

รายงานความก้าวหน้า

การทดลอง : การทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดเคอร์ราต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ส่งผลต่อโปรตีนที่จำเพาะต่อกระบวนการอักเสบ โดยเทคนิค Western blot

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาฤทธิ์จากสารสกัดเคอร์ราต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ส่งผลต่อโปรตีนการอักเสบ

วิธีการทดลอง

1. การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง

ใช้ไม้ขูดเซลล์ (cell scraper) ขูดเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงแล้วถ่ายเซลล์ใส่หลอดปั่นเหวี่ยง นำสารแขวนลอยเซลล์มาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 13,000 g นาน 5 นาที ดูดและเท สารละลายส่วนบน (supernatant) ที่ล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 13000 g นาน 5 นาที ดูด/เท สารละลายส่วนบน (supernatant) ที่ล้างแล้วล้างเซลล์ ด้วย PBS ซ้ำอีกครั้งทำการแตกเซลล์โดยเติมน้ำยา 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 และ รายละเอียดที่จำเป็น ในขั้นตอนนี้จะได้สารละลายโปรตีนเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

2. การหาปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay

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

ที่	ปริมาตร (μL)			BSA final Concentration (μg/μL)
	Stock 1 μg/μL of BSA	Lysis buffer	H ₂ O	
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. จัดบันทึกค่าการเจือจาง 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 ระหว่างรอทดสอบการรั้วซึม ให้เตรียมสารละลาย 12% separating gel และ 4% stacking gel เมื่อพบว่าชุดกระจกไม่มีการรั้วซึม เทน้ำออกและซับให้แห้ง เติม TEMED ลงใน 12% 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 ให้สูงกว่าซีตระดับ

3.2 การแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้า

ค่อยๆดึง comb ออกจากเจลล่างหลุมเจลโพลีอะคริลาไมด์ (well) เติมน้ำละลายโปรตีนที่ได้เตรียมไว้ (ผสม dye และต้มแล้ว) ปริมาตรไม่เกิน 30 μ l ลงในหลุมเจล โดยต้องเติมน้ำละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (Protein Ladder) ปริมาตร 3 μ l ลงไปด้วยเพื่อใช้เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน 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 electrode assembly ออกจาก tank ถอดชุด กระจก gel cassette sandwich ออกจาก electrode assembly แล้วล้างน้ำเบา ๆ ให้หายสิ้น ใช้ gel releasers ค่อย ๆ จัดแผ่น กระจกด้านใดด้านหนึ่งออก แล้วตัดเจลส่วน stacking gel ออก

4. Protein Blotting/ Protein transfer

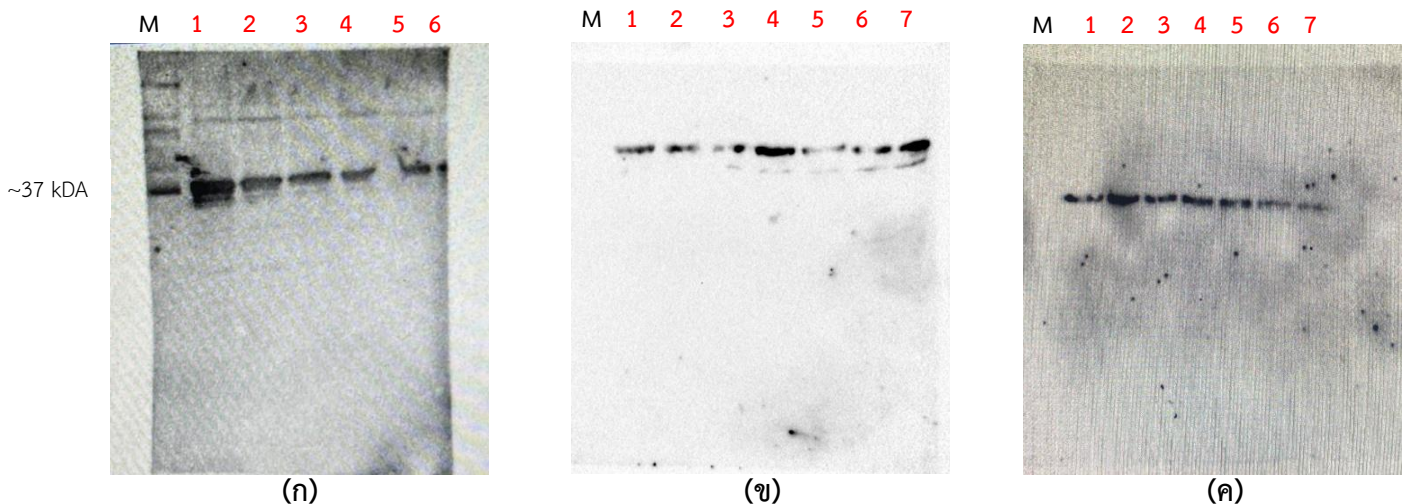
ตัด membrane และ กระดาษกรองให้มีขนาดเท่าเจล ขั้นตอน Equilibration membrane และ กระดาษกรอง โดยแช่ membrane และ กระดาษกรอง ใน transfer buffer ประมาณ 30 นาที (เพื่อให้อิ่มตัวในบัฟเฟอร์) ทำเครื่องหมายหรือสัญลักษณ์เพื่อระบุตำแหน่งของเจลที่จะประกบกับ membrane ถอดฝาออกจากเครื่อง transfer และวางแผ่นกระดาษกรองที่แช่จนอิ่มตัวในบัฟเฟอร์สาม วาง membrane ไว้ด้านบนของแผ่นกระดาษกรองอย่างระมัดระวัง และตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น วางเจลที่ด้านบนของ membrane และเกลี่ยให้เรียบเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีช่องอากาศ วางแผ่นกระดาษกรองที่เหลืออีกสามแผ่นที่ด้านบนของ membrane แล้วค่อยๆ เกลี่ยให้เรียบ วางฝาปิดของเครื่อง transfer ลงบนแซนวิช อย่างระมัดระวัง ต่อสายไฟเข้ากับตัวเครื่อง สายสีแดงต่อเข้ากับขั้วบวก และสายสีดำต่อเข้ากับขั้วลบต่อสายไฟเข้ากับ power supply สายสีแดงต่อขั้วสีแดง สายสีดำต่อขั้วสีดำ

