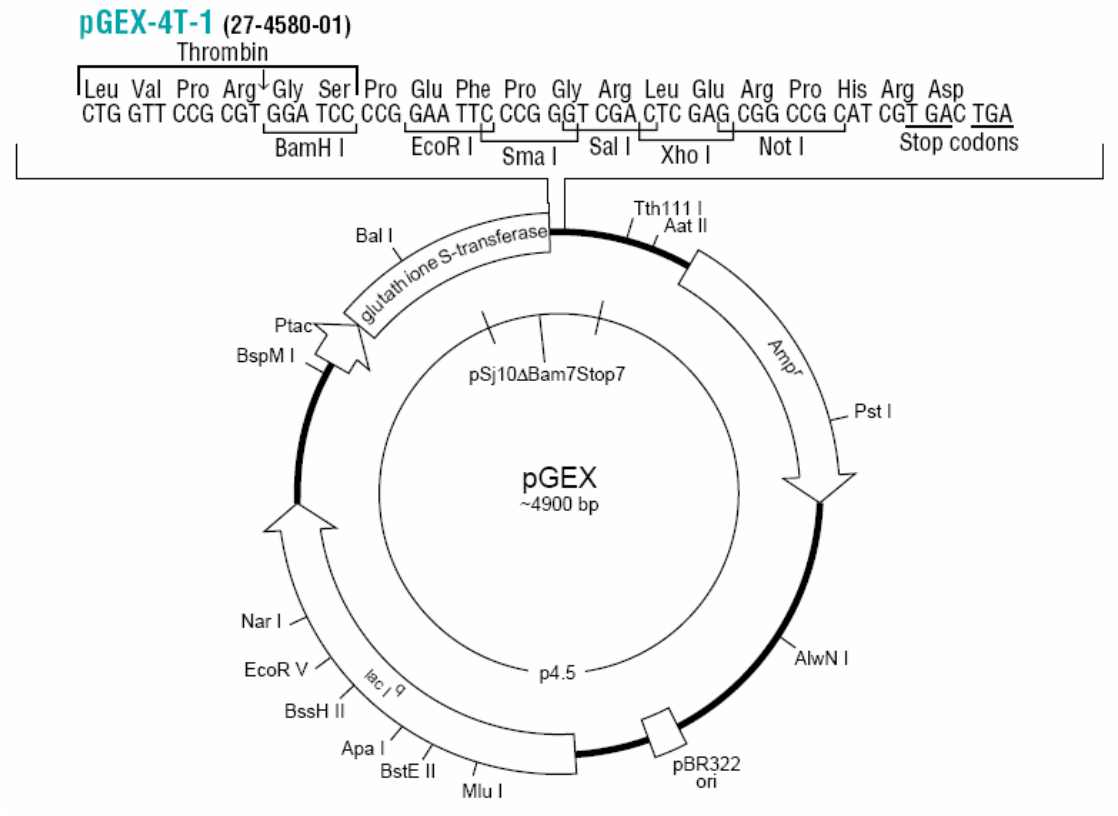
วิธีการวิจัย

1. การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *B. pseudomallei*

นำโคโลนีเดี่ยวๆ ของ *B. pseudomallei* (หน่วยจุลชีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) จากอาหารวุ้นไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว (LB broth) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชม. จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปหมุนเหวี่ยง 17,100 g นาน 2 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ต้องการ เทน้ำเลี้ยงเซลล์ทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาทำให้เซลล์แตก ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ TE 567 µl, 10% SDS 30 µl, protease K 3 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชม. หลังนั้นเติม 5 M NaCl 100 µl และ CTAB/NaCl 80 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน เมื่อครบเวลานำสารละลาย มาแยกโปรตีนออกด้วยการเติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol ลงไป 1 เท่าของสารละลาย (780 µl) จากนั้นผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 17,100 g นาน 10 นาที สารละลายที่ได้จะแยกชั้น ดูดสารละลายใสส่วนบนไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม Isopropanol 0.6 เท่าของสารละลายที่ดูดขึ้นมาได้ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 17,100 g นาน 10 นาที เท Isopropanol ทิ้ง แล้วล้างตะกอน DNA ที่ได้ด้วย 70% EtOH 500 µl นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 17,100 g นาน 10 นาที เท EtOH ทิ้ง จากนั้นทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย น้ำที่ไม่มีไอออน (DI water) ตามความต้องการ หาปริมาณ DNA ที่ได้ด้วยการวัด O.D. ที่ 260 nm. และหาปริมาณโปรตีนที่ปนเปื้อนโดยวัด OD. ที่ 280 nm. และตรวจสอบคุณภาพ DNA ที่ได้โดยการทำ gel electrophoresis

2. การเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ โดยใช้ Primer ที่ออกแบบแสดงในตารางที่ 4 โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แสดงอยู่บน pGEX 4T-1 vector ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 Expression vector (pGEX-4T-1) ที่ใช้ในการทดลอง แสดงตำแหน่ง fusion protein (Glutathione S-transferase: GST) และตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะของเวคเตอร์ ที่ใช้ในการแทรกยีนที่ต้องการ

ตารางที่ 4 แสดง Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนทั้ง 4 ชนิดในการทดลอง

Primers name			Size(bp)
Bp7	Forverse primer	*Bam*HI CGGATCCATGCAACTGATCGAAG	813
	Reverse primer	*Eco*RI GGGTACCACGGCCGGATGCGTT	
BipD	Forverse primer	*Bam*HI CGGATCCATGAACATGCATGTCG	933
	Reverse primer	*Not*I GCGGCCGCTCAGATCTGCAG	
Bp3 Sc1	Forverse primer	*Bam*HI GGATCCATGCGCTAGTGGCTGAT	462
	Reverse primer	*Eco*RI CGAATTCTCACTTCATCAGGCGCT	
Bp3 Sc2	Forverse primer	*Bam*HI GGATCCATGACGAAAAAATCCGC	738
	Reverse primer	*Sal*I GTCGACTCACTTCATCTGCACCGA	

สารละลายที่ใช้ประกอบด้วย DI water 11 µl, 10x PCR buffer 5 µl, 5 mM dNTP 2 µl, 25 mM $MgCl_2$ 3 µl, 50 pmol Forward primer 2 µl, 50 pmol Reverse primer 2 µl, 100 ng/µl DNA template 1 µl และ 2.5 unit Taq DNA polymerase 1 µl ผสมส่วนสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน และใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้ ที่ initial denaturation 95 °C 5 นาที 1 รอบ, denaturation 95 °C 15 วินาที, annealing 45 °C 30 วินาที และ extension 74 °C 90 วินาที 30 รอบ และ extension 74 °C 15 นาที 1 รอบ และตรวจสอบผล PCR ที่ได้โดยการทำ gel electrophoresis สภาวะการทำปฏิกิริยาดังกล่าว ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *Bp7*, *bipD*, *Bp3Sc1* และ *Bp3Sc2*

3. สร้างพลาสมิดลูกผสมโดยใช้เวคเตอร์ pGEM T-easy® เพื่อตรวจหาลำดับเบสที่อยู่บนสาย DNA (แสดงในรูปที่ 8)

นำผลผลิตที่ได้จาก PCR ไปทำ gel electrophoresis จากนั้นแบ่งเจลส่วนหนึ่งไปย้อม EtBr เพื่อใช้เปรียบเทียบกับเจลที่ไม่ได้ย้อม โดยตัดตรงส่วนที่เป็นยีนที่ต้องการ เมื่อเทียบกับเจลที่ย้อม EtBr นำเจลที่ตัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Wizard® SV Gel (Promega®) หาปริมาณ DNA ที่ได้ด้วยการวัด OD. ที่ 260 nm.

ยีนที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้เอนไซม์ Taq polymerase ปลายสาย DNA จะมีเบส A ยื่นออกมา ซึ่งสามารถเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pGEM T-easy® ซึ่งมีเบส T ยื่นออกมาที่ปลายสาย DNA ด้วยเอนไซม์ ligase ได้ทันที โดยสารละลายมีส่วนผสม ดังนี้ DI water 10.5 µl, 10x ligation buffer 1 µl, เวคเตอร์ pGEM T-easy® 0.5 µl, DNA 7 µl และ T4 DNA ligase 1 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มอุณหภูมิที่ 4 °C เป็นเวลา 16-24 ชม.

