ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 (stock solution)

- L-15 (Gibco laboratories)	13.7	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ผงสำเร็จในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ปรับ pH = 7.6 ด้วยสารละลายกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 1 นอมอล เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร กรองผ่านเมมเบรน (membran) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู (pore size) 0.22 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15-10 (working medium)

- L-15 (stock solution)	89	มิลลิลิตร
- ซีรัม (FBS)	10	มิลลิลิตร
- pen-streptomycine ความเข้มข้น 10,000 IU	1	มิลลิลิตร

ใส่ซีรัมและยาปฏิชีวนะก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH = 7.6 ด้วยสารละลายกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 1 นอมอล หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอมอล

3. สารละลายเวอร์ซีน (versene solution)

- NaCl	8.0	กรัม
- KH_2PO_4	0.2	กรัม
- KCl	0.2	กรัม
- Na_2HPO_4	1.15	กรัม
- disodium versenate (EDTA disodium salt)	0.2	กรัม
- phenal red เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์	2.0	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เตรียมโดยละลายสารในน้ำกลั่น แบ่งสารละลายขวดละ 100 มิลลิลิตร ก่อนฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติมฟีนอลเรด 0.2 มิลลิลิตรต่อขวด เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายทริปซิน (trypsin) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (stock solution)

- trypsin (1:250)	2.5	กรัม
- glucose	5.0	กรัม
- versene solution	100	มิลลิลิตร

เติมกลูโคสลงในสารละลายเวอร์ซีน เติมทริปซินและกวนด้วยแท่งแม่เหล็กนาน 18-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองผ่านเมนเบรนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดๆ ละ 4 มิลลิลิตร แช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

5. สารละลายทริปซิน-เวอร์ซีน (trypsin–versene) (working solution)

เติมสารละลายทริปซินความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (stock solution) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเวอร์ซีน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH = 7.2-7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 3.75 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กรองผ่านเมนเบรนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.22 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. สารละลาย Hank's balance salt (HBSS)

- HBSS	7.8	กรัม
- pen-streptomycin	1.0	มิลลิลิตร
- $NaHCO_3$ เข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์	5.0	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลาย HBSS สำเร็จรูปในน้ำกลั่นกรองผ่านเมมเบรนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.22 ไมครอน เติมสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตและยาปฏิชีวนะ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. อาหารเลี้ยงเซลล์แช่แข็ง (freezing medium)

- L-15 (stock solution)	2.0	มิลลิลิตร
- ซีรัม	0.4	มิลลิลิตร
- DMSO	0.6	มิลลิลิตร

เตรียมส่วนผสมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง อัตราส่วนที่ใช้ต่อสารละลายเซลล์เท่ากับ 1:1

9. การศึกษาจำนวนโครโมโซม ตามวิธีการของ Earley (1975)

9.1. เตรียมเซลล์อายุ 22 ชั่วโมง (log phase) ในฟลาสต์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร

9.2. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และเติมสารละลายโคลชิซิน (colchicine)ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

9.3. ย่อยเซลล์ด้วยสารละลายเอนไซม์ทริปซิน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมในสารละลาย PBS ก่อนตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 1,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที

9.4. ล้างเซลล์อีกครั้งด้วยสารละลาย HBSS ก่อนตกตะกอนซ้ำและละลายเซลล์ ในสารละลาย HBSS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

9.5. เติมสารคงสภาพโครโมโซม (chromosome fixative) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนตกตะกอนและเปลี่ยนสารคงสภาพโครโมโซมซ้ำอีกครั้ง

9.6. เตรียมเซลล์ลงบนแผ่นสไลด์ ซึ่งแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส ก่อนทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

9.7. ย้อมโครโมโซมด้วยสีย้อม mix Gimsa, pH 7.2 โดยนำสไลด์ในข้อ 9.6 แช่ในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 นอมอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งทิ้งให้แห้ง ย้อมด้วยสีย้อม mix Gimsa ประมาณ 1 นาที ก่อนล้างด้วยน้ำกลั่นและผึ่งให้แห้ง ก่อนเตรียมสไลด์ถาวร