4.1 ตรวจสอบโปรตีนที่สนใจ

วางแผ่น nitrocellulose membrane ไว้ในภาชนะโดยหันด้านที่มีโปรตีนขึ้นด้านบน Block พื้นที่ว่างบนแผ่น membrane ด้วย blocking buffer ปริมาตร 5 ml แล้วเขย่าด้วยความเร็ว 50 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อปกปิดพื้นหลังของ membrane และป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับ membrane (block non-specific binding) เติมนBlocking buffer ที่แล้วเติม 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 จนเห็นสีน้ำเงินบนแผ่น membrane ล้าง membrane ด้วยน้ำกลั่น ทำการถ่ายภาพและเก็บ membrane ไว้ในตู้เย็น 4 ° C

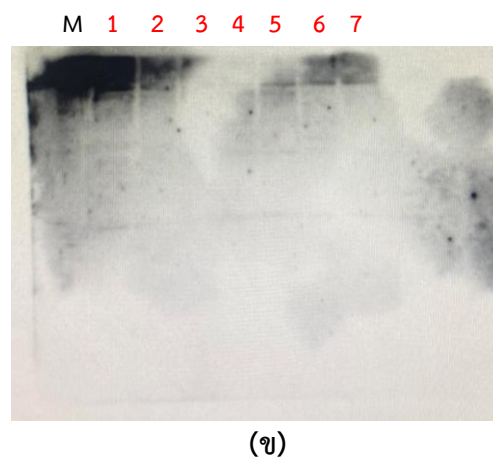
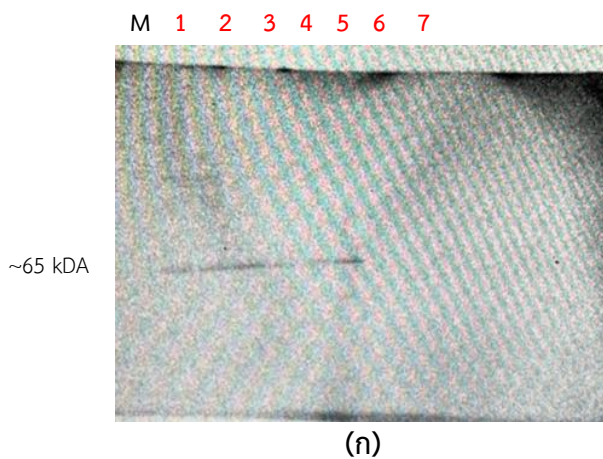
ผลการทดลอง

5.1 ผลการศึกษาฤทธิ์จากสารสกัดเคอร์ราต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ส่งผลต่อโปรตีนการอักเสบ