จากนั้นดูดสารละลายที่มีพลาสมิดลูกผสมข้างต้น ใส่ลงในสารละลาย competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 90 วินาที ครบเวลานำออกมาแช่ในน้ำแข็งทันที 5 นาที จากนั้นเติมน้ำเลี้ยง LB broth 800 µl นำไปบ่ม โดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 ชม. ครบเวลานำสารละลายเซลล์ที่ได้ 50-150 µl ไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB agar ที่เติม 80 µg/ml ampicillin บ่มที่ 37 °C นาน 16-18 ชม.

นำโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงดังกล่าว มาเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหาร LB broth ที่เติม 80 µg/ml ampicillin บ่มที่ 37 °C นาน 16-18 ชม. นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 9,500 g 1 นาที เทน้ำเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมสารละลาย I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0 และ 10mM EDTA) ลงไป 100 µl ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย II (0.2N NaOH, 1% SDS) 200 µl ผสมให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติมสารละลาย III (5 M Potassium

acetate, glacial acetic acid) 300 µl ผสมให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที นำหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็ว 14,000 g 15 นาที ดูดส่วนใส่ในหลอดใหม่ เติม Isopropanol 1 เท่าของปริมาตร ตั้งทิ้งให้ตกตะกอน ที่ -20 °C นาน 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g 15 นาที เท ส่วนใส่ทิ้ง แล้วล้างตะกอน DNA ที่ได้ด้วย 70% EtOH 500 µl นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g นาน 5 นาที เท EtOH ทิ้ง จากนั้นทำให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย น้ำปราศจากอิออน ตามความต้องการ และตรวจสอบพลาสมิด ที่ได้โดยการทำ gel electrophoresis เปรียบเทียบกับเวคเตอร์ที่ไม่มีชิ้นยีน รวมไปถึงตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งชิ้นยีนที่สอดแทรกเข้าไปในเวคเตอร์ pGEM T-easy จะเชื่อมต่อกันตรงลำดับเบส *Eco*Rl มีสารละลายดังนี้ พลาสมิด 2 µl, 10x buffer H 2 µl, *Eco*Rl 0.5 µl, DI water 15.5 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน ตรวจสอบผล โดยการทำ gel electrophoresis

นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งไปตรวจสอบลำดับเบสดีเอ็นเอในยีน ด้วยเครื่อง ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems) นำผลการหาลำดับเบสที่ได้ ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastx และเทียบกับสายยีนเต็มด้วยโปรแกรม ClutalX และGendoc

4. สร้างพลาสมิด (pGEX 4T-1) ลูกผสม เพื่อแสดงออกโปรตีนจากยีนที่สนใจ (แสดงในรูปที่ 8)

4.1. โคลนพลาสมิดลูกผสมเข้าเซลล์เจ้าบ้าน

นำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จากข้อ 3 ซึ่งผ่านการตรวจสอบแล้วว่าเป็นพลาสมิดลูกผสม pGEM T-easy มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ออกแบบไว้ใน primer ของยีนแต่ละยีน (ดังตารางที่ 4) และพลาสมิด pGEX 4T-1 จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกับที่ตัดในพลาสมิด ลูกผสม pGEM T-easy จากนั้นตรวจสอบผลการตัดจำเพาะ ด้วย gel electrophoresis โดยเทียบกับ พลาสมิด pGEX 4T-1 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ และ100 base pair marker

ทำบริสุทธิ์สารละลาย DNA(ชิ้นยีน และ/หรือพลาสมิดที่ต้องการ) ด้วย Wizard® SV Gel (Promega®) หรืออาจนำพลาสมิดที่ต้องการมาตกตะกอน DNA ด้วยเกลือโซเดียมอะซิเตต โดยเติม 3 M sodium acetate ลงไป 0.1 เท่าของสารละลาย DNA จากนั้นเติม absolute EtOH 2.5 เท่าของสารละลาย นำไปตกตะกอนที่ –70°C นาน 30 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ 10,000 g 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70% EtOH 500 µl ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 g 10 นาที แล้วทำให้ตะกอนแห้ง

