The application of quantitative SDS-PAGE method for measurement of extracellular recombinant scFv anti-p17 in crude protein

Kannaporn Intachai[1], *Chanyanuch Putim*[1], *Watchara Kasinrerk*[2,3], *Chatchai Tayapiwatana*[2,3], *Bordin Butr-Indr*[1*]

[1]*Division of Clinical Microbiology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Science, Chiang Mai University*
[2]*Division of Clinical Immunology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Science, Chiang Mai University*
[3]*Medical Biotechnology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency at the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University*

**Corresponding author*

Abstract

The quantitative determination of recombinant protein in crude protein is not commonly used because the protein is not in purified form. The Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was developed for quantitative determination of protein. This method has been use for protein quantitative determinations in many propose such as Tamm-Horsfall glycoprotein determination in kidney stone disease patient and determination of titin and nebulin in chicken meat product for meat industries. In this study, the method of quantitative determination of extracellular recombinant single-chain variable fragment anti-HIV-1 p17 proteins (scFv anti-p17) from *Escherichia coli* stain HB2151 by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was developed by the application of bovine serum albumin as external and internal standard. The range of detection was 1.875 - 0.234 µg. These results presented variation coefficient less than 35%. The method applied to quantitative determination of scFv anti-p17 in 19 of crude protein samples. The quantitative protein concentration results related to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western immunoblotting method. The quantitative SDS-PAGE method is capable for quantitative determination of known protein from crude protein extraction. This method decreased the purification step, time consuming and protein yield loss. This application is capable to apply with the other pathogenic protein markers in the future clinical applications. ***Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2013; 46(2): 107-121***

Keywords: *SDS-PAGE, scFv anti-p17, HIV-1*

การประยุกต์ใช้เทคนิค SDS-PAGE เพื่อตรวจหาปริมาณโปรตีน Extracellular Recombinant Single-chain Variable Fragment Anti-HIV-1 p17 จากโปรตีนรวม

กรรณาภรณ์ อินทชัย[1], ชัญญานุช ภู่ทิม[1] วัชระ กสิณฤกษ์[2,3]
ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา[2,3] บดินทร์ บุตรอินทร์[1]*

[1]แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2] แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[3] ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ผู้รับผิดชอบบทความ*

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนลูกผสมที่จำเพาะจากโปรตีนรวมทำได้ยาก เนื่องจากโปรตีนที่ต้องการยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ปัจจุบันการพัฒนาเทคนิคการหาปริมาณโปรตีนลูกผสมที่จำเพาะจากโปรตีนรวมโดยตรงด้วยวิธี quantitative sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) นำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหลายชนิด เช่น การหาโปรตีน Tamm-Horsfall glycoprotein เพื่อตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคนิ่วในไต และการตรวจหาปริมาณโปรตีน titin และ nebulin ในเนื้อไก่ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาการหาปริมาณโปรตีน single chain variable fragment anti-HIV-1 p17 (scFv anti-p17) ที่ผลิตออกนอกเซลล์จากเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ HB2151 โดยใช้โปรตีน bovine serum albumin (BSA) เป็นตัวควบคุมภายนอก และตัวควบคุมภายใน จากการศึกษาพบว่า การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA จากพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์จากความเข้มของแถบโปรตีน BSA ในเจลด้วยโปรแกรม ImageQuant TL programe ได้ค่าความเข้มข้นของ BSA ที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายนอกและตัวควบคุมภายในอยู่ในช่วงค่าความเข้มข้น 0.234 -1.875 ไมโครกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ได้น้อยกว่า 35% เมื่อใช้การทดสอบการหาปริมาณ scFv anti-p17 ในตัวอย่างโปรตีนจำนวน 19 ตัวอย่าง ให้ผลของปริมาณโปรตีนที่สัมพันธ์กับผลการทดสอบด้วยวิธี enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) และ western immunoblotting การหาปริมาณโปรตีนจำเพาะจากโปรตีนรวมด้วยวิธี SDS-PAGE ทำให้ทราบปริมาณโปรตีนโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีน ช่วยลดระยะเวลาและการสูญเสียโปรตีน สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการหาปริมาณโปรตีนบ่งชี้ที่สำคัญทางการแพทย์ได้ในอนาคต ***วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2556; 46(2): 107-121***

คำหัส: *: โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลิไมด์เจล อิเล็กโตรโฟลิซิส ซิงเกิลเซน แวริเอเบิล แฟรกเมนต์ เมทริกซ์ โปรตีนพี-17 เอชไอวี-1*

บทนำ

เทคโนโลยีการผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) เพื่อใช้ในการวินิจฉัย การรักษาโรค และงานวิจัย เช่น การผลิตโปรตีนอินซูลินเพื่อช่วยรักษาผู้ป่วยเบาหวาน[1] การผลิตโปรตีน single chain variable fragment (scFv) ที่มีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับแอนติเจนได้หลากหลายชนิด เพื่อใช้ในการรักษาการตรวจวินิจฉัยมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งลำไส้ เป็นต้น[2] จากประโยชน์ดังกล่าวการผลิต scFv เพื่อใช้ในทางการแพทย์มีความสำคัญเป็นอย่างมาก การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตโปรตีนลูกผสมมีหลายขั้นตอน การหา

ปริมาณโปรตีนเป็นขั้นตอนหนึ่งที่แสดงถึงผลผลิตโปรตีนที่ได้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการใช้งานหรือไม่ วิธีการหาปริมาณโปรตีนโดยทั่วไปคือ วิธี Kjeldahl วิธี Biuret วิธี Lowry-Folin และวิธี Bradford การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีข้างต้น นิยมใช้คำนวณหาปริมาณโปรตีนในรูปแบบการหาโปรตีนรวมจึงไม่สามารถหาปริมาณโปรตีนที่จำเพาะจากโปรตีนที่ไม่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ได้

เทคนิค quantitative sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (quantitative SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งจากโปรตีนรวม โดยแยกโปรตีนภายใต้สนามไฟฟ้าอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีโครงสร้างปฐมภูมิต่างกัน และหาปริมาณโปรตีนจากความเข้มของแถบโปรตีนที่จำเพาะเมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค quantitative SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ง่าย และน่าเชื่อถือ จากการศึกษาที่ผ่านมา เทคนิค quantitative SDS-PAGE ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์ Tomaszewska-Gras และคณะได้ศึกษาหาปริมาณโปรตีน titin และ nebulin ในเนื้อไก่ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ β-galactosidase เป็นตัวควบคุมภายใน พบว่าปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์คิดเป็น 0.91-0.99[3] การศึกษาของ Hofman และคณะตรวจหาปริมาณคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ ในการผลิตเบียร์ด้วยเทคนิค semi-quantitative SDS-PAGE โดยสามารถตรวจหาคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.03 ppm การศึกษาของ Wai-hoe และคณะหาปริมาณ Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โปรตีน THP มาตรฐาน เป็นตัวควบคุมภายนอกเพื่อใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยโรคนิ่วในไต จากการศึกษาให้ค่าความสามารถในการให้ผลซ้ำ (Reproducibility) และค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability) เท่ากับ 4.8 % CV และ 2.6 % CV ตามลำดับ พบว่าสามารถคัดกรองผู้ป่วยออกจากคนปกติได้ โดยมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูงถึง 92.3% และ 83.3% ตามลำดับ[4] การศึกษาของ Li และคณะทำการตรวจหาปริมาณโปรตีนในน้ำตาที่เปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยโรคตาด้วยวิธี SDS-PAGE densitometry โดยใช้โปรตีน soybean trypsin inhibitor (SBTI) เป็น ตัวควบคุมภายใน พบว่า เทคนิคนี้สามารถใช้ในการวินิจฉัยการเกิดโรคตาได้โดยวิเคราะห์จากปริมาณโปรตีนในน้ำตาที่เปลี่ยนแปลงไป[5] Ricný และคณะศึกษาการหาปริมาณ myosin heavy chain (MyHC) isoforms ในกล้ามเนื้อด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับวิธี SDS-PAGE พบว่าความถูกต้อง และความเร็วของวิธี ELISA ให้ผลใกล้เคียงกับการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE[6]