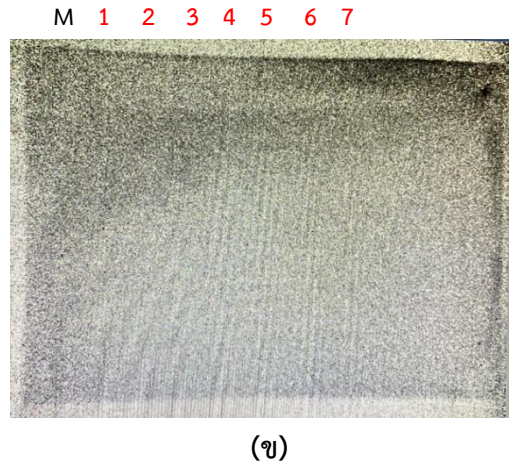
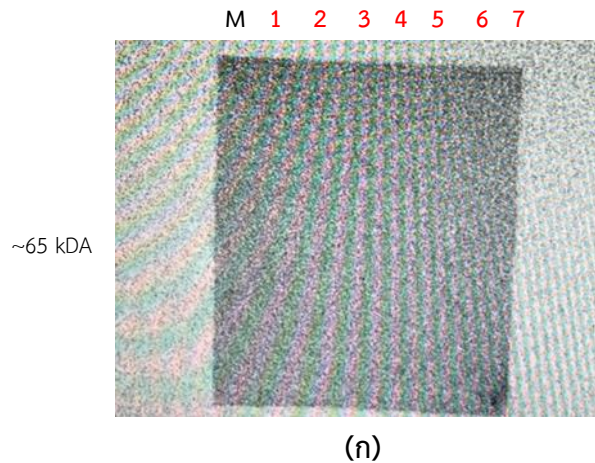
M = Protein Ladder, 1 = Untreated, 2 = LPS, 3 = Diclofenac, 4 = 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 = 25 $\mu\text{g/mL}$, 6 = 50 $\mu\text{g/mL}$, 7 = 100 $\mu\text{g/mL}$

ภาพที่ 1 การตรวจสอบการมีอยู่ของโปรตีนการอักเสบ ด้วยเทคนิค Western blotting ด้วย GAPDH antibody โดยกำหนดครั้งที่ 1 (ก), ครั้งที่ 2 (ข) และ ครั้งที่ 3 (ค)



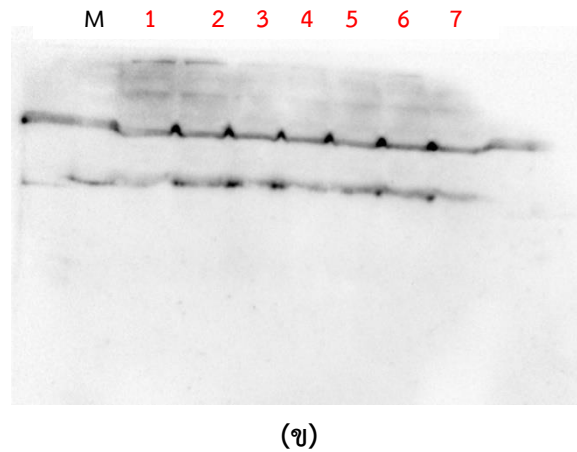
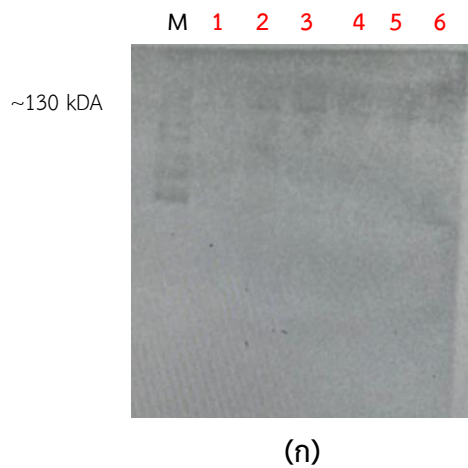
M = Protein Ladder, 1 = Untreated, 2 = LPS, 3 = Diclofenac, 4 = 12.5 µg/mL, 5 = 25 µg/mL, 6 = 50 µg/mL, 7 = 100 µg/mL

ภาพที่ 2 การตรวจสอบการมีอยู่ของโปรตีนการอักเสบ ด้วยเทคนิค Western blotting ด้วย nF-kB antibody โดยกำหนดครั้งที่ 1 (ก) และ ครั้งที่ 2 (ข)