การเตรียมสารคงสภาพโครโมโซม (chromosome fixative)

- glacial acetic acid	1	ส่วน
- methanol	3	ส่วน

ผสมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสีย้อม mix Gimsa , pH 7.2

- น้ำกลั่น	91	มิลลิลิตร
- ammonium hydroxide เข้มข้น 0.15 โมล	3	มิลลิลิตร
- Gimsa stain	6	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน ปรับ pH = 7.2

นำ 40 หยดของสารละลายข้างต้น เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ควรผสมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

10. การตรวจสอบการปนเปื้อนของไมโคพลาสมา ตามวิธีการของ Cheng (1975)

10.1. เตรียมเซลล์อายุ 24 ชั่วโมงบนแผ่นปิดสไลด์ (cover slide) 4-6 แผ่น

10.2. ตรึง (fix) เซลล์ด้วยสารคงสภาพคาร์นอย (Carnoy's fixative) เป็นเวลา 5-10 นาที ก่อนตรึงซ้ำอีกครั้ง 5-10 นาที ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

10.3. ย้อมด้วยสารละลายบิสเบนซาไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนนำไปเตรียมบนแผ่นสไลด์

10.4. ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีเลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

สารคงสภาพคาร์นอย (Carnoy's fixative)

- glacial acetic acid	1	ส่วน
- methanol	3	ส่วน

ผสมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

11. สีย้อมทริพเพนบลู (trypan blue) เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์

trypan blue	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายสีในน้ำกลั่น กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เมื่อละลายหมดกรองด้วยกระดาษกรองก่อนนำไปใช้ โดยสีย้อมมีคุณสมบัติในการย้อนติดสีเฉพาะเซลล์ที่ตายแล้วเท่านั้น

อัตราการใช้ สารละลายเซลล์ 0.2 มิลลิลิตร เจือจางในสารละลาย HBSS 0.3 มิลลิลิตร เติมสีย้อม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5-15 นาที (ค่าการเจือจางเท่ากับ 5)

12. สารละลายโซเดียมคาโคไดเลตบัฟเฟอร์ (sodium cacodylate buffer) เข้มข้น 0.1 โมล, pH 7.4

sodium cacodylate	21.4	กรัม
sucrose	55.0	กรัม
$CaCl_2 . 2H_2O$	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายสารโซเดียมคาโคไดเลต ในน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร ปรับ pH = 7.4 ด้วยสารละลายกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 1 โมล เติมน้ำตาลซูโครสและสารแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ตามลำดับ กวนด้วยแท่งแม่เหล็กจนละลายหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตรครบ 1 ลิตร ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13. สารละลายกลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย โซเดียม คาโคไดเลตบัฟเฟอร์

glutaraldehyde	2.5	มิลลิลิตร
cacodylate buffer	97.5	มิลลิลิตร

เติมสารละลายผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

14. สารละลายทีเอ็นอีบัฟเฟอร์ (TNE buffer : 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)

tris-HCl	7.88	กรัม
NaCl	8.766	กรัม
EDTA	0.37224	ลิตร

เติมสารให้ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 750 มิลลิลิตร แต่ละตัวจนละลายได้หมด ปรับค่า pH = 7.5 ด้วยสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 1 โมล หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมล แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

15. สารละลายซูโครส (sucrose) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v)ในสารละลายทีเอ็นอีบัฟเฟอร์

ละลายซูโครส 10 กรัมในสารละลายทีเอ็นอีบัฟเฟอร์ (ข้อ 14) เติมให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

16. สารละลายซูโครส (sucrose) เข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลายทีเอ็นอีบัฟเฟอร์

ละลายซูโครส 60 กรัมในสารละลายทีเอ็นอีบัฟเฟอร์ (ข้อ 14) เติมให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

17. การคำนวณปริมาณเซลล์

ปริมาตร 1 ช่องของสไลด์นับเม็ดเลือด = 0.1 มม^3.