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยผลิตโปรตีน single-chain variable fragment anti-p17 (scFv anti-p17) ออกสู่นอกเซลล์จากเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ HB2151 ซึ่ง scFv เป็นโปรตีนลูกผสมที่มีขนาดโมเลกุลขนาดเล็กกว่าแอนติบอดีปกติ (intact antibody) 5-6 เท่าโดยมีขนาดโมเลกุลประมาณ 27-30 กิโลดาลตัน7 โครงสร้างของ scFv ประกอบด้วย variable light chain และ variable heavy chain โดยต่อกันด้วยสายเปปไทด์สายสั้น ๆ ขนาด 10-25 กรดอะมิโน สามารถจับอย่างจำเพาะกับแอนติเจน และแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ดีเมื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคในผู้ป่วย scFv มีโอกาสกระตุ้นให้ผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีของผู้ป่วยต่อ scFv ได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการรักษา จากความสำคัญของ scFv ดังกล่าวมาข้างต้น นักวิทยาศาสตร์จึงศึกษาคุณสมบัติ และการใช้งาน scFv มากขึ้น จากการศึกษาของ Lim และคณะทำการผลิต และทำบริสุทธิ์ scFv ต่อ exotoxin ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จาก E. coli สายพันธุ์ HB2151 พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดโมเลกุลประมาณ 27.5 กิโลดาลตัน และสามารถนำไปใช้ในการทดลองอื่นต่อไปได้[8] Tragoolpua และคณะได้ศึกษาการแสดงออกของ scFv-M6-1B9 intrabody ที่มีความจำเพาะกับ CD147 พบว่าสามารถลดการแสดงออกของ CD147 บนผิวเซลล์ 239A[9] และการศึกษาของ Mukhtar และคณะเกี่ยวกับการแสดงออกของ single chain intracellular antibodies ที่มีความจำเพาะกับ nucleoprotein ของเชื้อไวรัส influenza ชนิด A พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส influenza ชนิด A ได้[10] Gal-Tanamy และคณะสร้าง intrabodies ต่อเอนไซม์ NS3 protease เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NS3 protease ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี พบว่าสามารถลดการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบชนิดซี [11] จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นการใช้ประโยชน์ scFv ในรูปแบบต่าง ๆ แต่การผลิต scFv เพื่อใช้ประโยชน์ยังมีปัญหาในการหาปริมาณของ scFv ที่ผลิตได้ การผลิต scFv โดยแบคทีเรียมีขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนหลายขั้นตอนทำให้โปรตีนที่ได้สูญเสียไปในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ และการติดตามโปรตีนเป้าหมายทำได้ยาก ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิค quantitative SDS-PAGE เพื่อใช้ในการหาปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 ที่ผลิตโดยเชื้อ E. coli สายพันธุ์ HB2151 หลั่งออกนอกเซลล์โดยตรงจากโปรตีนรวม เพื่อลดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีน ตรวจติดตามปริมาณโปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์ และสามารถประยุกต์ใช้กับการผลิตโปรตีนลูกผสมชนิดต่าง ๆ จากเชื้อจุลชีพชนิดอื่นได้ในอนาคต

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมโปรตีน scFv anti-p17

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 ที่มีพลาสมิด pComb3x-scFvp17-His-HA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ terrific broth (1.2% tryptone, 2.4% yeast extract, 72 mM K_2HPO_4, 17 mM KH2PO4, pH 7.0, 1% glucose, 0.4% glycerol และ100 µg/ml ampicillin) กระตุ้นให้เชื้อสร้างโปรตีน scFv anti-p17 ด้วย Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 58 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 70% ปั่นแยกโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงสารตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 6000 g นำโปรตีนผ่านการตกตะกอนไปผ่านกระบวนการไดอะไลซิส (dialysis) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำโปรตีนไปหาปริมาณด้วยวิธี SDS-PAGE ต่อไป

2. การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำโปรตีนรวมผสมกับ sample buffer (0.3125 M Tris HCl,10% SDS, 50% glycerol, 0.05% bromphenol blue, 25% 2-Mercaptoethanol) ในอัตราส่วน 5:1 นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แยกโปรตีน scFv anti-p17 ด้วย 12.5% polyacrylamide gel โดยใช้ความต่างศักย์ 150 โวลต์ เวลา 2 ชั่วโมง นำเจลย้อมด้วยสี coomassie blue R-250 การย้อมสีเจล มีขั้นตอนดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้น้ำยาและสีย้อมปริมาตร 15 มิลลิลิตร ต่อการย้อม polyacrylamide gel 1 เจล

Table 1 Coomassie Blue staining protocol[3]

		Time (min)
1.	Fixation : 40% v/v ethanol,10% v/v glacial acetic acid	30
2.	Staining : 0.05% w/v Coomassie Blue R-250, 25% v/v ethanol and 8% v/v acetic acid	30
3.	Destaining : 25% v/v ethanol and 8% v/v acetic acid	Until clear background
4.	Preserving 10% v/v acetic acid and 10% v/v glycerol	15

3. การตรวจหาโปรตีน scFv anti-p17 ด้วยวิธี western immunoblotting

เพื่อยืนยันตำแหน่งจำเพาะของโปรตีน scFv anti-p17 โดยแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) ด้วยเครื่อง electroblot ใช้กระแสไฟฟ้า 54 มิลลิแอมแปร เวลา 110 นาที จากนั้นเติม 5% skim milk/phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2) บนเมมเบรน PVDF บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เติม mouse anti-HA mAbs (Sigma, USA) อัตราส่วน 1:3000 ลงไปบนแผ่นเมมเบรน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 0.05% v/v Tween20/ PBS (pH 7.2) 3 ครั้ง เติม HRP conjugated goat anti-mouse immunoglobulin antibodies (KPL, USA) อัตราส่วน 1:3000 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส electroblot เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมแบรนด้วย 0.05% v/v Tween20/PBS (pH 7.2) สามครั้ง และล้างด้วย PBS (pH 7.2) 1 ครั้ง เติม chemiluminescent substrates (Pierce, USA) ลงบนแผ่นเมมเบรน และประกบฟิลม์ในห้องมืดทิ้งไว้ 30 นาที

4. การตรวจสอบโปรตีน scFv anti-p17 ด้วยวิธี direct ELISA

เพื่อทดสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนของโปรตีน scFv anti-p17 และยืนยันว่ามีโปรตีน scFv anti-p17 อยู่ในโปรตีนรวม โดยเคลือบแอนติเจนเปปไทด์ p17 ที่จำเพาะต่อ scFv anti-p17 ในไมโครเพลททิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ล้างเพลทด้วย 0.05% Tween20/ TBS 3 ครั้ง เติม 2% BSA /TBS หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลทด้วย 0.05% Tween20/TBS 3 ครั้ง เจือจางโปรตีน scFv anti-p17 ที่ผลิตได้ให้มีความเข้มข้นโปรตีนรวม 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมลงไปในหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับหลุมควบคุมชนิดผลบวก (positive control) เติม scFv anti-p17 ที่เคยทำการทดสอบแล้วได้ผลบวกลงในหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลุมควบคุมชนิดผลลบ (negative control) เติม scFv-M61B9 ลงในหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างออก ด้วย 0.05% Tween20/TBS 3 ครั้ง เติม HRP conjugated monoclonal anti-HA (1:1000) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงล้างออก ด้วย 0.05%Tween20/