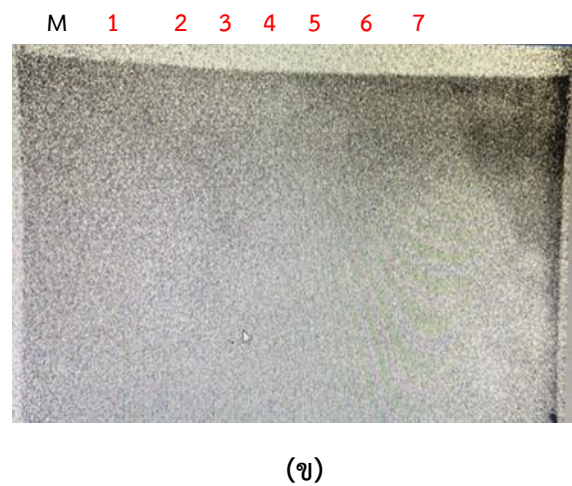
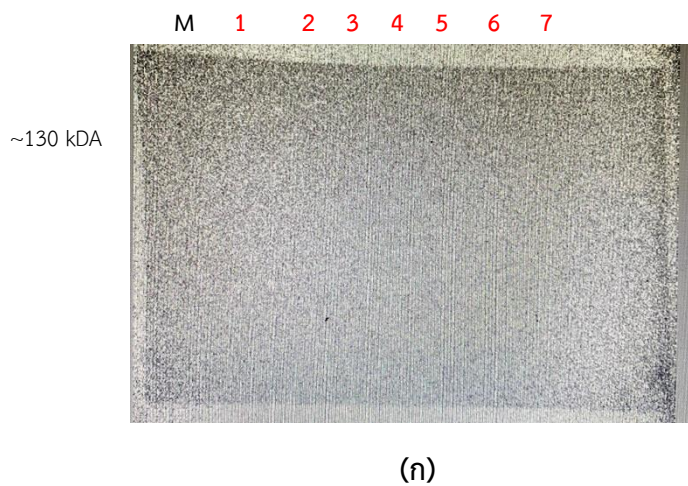
M = Protein Ladder, 1 = Untreated, 2 = LPS, 3 = Diclofenac, 4 = 12.5 µg/mL, 5 = 25 µg/mL, 6 = 50 µg/mL, 7 = 100 µg/mL

ภาพที่ 3 การตรวจสอบการมีอยู่ของโปรตีนการอักเสบ ด้วยเทคนิค Western blotting ด้วย Phospho-nF-kB antibody โดยกำหนดครั้งที่ 1 (ก) และ ครั้งที่ 2 (ข)



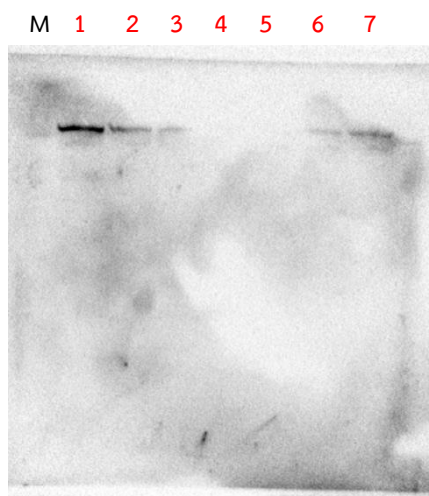
M = Protein Ladder, 1 = Untread, 2 = LPS, 3 = Diclofenac, 4 = 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 = 25 $\mu\text{g/mL}$, 6 = 50 $\mu\text{g/mL}$, 7 = 100 $\mu\text{g/mL}$

ภาพที่ 4 การตรวจสอบการมีอยู่ของโปรตีนการอักเสบ ด้วยเทคนิค Western blotting ด้วย JAK2 antibody โดยกำหนดครั้งที่ 1 (ก) และ ครั้งที่ 2 (ข)



M = Protein Ladder, 1 = Untread, 2 = LPS, 3 = Diclofenac, 4 = 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 = 25 $\mu\text{g/mL}$, 6 = 50 $\mu\text{g/mL}$, 7 = 100 $\mu\text{g/mL}$

ภาพที่ 5 การตรวจสอบการมีอยู่ของโปรตีนการอักเสบ ด้วยเทคนิค Western blotting ด้วย Phospho-JAK2 antibody โดยกำหนดครั้งที่ 1 (ก) และ ครั้งที่ 2 (ข)



(ก)

M = Protein Ladder, 1 = Untreated, 2 = LPS, 3 = Diclofenac, 4 = 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 = 25 $\mu\text{g/mL}$, 6 = 50 $\mu\text{g/mL}$, 7 = 100 $\mu\text{g/mL}$

ภาพที่ 6 การตรวจสอบการมีอยู่ของโปรตีนการอักเสบ ด้วยเทคนิค Western blotting ด้วย AKT antibody โดยกำหนดครั้งที่ 1 (ก)