ดังนั้นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เฉลี่ย x ค่าการเจือจาง x 10^4

จำนวนเซลล์ทั้งหมด = จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร x ปริมาณสารละลาย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี)}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (ติดสีและไม่ติดสี)}} \times 100$$

18. การคำนวณค่า $TCID_{50}$

= ความเข้มข้นที่ไวรัสเข้าทำลายเซลล์มากกว่า 50% + $\frac{\text{ค่าที่มากกว่า 50\% - 50\%}}{\text{ค่าที่มากกว่า 50\% - ค่าที่น้อยกว่า 50\%}}$

$= 4 + \frac{7.5 - 50}{75 - 0}$

$= 4.33$

คำนวณ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร

ปริมาณสารที่ใช้ทดสอบ = 100 ไมโครลิตร

คำนวณต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร = 1000/100 = 10 เท่า

log 10 = 1

ดังนั้น $TCID_{50}$/มิลลิลิตร = 4.33 + 1 = 5.33

19. การคำนวณค่า multiplicity of infection (MOI)

ปริมาณเซลล์ทั้งหมด = 1×10^6 เซลล์/ 5 ml ($25\ cm^2$)

ความเข้มข้นของเชื้อ SIV ($TCID_{50}$/ml) = $10^{5.3}$

ปริมาตรทั้งหมด 0.5 ml. = $0.5 \times 2 \times 10^5$ / 5 ml flask

= 10^5 / 5 ml flask

infection unit /cell = $10^5 / 10^6$

MOI = 0.1

ซึ่ง MOI = 0.1 หมายถึงอัตราการเข้าทำลายของไวรัส 1 อนุภาคต่อเซลล์ 10 เซลล์

20. การวัดปริมาณโปรตีน ดัดแปลงจากวิธีการของ Lowry *et al* (1951)

20.1. 1N-folin-phenol reagent

20.2. working alkaline copper reagent

solution A.	Na_2CO_3	20	กรัม
	NaOH 0.1 N	100	มิลลิลิตร
solution B.	$CuSO_4.5H_2O$	0.5	กรัม
	sodium tartrate 1%	100	มิลลิลิตร

นำ solution A. ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ solution B. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

สารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ผสมรวมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร เติม working alkaline copper reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติม folin reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 640 นาโมเมตร เปรียบเทียบค่ากับแอลบูมินมาตรฐาน (standard albumin) ที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้แบลงค์ (blank) ที่เตรียมขึ้นตามขั้นตอนนี้แต่ไม่เติมสารละลายตัวอย่าง

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของซีรัมโปรตีน

1. ดูดสารละลายมาตรฐานแอลบูมิน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรตามลำดับ
2. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 0.9, 0.7, 0.5, 0.3, 0.1 และ 0 ตามลำดับ จะได้ความเข้มข้นของแอลบูมินในแต่ละหลอดเท่ากับ 50, 150, 250, 350, 450 และ 500 ไมโครกรัม ตามลำดับ
3. นำสารละลายแอลบูมินแต่ละหลอด มาทำตามขั้นตอนของการหาโปรตีนจากตัวอย่างดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น
4. นำค่าความเข้มข้นของแอลบูมิน และค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ความเข้มข้นอยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในแกน Y หาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนรวมในตัวอย่างจากค่าการดูดกลืนแสง

21. การแยกแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli (1970)

21.1. acrylamide 30% (37 : 1, acrylamide : bisacrylamide)

acrylamide	58.4	กรัม
bisacrylamide	1.6	กรัม
น้ำกลั่น ปริมาตรครบ	200	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เมื่อละลายได้หมด เติมน้ำกลั่นจนครบ 200 มิลลิลิตร เก็บในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