TBS 3 ครั้ง เติม TMB microwell substrate หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาครอบไว้ในที่มืดทิ้งนาน 30 นาที หยุดการทำปฏิกิริยาด้วยการเติม 1N HCl หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

5. การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Quantitative SDS-PAGE

5.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

วิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนบนเจลที่ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue ด้วยเครื่อง Image Scanner III (GE healthcare) โปรแกรม ImageQuant TL programme

5.1.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐานเป็นตัวควบคุมภายนอก

แยกโปรตีน BSA มาตรฐานความเข้มข้น 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234 และ 0.117 ไมโครกรัม ด้วยวิธี SDS-PAGE และวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟของ โปรตีน BSA มาตรฐาน สร้างกราฟมาตรฐานจากค่าพื้นที่ใต้กราฟของโปรตีน BSA มาตรฐาน โดยกำหนดให้แกนตั้งแสดงพื้นที่ใต้กราฟ และแกนนอนแสดงความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐาน ในหน่วยไมโครกรัม

คำนวณความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานจากกราฟ และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่ทราบค่า และความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้จากกราฟ

5.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐานเป็นตัวควบคุมภายใน

แยกโปรตีน BSA มาตรฐานความเข้มข้น 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234 และ 0.117 ไมโครกรัม ผสมกับโปรตีนรวมความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม ด้วยวิธี SDS-PAGE และวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟของโปรตีน BSA มาตรฐาน สร้างกราฟมาตรฐานจากพื้นที่ใต้กราฟของโปรตีน BSA มาตรฐาน โดยกำหนดให้แกนตั้งแสดงพื้นที่ใต้กราฟ และแกนนอนแสดงความเข้มข้นของโปรตีน BSA ในหน่วยไมโครกรัม

คำนวณความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานจากกราฟ และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่โหลดลงในเจล และความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้จากกราฟ

5.2 การหาปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 โดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐานเป็นตัวควบคุมภายใน

เตรียมโปรตีน BSA มาตรฐาน ความเข้มข้น 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234 และ 0.117 ไมโครกรัม ผสมโปรตีนรวมความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม นำไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western immunoblotting คำนวณหาความเข้มข้นของ scFv anti-p17 จากค่าพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มของแถบโปรตีน scFv anti-p17 จากการประยุกต์สูตรการคำนวณของ Tomaszewska-Gras J. และคณะ[3]

ผลการทดลอง

1. กราฟมาตรฐานจากโปรตีน BSA มาตรฐาน และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่ทราบค่า และความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้โดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐานเป็นตัวควบคุมภายนอก

แยกโปรตีน BSA มาตรฐานความเข้มข้น 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234 และ 0.117 ไมโครกรัม ด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนของโปรตีน BSA มาตรฐานเป็นแถบเดี่ยว น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 กิโลดาลตัน เมื่อเทียบกับ molecular weight marker ความเข้มของแถบโปรตีนลดลงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1 เมื่อวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนในเจลด้วยโปรแกรม ImageQuant TL programme ซึ่งแสดงผลเป็นค่าพื้นที่ใต้กราฟ พบว่า ค่าพื้นที่

$$X = \frac{P_{\text{protein peak}}}{P_{\text{int. standard}}} \times \frac{S_{\text{int. standard}}}{S_{\text{total protein}}} \times 100\ [\%]$$

สมการคำนวณปริมาณโปรตีนที่ประยุกต์จากการศึกษาของ Tomaszewska-Gras J. และ คณะ[3]

โดย X แทน ความเข้มข้นของโปรตีนที่คำนวณได้ในหน่วยเปอร์เซ็นต์
P_(protein peak) แทน ค่าพื้นที่ใต้กราฟของโปรตีนที่ต้องการทราบความเข้มข้น
P_(int. standard) แทน ค่าพื้นที่ใต้กราฟของตัวควบคุมภายใน
S_(int. standard) แทน ความเข้มข้นของตัวควบคุมภายใน
S_(total protein) แทน ความเข้มข้นของโปรตีนรวม

ใต้กราฟ ลดลงตามความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่ลดลงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2 และตารางที่ 2 ตามลำดับ เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ จากตารางที่ 2 มาสร้างกราฟมาตรฐาน ได้กราฟเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R ≥ 0.98 ดังแสดงในรูปที่ 3 ผลการคำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานจากกราฟ และค่าสัมประสิทธิ์

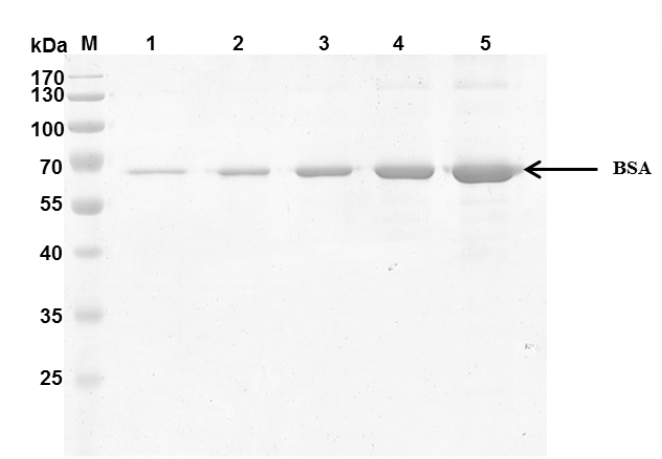

Figure 1 SDS-PAGE analysis of various concentrations of standard BSA; Lane 1-5: 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234, 0.117 µg, respectively, Lane M: Prestained protein ladder

