บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เตรียมโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ X-73

3.1.1. เตรียมโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรีย *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 สำหรับใช้เป็นแอนติเจนของการทดลอง (Thanasarasakulpong et al., 2013)

นำโคโลนีของ *E. coli* สายพันธุ์ X-1-7 ที่มียีนในส่วน Outer membrane protein จากเชื้อ *P. multocida* (ATCC15742) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria–Bertani (LB medium) ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin ขนาด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ kanamycin ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วแบ่งสารละลายเชื้อจำนวน 1 มิลลิลิตรมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มี ampicillin ขนาด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ kanamycin ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าโดยใช้ orbital shaker ที่ ความเร็วรอบ 125 rpm จนกระทั่งเชื้อมีความเข้มข้นที่ OD_{600} = 0.6 แล้วทำการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; Takara) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM แล้วเขย่าต่อไปอีก 4 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเซลล์ต่อไป โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 g เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บเซลล์ตกตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

PAYAP UNIVERSITY

รูปที่ 10 แสดงการเตรียมเพาะเลี้ยง *E. coli* ที่มียีนในส่วน Outer membrane protein จากเชื้อ *P. multocida* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria – Bertani (LB medium)

ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย lysis buffer ที่ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบไปด้วย 100 mM NaH_2PO 10 mM Tris-HCl และ 8 M urea จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย NaOH ละลายตะกอนในอัตราส่วนสารละลาย 5 มิลลิลิตรต่อเซลล์ตะกอน 1 กรัม แล้วเขย่าด้วย vertical shaker ที่ความเร็ว 75 rpm ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกเก็บเฉพาะสารละลายส่วนบน จะได้สารละลายโปรตีนที่มีลักษณะขุ่นเล็กน้อย เพื่อนำไปสกัดแยกโปรตีนในขั้นตอนต่อไป

PAYAP UNIVERSITY

3.1.2 การคัดแยกโปรตีนด้วยเครื่องแยกโปรตีนอัตโนมัติ Model AE-6760 NATIVEN (ATTO) ต่อเข้ากับเครื่องรับแยกโปรตีน Fraction collector (ATTO)

ทำการเตรียมเจลคล้ายกับการเตรียม SDS-PAGE คือ separating gel และ stacking gel สารเคมีสำหรับเตรียมเจลแต่ละชนิด มีดังนี้

(1) Solution A ประกอบด้วย Acrylamide 29.0 กรัม, Bis-acrylamide 1.0 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

(2) Solution B ประกอบด้วย Tris 18.2 กรัม, SDS 0.4 กรัม และ 37% Hydrochloric acid 2 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

(3) Solution C ประกอบด้วย Tris 6.1 กรัม, SDS 0.4 กรัม และ 37% Hydrochloric acid 4.2 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

(4) 10% APS ประกอบด้วย APS 0.1 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เตรียมส่วนประกอบของเจลที่ใช้ในการแยกชั้นโปรตีน Separating gel (12.5%) โดยปิเปต Solution A 7.5 มิลลิลิตร Solution B 4.5 มิลลิลิตร TMED 0.08 มิลลิลิตร 10% APS 0.01 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร

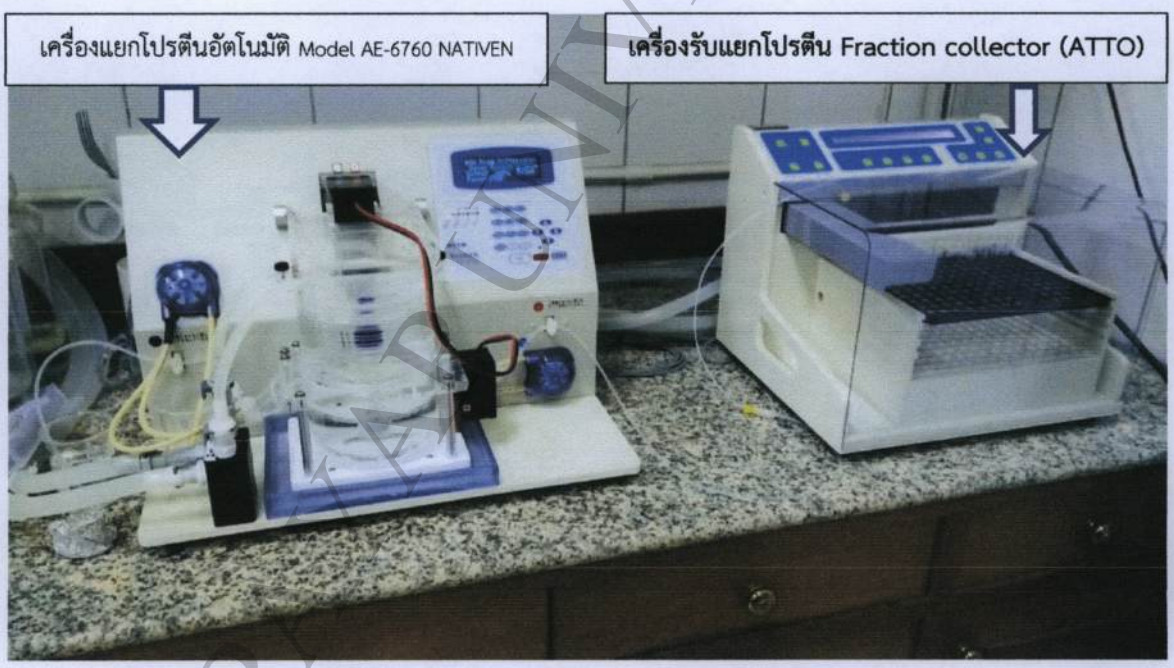
เตรียมส่วนประกอบของเจลที่ใช้ในการแยกชั้นโปรตีน Stacking gel (4.5%) โดยปิเปต Solution A 0.9 มิลลิลิตร Solution C 1.5 มิลลิลิตร TMED 0.02 มิลลิลิตร 10% APS 0.01 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 3.6 มิลลิลิตร

หลังจากเตรียมเจลได้ตามที่ต้องการแล้ว นำโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้มาทำการแยกโปรตีน โดยนำไปผสมกับสารละลาย 2X Leammli sample buffer ในปริมาตรเท่ากัน (ปริมาตรละ 750 ไมโครลิตร) โดยที่ 2X Leammli sample buffer เป็นสารละลายประกอบไปด้วย 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร 10% SDS ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร 0.1% Bromphenol blue ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร Glycerol ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Laemmli, 1970; Sthitmatee et al., 2008)

PAYAP UNIVERSITY

เตรียมอุปกรณ์และวางเจลลงบนแท่นตามคำแนะนำของอุปกรณ์ เตรียมสารละลาย running buffer ปริมาตร 1 ลิตร ที่ประกอบไปด้วย 25 mM Tris, 192 mM Glycine และ 0.1 % SDS เทสารละลายให้ท่วมเจล โดยมีค่าต่างๆเพื่อการแยกโปรตีนดังนี้ Separating gel หนา 30 มิลลิเมตร Stacking gel หนา 10 มิลลิเมตร โปรตีน ครั้งละ 1.5 มิลลิกรัม 750 ไมโครลิตร 2X Leammli sample buffer 750 ไมโครลิตร Delay time 270 นาที EP time 6 นาที Filling time 100 วินาที Collecting time 120 วินาที และ Collection 20 fractions ตามลำดับ

เมื่อถึงค่าที่ตั้งไว้ โปรตีนจะถูกเก็บในสารละลาย collecting buffer ที่มีองค์ประกอบ ดังนี้ 371 mM Tris และ 5% Sucrose แล้วทำการปรับ pH ให้เป็น 8.0 ก่อนปรับปริมาตรให้เป็น 300 มิลลิลิตร จะได้ fraction โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดต่างๆกันอยู่ในสารละลาย collection buffer เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตรวจหาความบริสุทธิ์ของโปรตีนต่อไป