21.2. 4x running gel buffer (1.5 M tris-HCI, pH 8.8)

tris-HCI	36.3	กรัม
น้ำกลั่น ปริมาตรครบ	200	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับ pH = 8.8 ด้วยกรดเกลือ เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 200 มิลลิลิตร

21.3. 4x stracking gel buffer (0.5 M tris-HCI, pH 6.8)

tris-HCI	3.0	กรัม
น้ำกลั่น ปริมาตรครบ	50	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับ pH = 6.8 ด้วยสาร HCI เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร

21.4. SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

SDS	50.0	กรัม
น้ำกลั่น ปริมาตรครบ	500	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

21.5. ammonium persulfate (APS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

APS	0.5	กรัม
น้ำกลั่น ปริมาตรครบ	5.0	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร และควรเตรียมใหม่ก่อนใช้งาน

21.6. 2x sample buffer (0.125 M tris-HCI, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% B-mercaptoethanol, 0.02% bromophenal blue)

tris-HCI 0.5 M, pH 6.8 (21.3)	2.5	มิลลิลิตร
SDS 10% (21.4)	4.0	มิลลิลิตร
glycerol	2.0	มิลลิลิตร
B-mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
bromophenal blue	40	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น ปริมาตรครบ	10	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดและปรับปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดๆ ละ 1.0 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

21.7. tank buffer (0.025 M tris, pH 8.3, 0.192 M glycine, 0.1% SDS)

tris-HCI	12.0	กรัม
glycine	57.6	กรัม
SDS 10% (21.4)	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปริมาตรครบ	4	ลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 3.8 ลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็กจนสารละลายหมดปรับปริมาตรสารด้วยน้ำกลั่นจนครบ 4 ลิตร

การเตรียมเจลส่วนแยก (seperrating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น	24.1	มิลลิลิตร
acrylamide เข้มข้น 30% (21.1)	20.0	มิลลิลิตร
4x running gel buffer (21.2)	15.0	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10% (21.4)	0.6	มิลลิลิตร

กวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็กประมาณ 1-2 นาที ดึงอากาศออก (degas) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 2-3 นาที เติมสาร TEMED 20 ไมโครลิตร และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (21.5) 300 ไมโครลิตร กวนสารให้เข้ากันโดยพยายามไม่ให้เกิดฟองอากาศ ดึงสารละลายที่ได้ใส่ในชุดเตรียมแผ่นวุ้น (gel) ที่เตรียมไว้แล้ว โดยเว้นพื้นที่ว่างด้านบนประมาณ 2.0-3.0 เซนติเมตร ก่อนทับผิวชั้นบนด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แผ่นวุ้นแข็งตัวประมาณ 30 นาที

การเตรียมเจลส่วนต้น (stacking gel)

น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
acrylamide เข้มข้น 30% (21.1)	2.66	มิลลิลิตร
4x stacking gel buffer (21.3)	5.0	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10% (21.4)	0.2	มิลลิลิตร

กวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็กประมาณ 1-2 นาที ดึงอากาศออก (degas) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 2-3 นาที เติมสาร TEMED 10 ไมโครลิตร และสารละลาย ammonium persulfate เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (21.5) 100 ไมโครลิตร กวนสารให้เข้ากันโดยพยายามไม่ให้เกิดฟองอากาศ เทน้ำกลั่นที่ปิดทับผิวหน้าแผ่นวุ้นที่เตรียมไว้ทิ้ง เติมสารละลาย stacking gel แทน ใส่หวี (comb) ทิ้งให้แผ่นวุ้นแข็งตัวประมาณ 30-40 นาที ดึงหวีและยางกันซึมออก ประกอบแผ่นวุ้นที่เตรียมได้กับชุดแยกโปรตีน เติม tank buffer (21.7)

การแยกแถบโปรตีน (running gel)