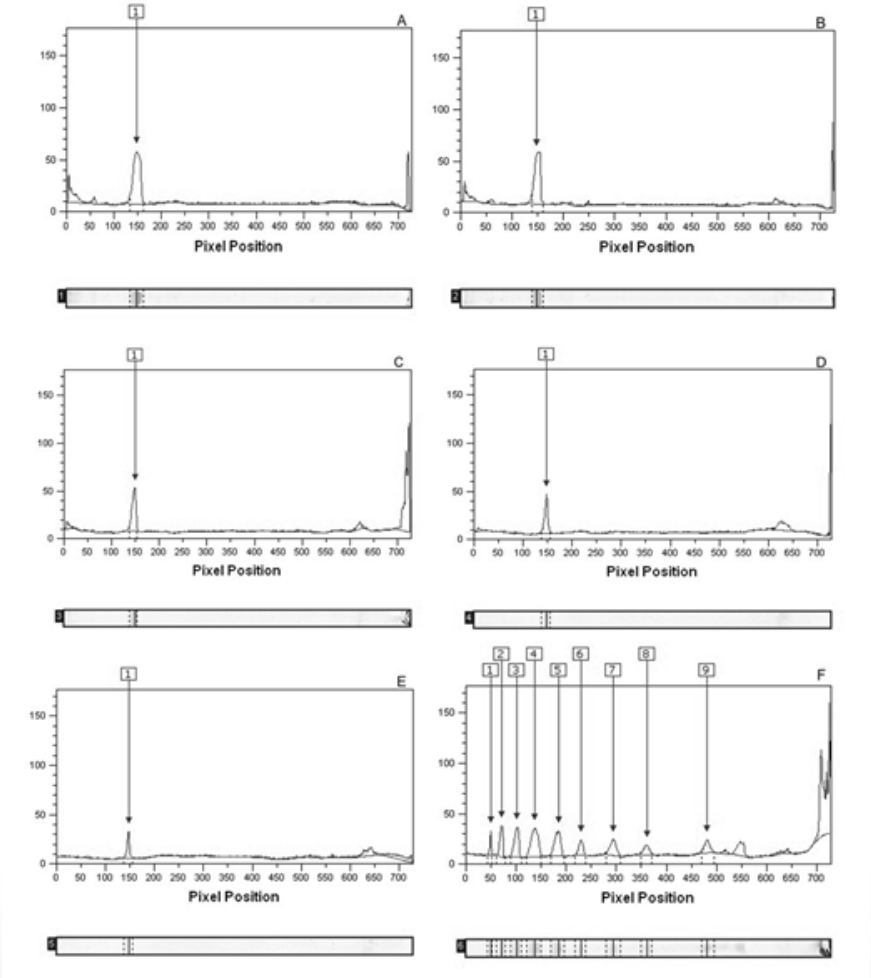

Figure 2 Peak areas of various concentrations of standard BSA intensity; (A-E) Peak areas of 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234, 0.117 µg, respectively. (F) Peak area of molecular weight marker intensity

Table 2 Peak areas of standard BSA concentration analyzed by ImageQuant TL program

Table 2 Peak areas of standard BSA concentration analyzed by ImageQuant TL program

Std BSA conc.	Peak area analysis by ImageQuant TL programme										$\bar{X}$	SD
(µg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1.875	135710	165217	205062	186223	251404	238601	218191	277552	95638	62626	183622	69215
0.937	74883	91852	106547	83902	135592	137518	132459	148659	49457	35880	99674	39101
0.469	37394	52361	63236	40238	75752	74469	59038	82627	28661	18450	53222	21577
0.234	19682	27582	33601	24974	43867	34551	37171	45206	15717	10723	29307	11628
0.117	6640	11359	14418	12325	22248	21947	21376	23315	8407	5526	14756	6943

ความแปรปรวน (%CV) จากความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้จากกราฟต่อความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่ทราบค่า คือ 1.862, 0.952, 0.495, 0.245, และ 0.099 ไมโครกรัม ตามลำดับ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนได้ 2.11, 8.58, 10.83, 10.72 และ 39.35 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จะยอมรับที่ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 35% จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐาน เท่ากับ 0.099 ไมโครกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนมากกว่า 35% ที่ความเข้มข้นดังกล่าวจึงไม่นำมาใช้เป็นตัวควบคุมภายนอกในการคำนวณปริมาณโปรตีน ในการทดลองครั้งนี้เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้จากกราฟกับค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐาน ได้กราฟเส้นตรงที่ทับกันดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งเป็นการยืนยันความน่าเชื่อถือ และความถูกต้องของการคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น โดยมีโปรตีน BSA มาตรฐานเป็นตัวควบคุมภายนอก เพื่อใช้ในการหาปริมาณโปรตีนจากเจลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.245 – 1.862 ไมโครกรัม

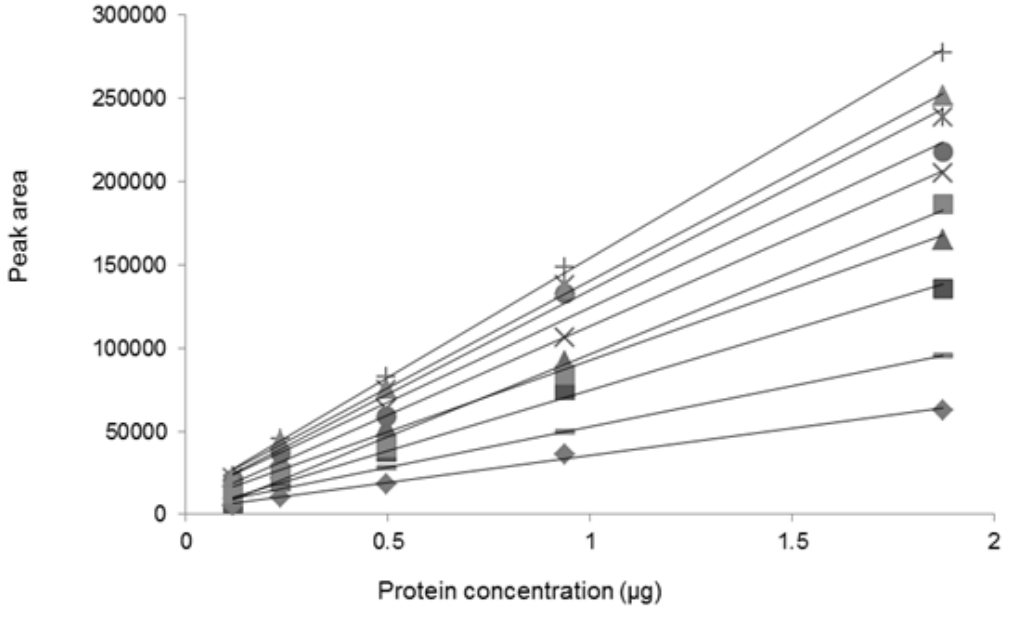

Figure 3 Standard curve of quantitative determination of scFv anti-p17 protein using standard BSA as external control from 10 experiment

Table 3 Concentration of standard BSA calculated by standard curve

Standard BSA concentration (µg)	Standard BSA concentration (µg) determined by standard curve										Mean	%CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1.875	1.875	1.843	1.865	1.913	1.855	1.827	1.817	1.860	1.865	1.830	1.862	2.11
0.937	1.007	0.990	0.939	0.877	0.962	1.021	1.072	0.958	0.755	0.933	0.952	8.58
0.469	0.492	0.531	0.531	0.435	0.500	0.519	0.433	0.497	0.517	0.513	0.495	10.83
0.234	0.249	0.242	0.252	0.281	0.255	0.200	0.243	0.235	0.249	0.252	0.245	10.72
0.117	0.069	0.054	0.072	0.125	0.088	0.100	0.106	0.082	0.182	0.105	0.099	39.35

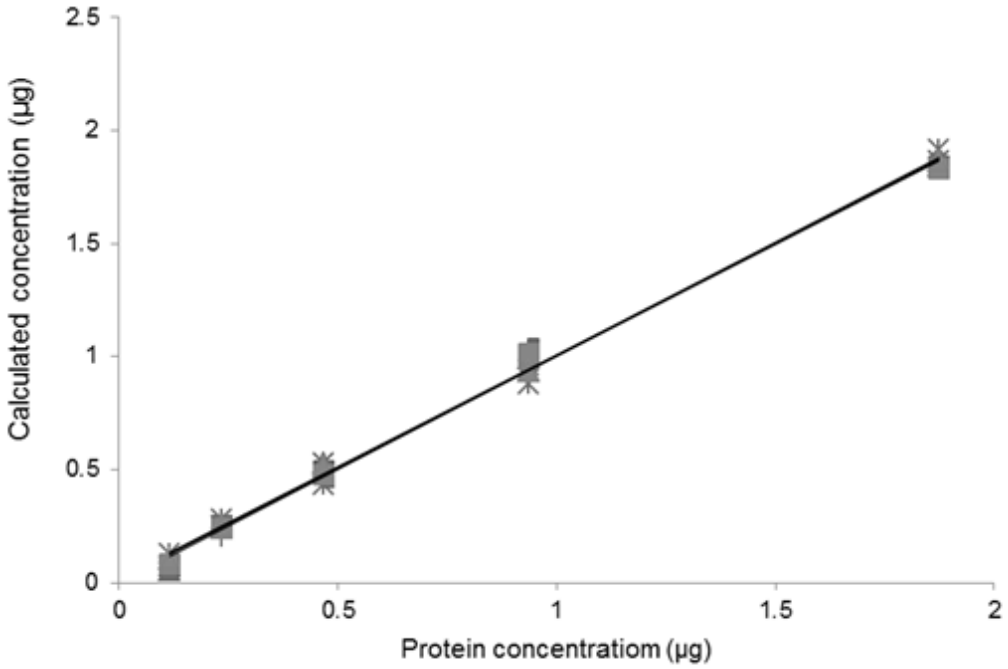

Figure 4 Relationship between standard BSA concentrations determined by standard curve actual loaded into gel from 10 experiments