รูปที่ 11 แสดงการแยกโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง Electroelutor

PAYAP UNIVERSITY

3.1.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่อยู่ในสารละลาย collection buffer

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่อยู่ในสารละลาย collection buffer เทียบกับ BLUeye Prestained Protein Ladder โดยใช้ เจลสำเร็จรูปจาก NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels ขนาด 1.0 mmx10 well ผสมโปรตีนที่เก็บได้ในแต่ละ fraction ผสมกับ sample buffer อัตราส่วน 1:1 ก่อนโหลดลงบนเจล โดยใช้วิธีตามที่เอกสารกำกับวิธีการใช้ NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels

รูปที่ 12 แสดงเจลสำเร็จรูป (NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels) เพื่อใช้ในการตรวจความบริสุทธิ์ของโปรตีน และเพื่อใช้ทำ Western blot ในขั้นตอนต่อไป

PAYAP UNIVERSITY

QUICK REFERENCE

novex by Life technologies

NuPAGE® Bis-Tris Mini Gels

Pub. Part No. IM-8042 MAN0003679 Rev. Date 27 June 2011

See reverse for NuPAGE® Tris-Acetate Gel protocol

Instructions for electrophoresis using the XCell *SureLock*® Mini-Cell are described below. For details, refer to the *NuPAGE® Technical Guide* available at www.invitrogen.com/manuals.

Prepare Samples

Reagent	Reduced Sample	Non-reduced Sample
Sample	x µL	x µL
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	2.5 µL	2.5 µL
NuPAGE® Reducing Agent (10X)	1 µL	--
Deionized Water	to 6.5 µL	to 7.5 µL
Total Volume	10 µL	10 µL

Heat samples at 70°C for 10 minutes.

Prepare 1X Buffer Add 50 mL 20X NuPAGE® MES or MOPS SDS Running Buffer to 950 mL deionized water to prepare 1X SDS Running Buffer.

Load Sample Load the appropriate concentration of your protein sample on the gel.

Load Buffer Fill the Upper (200 mL) and Lower (600 mL) Buffer Chambers with the appropriate 1X Running Buffer. **For reduced samples,** use 200 mL 1X Running Buffer with 500 µL NuPAGE® Antioxidant in the Upper Buffer Chamber.

Run Conditions

Voltage:	200 V constant
Run Time:	35 minutes (MES Buffer), 50 minutes (MOPS Buffer)
Expected Current:	100–125 mA/gel (start); 60–80 mA/gel (end)

Intended Use: For research use only. Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

life technologies

รูปที่ 13 เอกสารกำกับวิธีการใช้ NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels

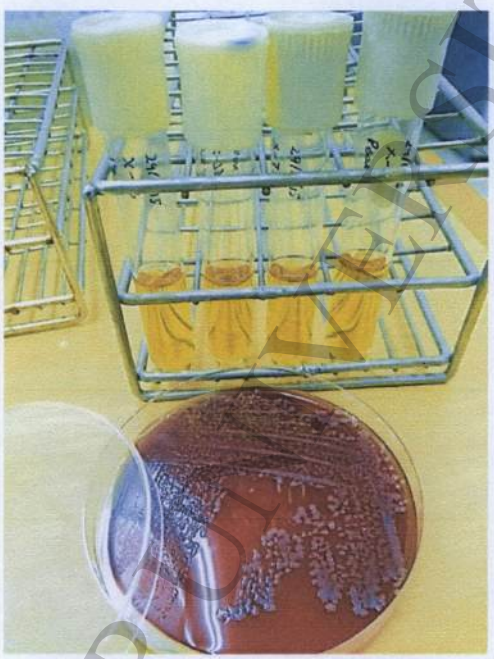
รูปที่ 14 แสดงเครื่องมือตรวจความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย XCell SureLock Mini cell set