ผสมตัวอย่างกับ 2x sample buffer (21.6) ในอัตราส่วน 1:1 ต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที แช่ตัวอย่างที่ได้ในน้ำแข็ง นำตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติม (load) ลงในช่องหวี เทียบกับน้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน (protein marker) เปิดชุดจ่ายกระแสไฟซึ่งมีค่าความต่างศักย์ 100 โวลท์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปิดกระแสไฟ เกะแผ่นวุ้นออก ตัดเจลส่วนต้นทิ้ง นำแผ่นวุ้นที่ได้ย้อมด้วยสารย้อมซิลเวอร์ หรือถ่ายแถบโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เพื่อศึกษาปฏิกริยาการจับตัวกับสารแอนติบอดีต่อไป

22. สารย้อมซิลเวอร์ (silver stain) (Bio-rad)

22.1. fixative I (40% methanol, 10% acetic acid (v/v))

22.2. fixative II (10% methanol, 5% acetic acid (v/v))

22.3. silver stain kit (Bio-rad)

- oxidizer
- silver reagent
- developer

การย้อมซิลเวอร์ (silver stain)

ตรึง (fix) ตัวอย่าง นาน 30 นาที ทำปฏิกริยากับสาร oxidizer นาน 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที ทำปฏิกริยากับ silver reagent นาน 20 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น เติม developer และเปลี่ยนสารทุกๆ 5 นาที จนปรากฏแถบโปรตีน หยุดปฏิกริยาด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 5% (v/v) ก่อนล้างด้วยน้ำกลั่น

23. สารย้อมโคมาสซีบลู (comassie blue R-250)

23.1. สารละลาย comassie blue R-250 (0.025% comassie blue R-250, 40% methanol, 7% acetic acid)

comassie blue R-250	0.5	กรัม
methanol	800	มิลลิลิตร
acetic acid	140	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น เติมครบปริมาตร	2	ลิตร

23.2. destain solution I (50% methanol, 10% acetic acid)

methanol	500	มิลลิลิตร

acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น เติมครบปริมาตร	1	ลิตร

23.3. destain solution II (5% methanol, 7% acetic acid)

methanol	50	มิลลิลิตร
acetic acid	70	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น เติมครบปริมาตร	1	ลิตร

การย้อมสีโคมาสซีบลู

นำแผ่นเจลลงย้อมในสารละลาย comassie blue R-250 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นสารละลาย destain I เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสารละลาย destain II จนแผ่นเจลใส จึงล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

24. การย้ายแถบโปรตีน (protein transfer)

ด้วยเครื่อง tran-blot semi-dry electrophoretic transfer cell (Bio-rad)

24.1.Towbin transfer buffer, pH 8.3 (Towbin *et al.*, 1979)

tris, 25 mM	3.03	กรัม
glycine, 192 mM	14.40	กรัม
methanol	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปริมาตรครบ	1	ลิตร

ละลายทริสและไกลซีนในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมเมธานอลก่อนปรับปริมาตรครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ข้อควรระวัง ไม่ควรใช้กรดหรือด่างในการปรับ pH

การย้ายแถบโปรตีน

1. ปรับสภาพแผ่นเจลใน Towbin transfer buffer, pH 8.3 เป็นเวลา 30 นาที

2. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสและกระดาษกรอง (filter paper) แบบหนา แช่ในสาร Towbin transfer buffer, pH 8.3 เป็นเวลาประมาณ 30 นาที

3. วางกระดาษกรองบนแผ่น platinum anode วางทับด้วยแผ่นไนโตรเซลลูโลส แผ่นเจลที่ปรับสภาพแล้วในสารละลายบัฟเฟอร์ และกระดาษกรองอีกชั้นหนึ่งตามลำดับ ในแต่ละชั้นควรป้องกันการเกิดฟองอากาศ โดยใช้ปิเปต กลิ้งทับจากส่วนกลางไปยังขอบแต่ละด้าน ปิดทับด้วยแผ่น cathode อีกด้านหนึ่ง ก่อนปิดฝาเครื่องซึ่งเป็นชุด safety cover อีกชั้นหนึ่ง