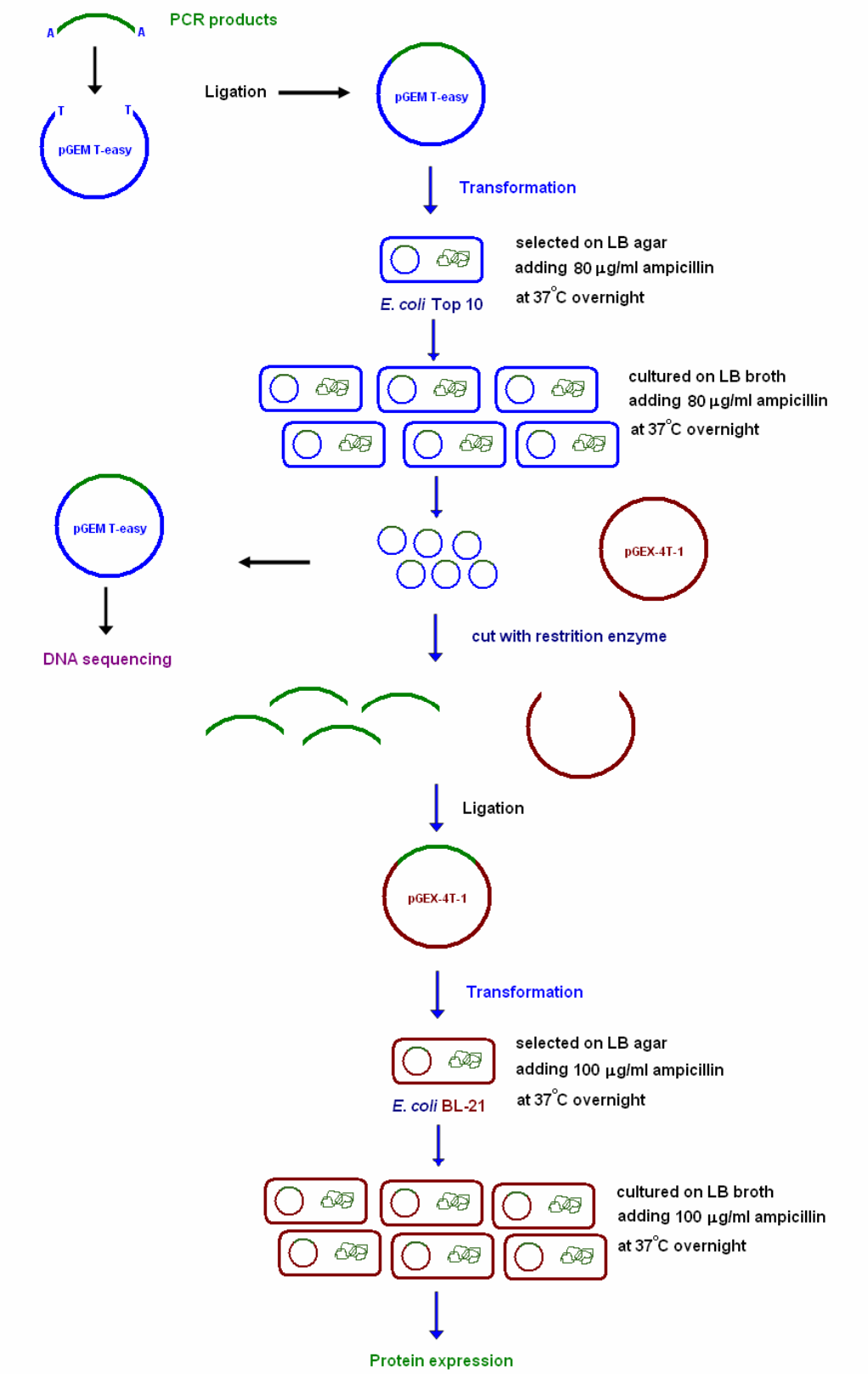
ชิ้นยีน และเวคเตอร์ (pGEX 4T-1) จะถูกนำมาเชื่อมต่อกัน ด้วยเอนไซม์ไลเกส (ligase) โดยใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3 และนำสารละลายที่มีพลาสมิดลูกผสม

เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*: BL-21 ด้วยสภาวะเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3 และคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEX ด้วย 100 μg/ml ampicillin ในอาหาร LB agar

4.2. ตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่อยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน

การตรวจสอบเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*: BL-21 ว่ามีชิ้นยีนในพลาสมิดลูกผสม จะใช้วิธี PCR โดยใช้สภาวะเดียวกับข้อ 2 โดยมีขั้นตอนดังนี้

เลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์โดยเขี่ยโคโลนีจากข้อ 4.1 ลงในอาหาร LB-broth 1 ml ที่เติม 100 μg/ml ampicillin บ่มที่ 37 ^{o}C นาน 16-18 ชม. นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 9,500 g 1 นาที เทน้ำเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปราศจากอิออน 100 μl ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็น จากนั้นปั่นตกตะกอนกากเซลล์ แล้วดูดสารละลายใสไปใช้ทำ PCR ต่อไป โดยใช้องค์ประกอบของ PCR เช่นเดียวกับข้อ 2 พร้อมทั้งทำ PCR กับเซลล์เจ้าบ้านที่มีแต่ พลาสมิดเปล่าๆ เพื่อควบคุมการทำ PCR ไปด้วย



รูปที่ 8 แสดงขั้นตอน การสร้างพลาสมิดลูกผสม pGEM T-easy และ pGEX-4T-1 อธิบายสรุปในหัวข้อ 3 และ 4

5. การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม (Fusion protein) ในแบคทีเรียและการทำบริสุทธิ์

5.1. การแสดงออกโปรตีนลูกผสม ใน *E. coli* BL-21

นำโคโลนีที่ตรวจสอบว่ามีชิ้นยีนจากข้อ 4.2 ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนใน LB broth ที่เติม 100 µg/ml ampicillin บ่มที่ 37 °C นาน 16-18 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน LB broth (โดยใช้ปริมาตร 1:10) เลี้ยงต่อไปจนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm อยู่ในช่วง 0.5-0.7 (ประมาณ 1-1.5 ชม.) แล้วแบ่งน้ำเลี้ยงเซลล์ออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้ ตัวอย่างที่ไม่เติม 1mM IPTG และตัวอย่างที่เติม 1mM IPTG พร้อมกันนี้ก็ได้ทำชุดควบคุมอีกชุดคือ เซลล์ *E. coli*: BL-21 ที่มีเวคเตอร์ pGEX แต่ไม่มีชิ้นยีนโดยแบ่งเป็นสองชุดเช่นกันคือ ตัวอย่างที่ไม่เติม IPTG และตัวอย่างที่เติม IPTG นำไปบ่มประมาณ 3-4 ชม. เพื่อเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีน และนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 g นาน 10 นาที จากนั้นเทน้ำเลี้ยงทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้ มาเติม lysis buffer 200 µl ต่อน้ำเลี้ยงเซลล์ 1 ml และ lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mg/ml บ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียง (sonicator) 6 ครั้งๆ ละ 10 วินาที (250 W) (สารละลายเซลล์จะต้องเย็นตลอดเวลา) นำสารละลายที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 g ที่ 4°C นาน 20 นาที ดูดสารละลายโปรตีนส่วนที่ละลายใน lysis buffer เก็บไว้ (ส่วนที่ละลาย; soluble) และละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย phosphate buffer (PBS) ตามความต้องการ (เก็บส่วนที่ไม่ละลาย; insoluble) เก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ในตู้ –20° C เพื่อตรวจสอบโปรตีนที่ได้ด้วยการทำ SDS-PAGE และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี lowry (Lowry et al., 1951)

5.2. การทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม (Fusion protein)

5.2.1. ทำบริสุทธิ์ด้วย Glutathione-s-transferase bead (GST-bead)

บ่มโปรตีนเซลล์ กับ GST-bead ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 180 g 10 นาที ดูดโปรตีนที่ไม่ได้จับกับเม็ด bead ออก จากนั้นล้างเม็ด bead ด้วย PBS buffer ทั้งหมด 10 ครั้งโดยแต่ละครั้งใช้ปริมาณบัฟเฟอร์ 10 ml ต่อปริมาณเม็ด bead 1 ml หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 180 g เป็นเวลา 10 นาที ชะโปรตีนลูกผสมที่จับกับ bead ออกโดยใช้ elution buffer (20 mM reduced glutathione + 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 1 ml บ่ม

ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาหมุนเหวี่ยงเม็ด bead ลง ด้วยความเร็ว 180 g ใช้เวลา 5 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้ ทำการชะโปรตีนซ้ำอีก 2 ครั้ง ตรวจสอบผลการทำบริสุทธิ์ด้วย 12% SDS-PAGE