2. กราฟมาตรฐานจากโปรตีน BSA มาตรฐาน และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่ทราบค่า และความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้โดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐานเป็นตัวควบคุมภายใน

แยกโปรตีนรวมความเข้มข้นโปรตีนรวม 20 ไมโครกรัม ที่ผสมกับโปรตีน BSA มาตรฐานความเข้มข้น 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234 และ 0.117 ไมโครกรัม ตามลำดับ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบตำแหน่งของโปรตีน BSA มาตรฐานมีขนาดโมเลกุลประมาณ 65 กิโลดาลตัน เมื่อเทียบกับ molecular weight marker โดยความเข้มของแถบโปรตีนลดลงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5 เมื่อวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนในเจลด้วยโปรแกรม ImageQuant TL programme ซึ่งแสดงผลเป็นค่าพื้นที่ใต้กราฟ พบว่าค่าพื้นที่ใต้กราฟลดลงตามความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่ลดลงตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 6 และตารางที่ 4

สร้างกราฟมาตรฐานจากค่าพื้นที่ใต้กราฟในตารางที่ 4 พบว่าได้กราฟเส้นตรง ค่า $R \geq 0.98$ ดังแสดงในรูปที่ 7 ผลการคำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานจากกราฟมาตรฐาน คือ 1.815, 1.045, 0.558, 0.236 และ 0.057 ไมโครกรัม ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

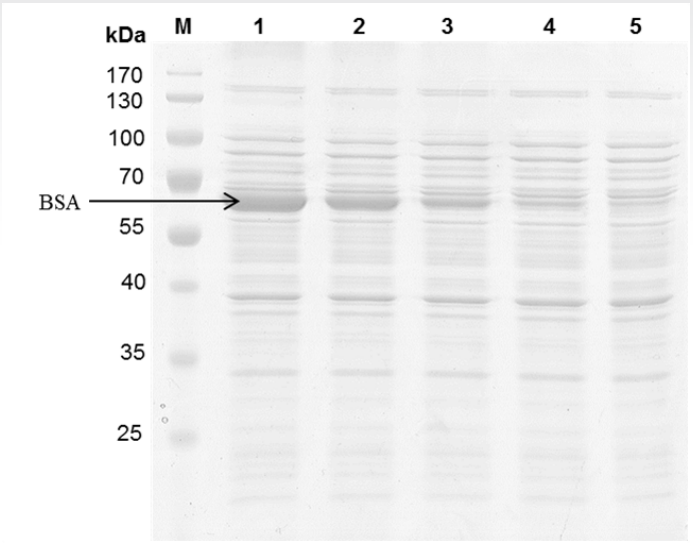

Figure 5 SDS-PAGE analysis of various concentrations of standard BSA; Lane 1-5: 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234, 0.117 µg, respectively, (Arrows), Lane M: Prestained protein ladder

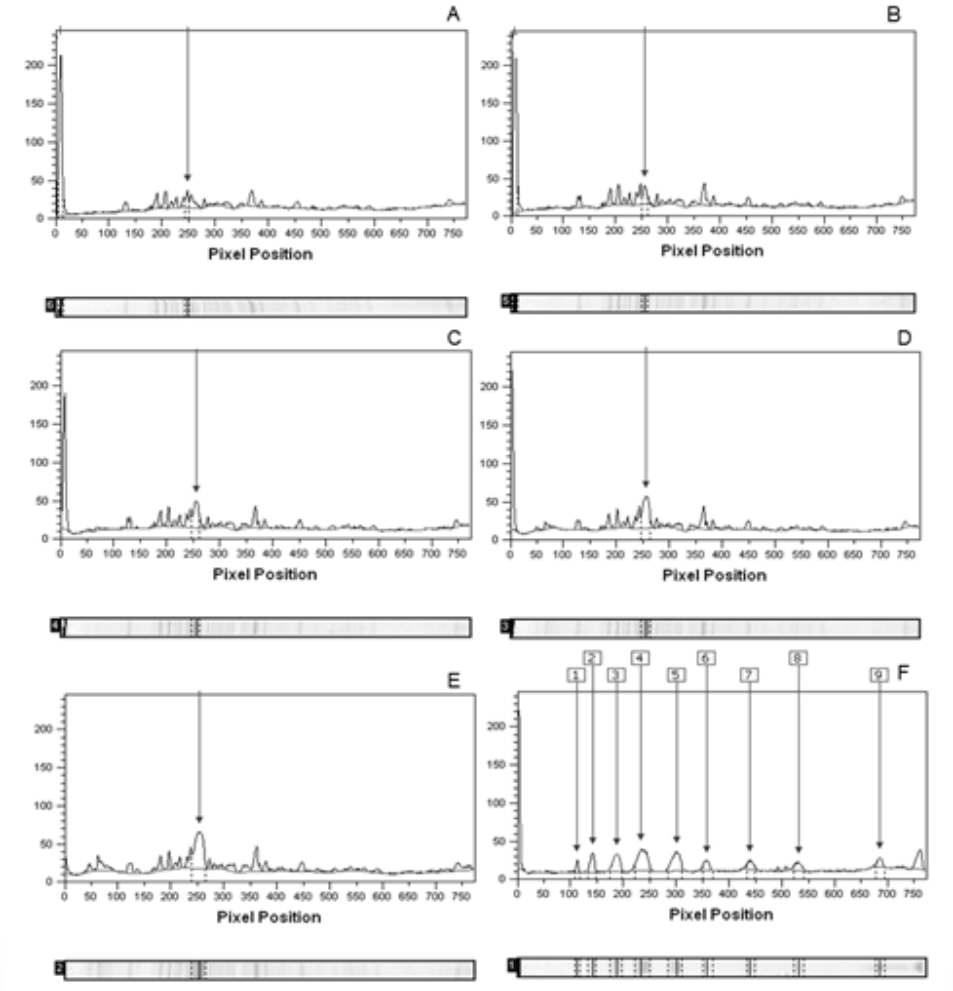

Figure 6 Peak areas of various concentrations of standard BSA intensity. (A-E) Peak areas of 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234 and 0.117 µg, respectively, (Arrows), (F) Peak areas of molecular weight marker intensity

Table 4 Peak areas of standard BSA concentration that analyzed by ImageQuant TL program

Std BSA Conc. (µg)	Peak area analysis by ImageQuant TL programme										$\bar{X}$	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1.875	94849	95132	54295	61794	103353	93832	83189	77080	76730	88350	82860	15619
0.937	53993	66048	32715	39760	66441	65896	56846	52216	44560	56057	53453	11542
0.469	30744	33909	17256	20714	51731	43796	39596	38802	30672	39908	34713	10398
0.234	16559	17697	8891	11032	29632	26261	29422	28797	22350	26846	21749	7753
0.117	8823	6971	4720	7380	17386	19803	16486	15510	16201	16175	12946	5356

จากความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้จากกราฟต่อความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่ทราบค่า คือ 2.459, 6.605, 10.054, 17.442 และ 62.282 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จะยอมรับที่ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 35%[3] เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้จากกราฟกับค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่กำหนดค่า ได้กราฟเส้นตรง ดังแสดงใน รูปที่ 8 เป็นการยืนยันความน่าเชื่อถือ และความถูกต้องของการคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น โดยมีโปรตีน BSA มาตรฐาน เป็นตัวควบคุมภายในเพื่อใช้ในการหาปริมาณโปรตีนจากเจลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.234 -1.875 ไมโครกรัม

3. คำนวณปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 ด้วยวิธี quantitative SDS-PAGE โดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐานเป็นตัวควบคุมภายใน

เมื่อแยกโปรตีนรวมที่ประกอบด้วยโปรตีน scFv anti-p17 ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐานความเข้มข้น 1.875 ไมโครกรัม เป็นตัวควบคุมภายใน และตรวจหาโปรตีน scFv anti-p17 ด้วยวิธี western immunoblotting พบแถบโปรตีน scFv anti-p17 ขนาด 27 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10 และให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี ELISA

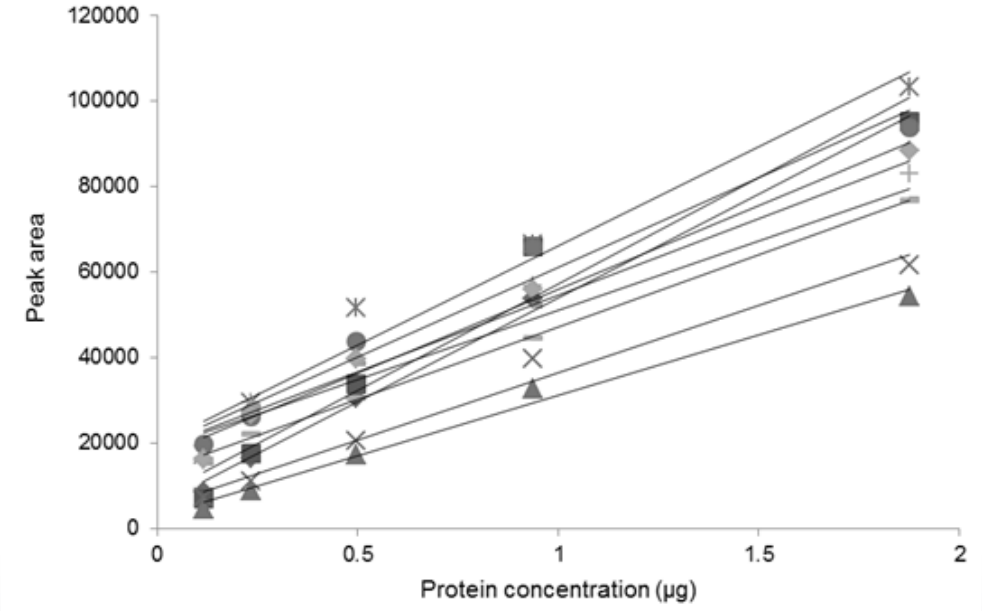

Figure 7 Standard curves of quantitative determination of scFv anti-p17 protein using standard BSA as internal control from 10 experiments

Table 5 Concentrations of standard BSA calculated by standard curve

Standard BSA concentration (µg)	Standard BSA concentration (µg) determined by standard curve										Mean	%CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1.875	1.833	1.746	1.809	1.796	1.803	1.908	1.778	1.796	1.799	1.875	1.815	2.46
0.937	1.004	1.176	1.056	1.099	1.003	1.109	1.056	1.028	0.918	0.997	1.045	6.605
0.469	0.534	0.546	0.516	0.496	0.684	0.511	0.580	0.572	0.612	0.505	0.558	10.05
0.234	0.246	0.228	0.224	0.190	0.204	0.251	0.160	0.286	0.302	0.258	0.238	17.44
0.117	0.090	0.018	0.078	0.074	*	*	0.006	*	*	0.075	0.057	62.28

* The standard BSA concentration was unable to calculate by standard curve

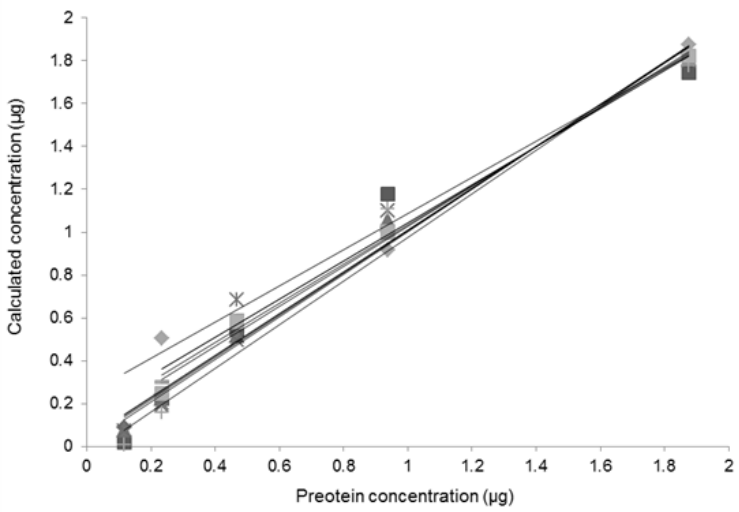

Figure 8 Relationship between standard BSA concentrations determined by standard curve and actual loaded into gel from 10 experiments

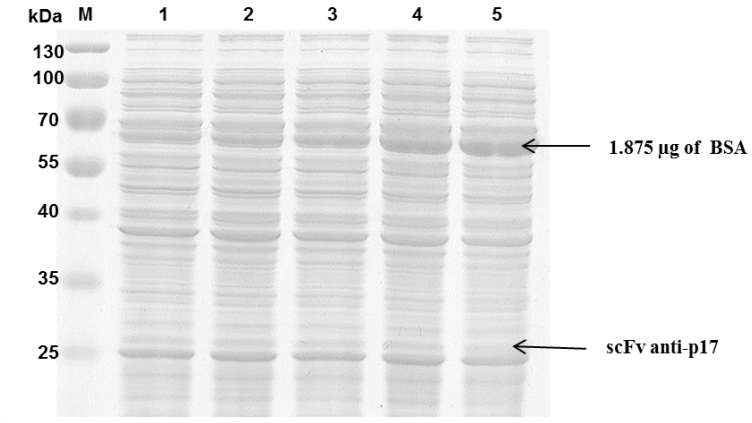

Figure 9 SDS-PAGE analysis for quantitative determination of scFv anti-p17 using 1.875 µg of standard BSA as internal control; Lane 1-5: crude protein (Solid arrows) mixed with 1.875 µg of standard BSA (Dash arrows), Lane M: Prestained protein ladder