4. ปรับชุดควบคุมกระแสไฟที่ 10-15 โวลท์ เป็นเวลานาน 25-35 นาที ขึ้นกับขนาด และความหนาของแผ่นเจล ก่อนเปิดจ่ายกระแสไฟ

5. ปิดกระแสไฟเมื่อครบกำหนดเวลา

6. นำแถบโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ ทดสอบการจับตัวกับแอนติบอดี

25. การทดสอบปฏิกริยารวมตัวของแถบโปรตีนไวรัสกับแอนติบอดีซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์

25.1 phosphate buffer saline (PBS)

Na_2HPO_4, 10 mM pH 7.2	1.42	กรัม
NaCl, 0.15 M	8.77	กรัม

ละลายสารดังกล่าวในน้ำกลั่น ปรับ pH = 7.2 ด้วยสารละลาย HCl ก่อนปรับปริมาตรของสารละลายครบ 1 ลิตร

25.2. phosphate buffer saline with Tween-20 (PBS-Tween) 0.05% (v/v)

PBS, pH 7.2	999.5	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

เติมสาร Tween-20 ลงในสารละลาย PBS (25.1) กวนสารละลายให้เข้ากันก่อนใช้

25.3. 4-chloro-1-naphthol (4CN) (stock solution)

4CN	3.0	มิลลิกรัม
methanol	1.0	มิลลิลิตร

ละลายสาร 4 CN ในสารเมธานอล ปรับปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร

25.4. substrate solution

PBS (25.1)	8.0	มิลลิลิตร
4CN (25.3)	2.0	มิลลิลิตร
H_2O_2 (30%)	33.3	ไมโครลิตร

การตรวจจับแถบโปรตีนด้วยปฏิกริยาแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์

1. นำแถบโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสบ่มในสารละลาย PBS-Tween 20 เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2. ล้างด้วย PBS-Tween-20 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

3. บ่มด้วย primary antibody (rabbit antiserum to SIV) ความเข้มข้น 1:100 ในสารละลาย PBS-Tween-20 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4. ล้างด้วย PBS-Tween-20 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

5. บ่มด้วย secondary antibody (goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate) ความเข้มข้น 1:100 ในสารละลาย PBS-Tween-20 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

7. บ่มด้วย substrate solution (25.4) โดยสามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีน ในเวลาประมาณ 10-15 นาที

8. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

9. ผึ่งให้แห้ง ควรเก็บในที่มืด สามารถเก็บได้นาน 6-12 เดือน

26. การเตรียมผลเซลล์ SK ในสารอะซิโตน (acetone powder) ตามวิธีการของ Harlow และ Lane (1988)

26.1. นำสารละลายเซลล์ SK ที่เพาะเลี้ยงได้ ตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

26.2. ละลายตะกอนเซลล์ SK ในสารละลายเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ก่อนตกตะกอนซ้ำอีกครั้ง

26.3. เติมสารละลายเกลือปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อตะกอนเซลล์ 1 กรัม ก่อนบดให้ละเอียดและย้ายสารละลายเซลล์ดังกล่าวมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

26.4. เติมสารอะซิโตน (acetone) ซึ่งแช่ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมและแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

26.5. ตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาทีดูดสารละลายทิ้ง

26.6. ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารอะซิโตนและแช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซ้ำอีกครั้ง ก่อนตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 x g และดูดสารละลายทิ้ง

26.7. ผึ่งตะกอนให้แห้งบนกระดาษกรองที่อุณหภูมิห้อง ก่อนเก็บในภาชนะปิดสนิท

27. การดูดซับแอนติบอดี (antibodies absorption)

เติมผงเซลล์ SK ในแอติบอดีที่ผลิตได้ โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมและบ่มทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที นำแอนติบอดีที่ได้ใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อการใช้งานต่อไป