เพื่อหาปริมาณโปรตีนลูกผสมที่ทำบริสุทธิ์ จะต้องกำจัด glutathione ออกโดยวิธี dialysis ด้วย 25 mM Tris buffer pH 7.5 นำโปรตีนลูกผสมที่ได้ จากการทำบริสุทธิ์ใส่ในถุง dialysis ที่มีขนาดตัดมวลโมเลกุล 12,000 kDa โดยใช้ปริมาตรของ buffer เป็น 4000 เท่าของปริมาตรโปรตีนขึ้นไป ใช้เวลา dialysis อย่างน้อย 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4° C โดยเปลี่ยน buffer ทุกๆ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

5.2.2. การตัดโปรตีนเชื่อมต่อ (Glutathione-s-transferase) ออกด้วย thrombin

บ่มโปรตีนเซลล์ กับ GST-bead ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 180 g 10 นาที ดูดโปรตีนที่ไม่ได้จับกับเม็ดbead ออก จากนั้นล้างเม็ดbead ด้วย PBS buffer ทั้งหมด 10 ครั้งโดยแต่ละครั้งใช้ปริมาณบัฟเฟอร์ 10 ml ต่อปริมาณเม็ดbead 1 ml หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 180 g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม PBS buffer 1 ml ลงไป ปริมาตรรวมก็จะเป็น 2 ml จากนั้นเติม thrombin 15 µl (1 µg/ml) ลงใน beads บ่มที่อุณหภูมิ 25° C นาน 12-16 ชม. ปั่นตกที่ความเร็ว 180 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสเก็บไว้ และเติม PBS buffer 1 ml ลงไปผสมให้เข้ากัน ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ตรวจสอบผลการตัดโปรตีน GST ด้วย 12% SDS-PAGE และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry โดยหักลบกับปริมาณ thrombin ที่มีอยู่ในสารละลาย

หลังจากที่ตัดโปรตีนที่ต้องการออกไปแล้ว จะเหลือโปรตีน GST ที่ยังจับกับ bead อยู่ จึงชะโปรตีน GST ออกด้วย elution buffer เหมือนดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทดสอบโปรตีนที่ผลิตได้ กับตัวอย่างซีรัมเลือดผู้ป่วยด้วยโรค เมลิออยโดซิส

5.2.3. ทำบริสุทธิ์ด้วย Gel extraction

นำสารละลายโปรตีนลูกผสม มาแยกด้วย 12% SDS PAGE จากนั้นตัดเจลส่วนหนึ่งไปย้อมสีตามปกติ ส่วนเจลที่เหลือนำไปแช่ใน running buffer เมื่อย้อมเจลเสร็จแล้ว ให้นำเจลที่ย้อมมาเทียบกับเจลที่ไม่ได้ย้อมจากนั้นตัดเจลตรงส่วนที่มีโปรตีนที่ต้องการโดยเทียบกับเจลที่ย้อมสี เมื่อตัดเจลเสร็จแล้ว ให้นำเจลที่ตัดได้ล้างด้วย PBS buffer จากนั้นใส่ลงใน dialysis bag (12 kDa cut-off) พร้อมกับเติม PBS buffer ลงไป 2 ml ปิดปากถุงให้สนิทโดยให้มีฟองอากาศเหลือน้อยที่สุด

จากนั้นนำไปแยกโปรตีนออกจากเจลด้วยวิธี gel electrophoresis (120 volt 1 hr) เสร็จแล้วให้ดูดเอาสารละลายโปรตีนในถุงออกมา แล้วนำไป dialyze แยกเอา SDS ด้วย 20 mM Tris pH 7.5 จากนั้นตรวจสอบผลการทำบริสุทธิ์ด้วย 12% SDS-PAGE และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

6. เตรียมซีรัมที่ถูกดูดซับด้วย สารละลายเซลล์ *E. coli* (BL-21)