KASETSART UNIVERSITY

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 1050037407

3.1.4 วิธีการเตรียม Whole cell lysate จาก เชื้อ *Pasteurella multocida*

เชื้อ *Pasteurella multocida* สายพันธุ์ X-73 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion broth ที่ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน ผสมกับสารละลาย 2X Leammli sample buffer ในปริมาตรเท่ากัน นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที



รูปที่ 15 เชื้อ *Pasteurella multocida* สายพันธุ์ X-73 เพื่อเตรียมเป็น Whole cell lysate สำหรับการทำ Western blot

3.2 ตัวอย่างซีรัมเป็ด

ตัวอย่างซีรั่มเป็ดได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ (โครงการวิจัยการผลิตและทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรค อหิวาต์สัตว์ปีกแบบหยอดจมูกปี พ.ศ.2554 ซึ่งเป็นเป็ดที่ได้รับโปรตีนลูกผสม OmpH ขนาด 100 ไมโครกรัม) จำนวน 5 ตัวอย่างและซีรั่มจากเป็ดที่ป่วยเป็นโรคอหิวาต์ จำนวน 5 ตัวอย่าง ใช้ซีรั่มเป็ดที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์สัตว์ปีก จากกรมปศุสัตว์เป็นซีรัมควบคุมบวกสำหรับการทดลอง และซีรั่มของเป็ดที่ปลอดโรคและไม่ได้รับการฉีดวัคซีนใดๆ เป็นซีรั่มควบคุมลบสำหรับการทดลอง

PAYAP UNIVERSITY

3.3 ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอนติบอดีจากเป็ดต่อโปรตีนลูกผสม Outer membrane protein (Omp) H ในการทำปฏิกิริยาต่อเชื้อ *Pasteurella multocida* ที่คัดแยกจากเป็ดที่เป็นโรคด้วยวิธี Western blot

เพื่อเป็นการตรวจสอบผลการตอบสนองของเป็ดในการสร้างแอนติบอดีต่ออิมมูโนเจนต่างชนิดกันด้วยวิธี immunoblotting โดยหลังจากที่เตรียม SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli ในปี ค.ศ.1970 ใช้ rOmpH และใช้ Whole cell lysate จาก *P. multocida* สายพันธุ์ X-73 เป็นโปรตีนที่ใช้โหลดลงบนเจลและแยกโปรตีนด้วยวิธี electrophoresis จากนั้นทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยัง nitrocellulose membrane (Bio-rad, Hercules, USA) โดยใช้ blotting buffer (2.5 mM Tris, 192 mM glycine และ 10% methanol) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 10 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยสารละลาย PBS-T (0.02M PBS (pH 7.2), 0.05% Tween 20) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย blocking buffer (0.02M PBS (pH 7.2), 1% bovine serum albumin (BSA; Difco, 5% Skim milk และ0.1% Sodium azide) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยสารละลาย PBS-T จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นทำการเจือจางซีรั่มของเป็ดในอัตราส่วน 1:100 ด้วยสารละลาย PBS (pH 7.2) เพื่อนำไปใช้เป็น primary antibody แล้วบ่มกับเมนเบรนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยสารละลาย PBS-T จำนวน 2 ครั้ง ส่วน secondary antibody จะใช้ HRP conjugated mouse anti-duck IgY antibody (Pierce, Rockford, IL, USA) เจือจางในอัตราส่วน 1:2000 แล้วบ่มกับเมนเบรนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยสารละลาย PBS-T จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติม diaminobenzidine (DAB: Invitrogen) ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน PBS (pH 7.2) เป็น substrate solution เพื่อดูการเปลี่ยนสีบน nitrocellulose membrane ประมาณ 3-5 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้แห้งแล้วนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

PAYAP UNIVERSITY