เตรียมสารละลายเซลล์ ด้วยการเพิ่มจำนวน *E.coli*: BL-21 ที่มี vector pGEX ใน LB broth ที่เติม 100 µg/ml ampicillin บ่มที่ 37 ^{o}C นาน 16-18 ชม. จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 g นาน 20 นาที เทน้ำเลี้ยงทิ้ง เติม TBS buffer pH 7.4 ลงไป 3 ml จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยการนำไปแช่ที่ –70^{o} C นาน 10 นาที และทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำ 6 ครั้ง และต่อด้วยการใช้ sonicator 6 ครั้งๆ ละ 10 วินาที (250 W) นำสารละลายเซลล์ที่ได้ ไปเคลือบบน nitrocellulose membrane ทิ้งให้แห้ง จากนั้น บ่มเมมเบรนใน 2% skim milk ใน TBST (TBS + 0.02% Tween20) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชม. ล้างเมมเบรน ด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วนำแผ่น membrane ที่ได้ไปบ่มกับ ซีรัมที่ได้ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เพื่อแยกเอาแอนติบอดี ที่จำเพาะกับ *E.coli*: BL-21 ออกไป ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง นำซีรัมที่ได้เจือจาง 1:2000 กับ 0.02% sodium azide ใน TBST และเก็บที่ 4^{o} C จนกว่าจะนำไปใช้

7. ตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนลูกผสม

โปรตีนลูกผสมที่จะทดสอบขั้นแรกต่อซีรัมรวม (pooled serum) ใช้ปริมาณโปรตีนรวม 42 µg/µl สำหรับการหาความไว และความจำเพาะ ใช้ปริมาณโปรตีนบริสุทธิ์ 6 µg/µl โดยนำโปรตีนมาแยกด้วย 12% SDS-PAGE ใช้กระแสไฟฟ้า 90 volts นาน 2 ชม. แบ่งเจลที่ได้จาก SDS-PAGE ออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่หนึ่งนำไปย้อมดูโปรตีน และส่วนที่สองนำไปย้ายโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane ด้วยเครื่องถ่ายโปรตีน โดยใช้กระแสไฟฟ้า 140 mA นาน 3 ชม. นำแผ่นเมมแบรน บ่มใน 2% skim milk ใน TBST โดยเขย่าสารละลายตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชม. ล้างเมมเบรน ด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำแผ่นเมมเบรน ไปบ่มกับ primary antibody (ซีรัม) เจือจาง 1:2,000 กับ TBST (สำหรับการทดสอบขั้นตอนแรกต่อซีรัมรวม) เป็นดังนี้ ตัวอย่างซีรัมจะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ ซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ เมลิออยโดซิส ที่ไม่ได้ดูดซับด้วยสารละลายเซลล์ *E. coli*, ซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ เมลิออยโดซิส ที่ดูดซับด้วยสารละลายเซลล์ *E. coli*, ซีรัมจากคนปกติที่ดูดซับด้วยสารละลายเซลล์ *E. coli* และซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ดูดซับด้วย

สารละลายเซลล์ *E. coli* บ่มนาน 1 ชม. บ่มโดยเขย่าสารละลายตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง ล้างเมมเบรนด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำแผ่นเมมเบรน ไปบ่มกับ secondary antibody (anti-human IgG conjugated alkaline phosphatase) ที่เจือจาง 1:25,000 กับ TBST บ่มโดยเขย่าสารละลายตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชม. ล้างเมมเบรนด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม substrate ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที แล้วสังเกตผลด้วยตาเปล่า ถ้าเกิดแถบสีจำเพาะ (เปรียบเทียบกับ แผ่นที่ทดสอบกับซีรัมเมลิออยโดซิส) ให้ผลเป็นบวก และไม่เกิดแถบสีให้ผลเป็นลบ โปรตีนลูกผสมที่ให้ผลบวกกับตัวอย่างซีรัมรวมของผู้ป่วยที่เป็นโรค เมลิออยโดซิส และให้ผลลบกับตัวอย่างซีรัมควบคุมซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มดังนี้ กลุ่มตัวอย่างที่มาจากผู้บริจาคเลือด และกลุ่มตัวอย่างของผู้ป่วยด้วยโรคติดเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ใช่เชื้อ *B. pseudomallei* จะนำมาตรวจสอบ กับซีรัมแต่ละราย เพื่อหาความไว และความจำเพาะของโปรตีน ต่อการนำไปใช้เพื่อการตรวจโรค เมลิออยโดซิส วิธีคำนวณแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการคำนวณความไว และความจำเพาะของโปรตีนต่อการตรวจโรค (ดัดแปลงจาก Wild, 2001)

ผลการทดสอบ	สภาพการเป็นโรค	
	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
ผลเป็นบวก	A	B
ผลเป็นลบ	C	D
รวมทั้งหมด	A+C	B+D

ความไว = A/(A+C)

ความจำเพาะ = D/(B+D)