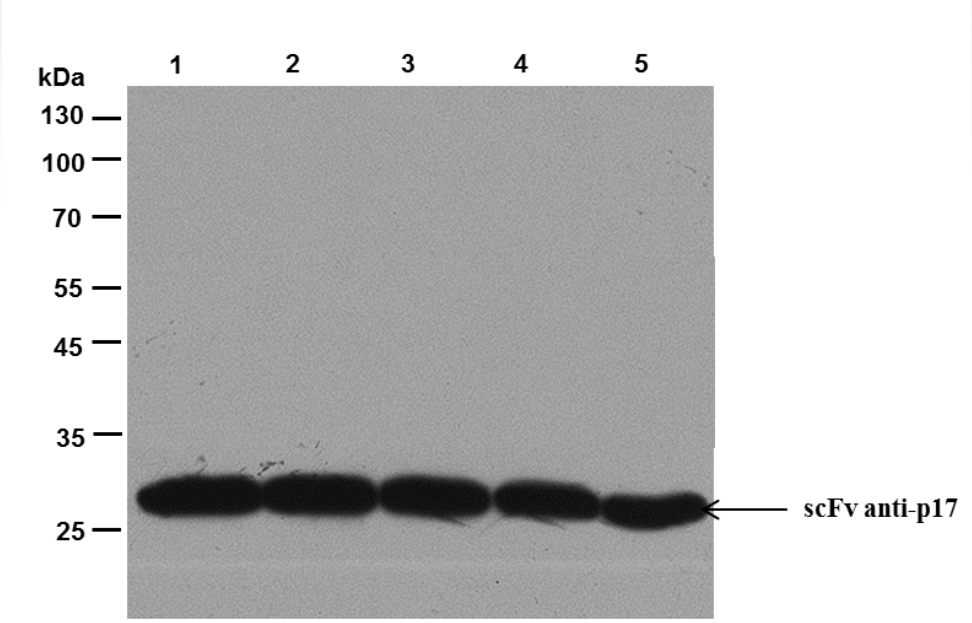

Figure 10 Western immunoblotting analysis of scFv anti-p17; Lane 1-5: 20 µg of crude protein mixed with 1.875 µg of standard BSA

จากการวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟของโปรตีน scFv anti-p17 ด้วยโปรแกรม ImageQuant TL programme ได้ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของ scFv anti-p17 คือ 26,246 ดังแสดงในตารางที่ 6 และเมื่อนำไปคำนวณตามสูตรที่ประยุกต์จากสูตรการคำนวณของ Tomaszewska-Gras J. และคณะ3คำนวณปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 ได้ 3.25% หรือ 1.637 มิลลิกรัมต่อปริมาตรการเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

Table 6 Peaks area of scFv anti-p17 bands on SDS gels that analyzed by ImageQuant TL program

Experiment	Peak areas	Mw
1	24,510	26.328
2	22,598	26.550
3	28,776	27.005
4	26,523	27.005
5	28,826	27.236
Mean	26,246	26.82
SD	2713	0.37

4. การหาปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 ในโปรตีนรวมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเทคนิค quantitative SDS-PAGE

การหาปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 จากโปรตีนรวม โดยหาปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 จากโปรตีนรวมที่ผลิตได้จำนวน 19 ตัวอย่าง โดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐานความเข้มข้น 1.875 ไมโครกรัม เป็นตัวควบคุมภายใน เมื่อทดสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western immunoblotting พบแถบโปรตีนขนาด 27 กิโลดาลตัน และให้ผลบวกเมื่อทดสอบโปรตีนด้วยวิธี ELISA เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มของแถบโปรตีนตามสูตรที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าสามารถคำนวณปริมาณ scFv anti-p17 ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 7

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐาน ความเข้มข้น 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234 และ

Table 7 Quantitative SDS-PAGE method of scFv anti-p17 from crude protein

Samples	OD	IPTG[a] (μM)	Temperature (°C)	Time (h)	Agitation rate (rpm)	Total extracellular protein (TP) (mg/ml)	Recombinant scFv anti-p17[b] (p17) (OD450nm)	scFv anti-p17[c] (mg/l)
1	1.5	100	25.0	12	200	6.40±0.03	1.578±0.02	1.00
2	0.9	150	25.0	12	200	7.10±0.02	0.603±0.01	0.51
3	2.0	200	23.0	18	250	14.4±0.04	0.578±0.03	0.72
4	2.5	250	23.0	18	250	16.5±0.01	0.250±0.01	0.31
5	3.2	300	21.0	24	250	5.00±0.02	0.122±0.02	0.13
6	3.6	350	21.0	24	250	5.30±0.04	0.459±0.03	0.33
7	1.0	120	25.8	18	210	9.35±0.05	1.157±0.05	0.84
8	3.0	300	22.0	18	250	4.68±0.03	0.437±0.02	0.28
9	0.9	98	25.3	13	194	12.65±0.02	1.441±0.01	1.15
10	2.5	216	23.1	16	230	4.04±0.01	0.418±0.04	0.24
11	2.0	123	24.4	14	206	5.46±0.04	0.976±0.05	0.73
12	0.9	80	25.9	13	194	6.04±0.02	1.007±0.03	0.82
13	1.7	58	25.5	16	202	4.53±0.03	2.246±0.01	1.64
14	1.9	70	26.0	18	202	2.50±0.05	2.570±0.05	0.97
15	2.5	90	25.3	18	231	3.17±0.04	1.443±0.06	1.05
16	0.7	97	25.5	18	191	4.26±0.01	1.664±0.09	1.01
17	0.8	128	24.6	18	157	4.78±0.02	2.365±0.09	1.72
18	0.9	122	24.7	18	168	5.96±0.06	0.537±0.04	0.51
19	1.6	54	26.1	18	229	3.93±0.02	1.091±0.01	0.81

[a] optical density (OD) of cell for IPTG induction, [b] optical density (OD) of ELISA method,
[c] scFv anti-p17 concentration that calculated by quantitative SDS-PAGE method

0.117 ไมโครกรัม เป็นตัวควบคุมภายนอก สามารถสร้างกราฟเส้นตรง (R ≥ 0.98) ดังนั้นหากความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานเพิ่มขึ้น ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้จะเพิ่มขึ้นตาม เมื่อคำนวณหาปริมาณของโปรตีน BSA มาตรฐาน จากกราฟมาตรฐาน โดยกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 35%[3] พบว่า โปรตีน BSA มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.117 ไมโครกรัม คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนได้ 39.35% ซึ่งมากกว่าค่าที่กำหนดไว้ ดังนั้นหากโปรตีนมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.234 ไมโครกรัม เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนค่าที่ได้ไม่อยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับ และเมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้จากกราฟกับความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่ทราบค่า พบว่าได้กราฟเส้นตรงทั้ง 10 เส้น ทับกันทั้งหมด มีค่า R ≥ 0.98 แสดงให้เห็นว่าโปรตีน BSA มาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.234 ไมโครกรัม สามารถใช้เป็นตัวควบคุมภายนอกได้

เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐาน ความเข้มข้น 1.875, 0.9375, 0.469, 0.234 และ 0.117 ไมโครกรัม เป็นตัวควบคุมภายใน ของโปรตีนรวมที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 20 ไมโครกรัม สามารถสร้างกราฟเส้นตรง (R ≥ 0.98) แสดงให้เห็นว่าค่าพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้เพิ่มขึ้นตามค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐาน และปริมาณของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 35% แต่พบว่าโปรตีน BSA มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.117 ไมโครกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 62.282 ซึ่งมากกว่าค่าที่กำหนดไว้[3] ดังนั้นหากปริมาณโปรตีนมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.234 ไมโครกรัม เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณค่าที่ได้ไม่อยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับ และเมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่คำนวณได้จากกราฟกับความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐานที่ทราบค่า พบว่าได้กราฟเส้นตรงทั้ง 10 เส้น (R ≥ 0.98) ดังนั้นโปรตีน BSA มาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.234 ไมโครกรัม สามารถใช้เป็นตัวควบคุมภายในได้

นอกจากการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐาน เป็นตัวควบคุมภายนอก และตัวควบคุมภายในปัจจัยที่มีผลต่อค่าความถูกต้องในการหาปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค quantitative SDS-PAGE คือขั้นตอนการย้อมโปรตีน และปริมาตรโปรตีนที่โหลดในเจล การศึกษาครั้งนี้ย้อมโปรตีนด้วย Coomassie blue R-250 และล้างสีส่วนเกินออกด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น และปริมาตรของสีย้อม ระยะเวลาในการย้อม และการล้างสีส่วนเกิน มีความสำคัญอย่างมากในการหาปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิคนี้ เนื่องจากต้องคำนวณปริมาณจากพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มของแถบโปรตีน ดังนั้นในขั้นตอนการย้อมโปรตีนแต่ละครั้ง ระยะเวลาและปริมาตรของสารที่ใช้ต้องเท่ากันทุกครั้ง[3] และปริมาตรของโปรตีนตัวอย่างที่ใช้โหลดลงในเจล ต้องเป็นปริมาตรที่พอดีกับปริมาตรของหลุมบนเจล ซึ่งหากโหลดโปรตีนปริมาณมากเกินไปจนล้นออกนอกหลุม อาจทำให้ค่าปริมาณโปรตีนที่ต้องการไม่สอดคล้องกับปริมาตรโปรตีนที่โหลดลงบนเจล หรือหากโหลดโปรตีนน้อยเกินไปอาจทำให้ไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่ต้องการวัดปริมาณบนเจล ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้

โหลดโปรตีนปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรที่พอดีและไม่ล้นออกนอกหลุมเจล

จากการสร้างกราฟมาตรฐานจากโปรตีน BSA มาตรฐาน โดยได้กราฟเชิงเส้น ใช้โปรตีน BSA มาตรฐานเป็นตัวควบคุมภายใน ในการหาปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 โดยกำหนดตำแหน่งแถบโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยวิธี western immunoblotting และทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง พบว่าโปรตีน scFv anti- p17 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 27 กิโลดาลตัน จึงเลือกแถบโปรตีนตำแหน่งนี้ในการหาปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 โดยใช้สูตรคำนวณดังที่กล่าวมาข้างต้น ใช้ โปรตีน BSA มาตรฐานความเข้มข้น 1.875 ไมโครกรัม เป็นตัวควบคุมภายใน เนื่องจากให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยที่สุด พบว่าสามารถคำนวณปริมาณโปรตีน scFv anti-p17 ได้ 3.275% คิดเป็น 1.637 มิลลิกรัมต่อปริมาตรการเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร และการใช้โปรตีน BSA มาตรฐาน เป็นตัวควบคุมภายใน เพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนมีค่าความไวที่ 0.234 ไมโครกรัม หากโปรตีนที่ต้องการหาปริมาณมีค่าต่ำกว่า 0.234 ไมโครกรัม จะไม่สามารถคำนวณได้ด้วยวิธีนี้ เนื่องจากค่าไม่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น

เมื่อทดลองสุ่มตัวอย่างโปรตีน scFv anti-p17 จากโปรตีนรวมจำนวน 19 ตัวอย่าง ในการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะต่าง ๆ แตกต่างกัน 19 สภาวะ โดยใช้โปรตีน BSA มาตรฐานที่ความเข้มข้น 1.875 ไมโครกรัม เป็นตัวควบคุมภายใน ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ พบว่าสามารถคำนวณปริมาณโปรตีนได้จากสูตรทุกตัวอย่าง และเมื่อนำโปรตีน scFv anti-p17 มาทดสอบด้วย western immunoblotting และ ELISA พบว่าให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับวิธี quantitative SDS-PAGE

การศึกษาครั้งนี้เป็นงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้วิธี SDS-PAGE เพื่อหาปริมาณ extracellular protein ที่ผลิตจากเชื้อจุลชีพ ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิค quantitative SDS-PAGE ในการหาปริมาณโปรตีนที่สร้างจากเชื้อจุลชีพนอกเซลล์ โดยพัฒนาเทคนิคจากการศึกษาของ Wai-hoe และคณะ[4] การศึกษาครั้งนี้มีความสัมพันธ์กับการศึกษาของ Zupan และคณะได้พัฒนาเทคนิคการแยกและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนผนังเซลล์จากเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดลุกลาม และไม่ลุกลาม ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยโปรตีนตัวอย่างไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ จากการทดลองสามารถแยกโปรตีนได้กว่า 20 ชนิดที่มีขนาดตั้งแต่ 60 ถึง 220 กิโลดาลตัน และคำนวณค่าความสามารถในการให้ผลซ้ำ (reproducibility) เท่ากับ 0.3 %CV[12] ผลการศึกษาที่ได้ยังมีความสัมพันธ์กับ LI และคณะที่ได้ตรวจหาปริมาณโปรตีนในน้ำตาโดยใช้ SBIT เป็นตัวควบคุมภายใน พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 10% ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกกว่าเมื่อเทียบกับการแยกโปรตีนด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) และใช้สิ่งส่งตรวจปริมาตรน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ที่ใช้น้ำตาปริมาตร 10 ไมโครลิตร[5] จะเห็นได้ว่าเทคนิค SDS-PAGE แม้จะเป็นเทคนิคในการแยกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ออกจากโปรตีนรวมโดยอาศัยขนาดของโปรตีน ซึ่งใช้ทั่วไปในงานวิจัย เพื่อใช้ตรวจหาคุณภาพโปรตีนในโปรตีนรวมเท่านั้น แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวในการหาปริมาณโปรตีนเป้าหมายจากโปรตีนรวมด้วยวิธีการอย่างง่าย อย่างไรก็ตามการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีนี้ต้องทราบขนาดที่จำเพาะของโปรตีนที่ต้องการตรวจวัด และควรมีตัวบ่งชี้ที่ชัดเจนที่สามารถบอกตำแหน่งของโปรตีนในเจลได้ เพื่อให้ทราบตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แน่นอน และต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญเพื่อต้องการให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยที่สุด เนื่องจากวิธีนี้เป็นการประยุกต์ใช้การหาปริมาณโปรตีนจากโปรตีนรวมด้วยวิธี quantitative SDS-PAGE และคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยใช้สูตรคำนวณทางคณิตศาสตร์เทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับโปรตีนชนิดอื่นที่มีขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ที่ซับซ้อน การหาปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิคนี้จะช่วยลดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีน และสามารถหาปริมาณโปรตีนที่ต้องการได้จากโปรตีนรวมโดยตรง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

1. Regan FM, Williams RM, McDonald A, Umpleby AM, Acerini CL, O'Rahilly S, et al. Treatment with recombinant human insulin-like growth factor (rhIGF)-I/rhIGF binding protein-3 complex improves metabolic control in subjects with severe insulin resistance. J. Clin Endocrinol Metab 2010; 95(5): 2113-22.
2. Weisser NE, Hall JC. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. Biotechnol Adv 2009; 27(4): 502-20.
3. Tomaszewska-Gras J, Kijowski J, Schreurs FJ. Quantitative determination of titin and nebulin in poultry meat by SDS-PAGE with an internal standard. Meat Sci 2002; 62(1): 61-6.
4. Wai-Hoe L, Wing-Seng L, Ismail Z, Lay-Harn G. SDS-PAGE-based quantitative assay for screening of kidney stone disease. Biol Proced Online 2009; 11: 145-60.
5. Li K, Chen Z, Duan F, Liang J, Wu K. Quantification of tear proteins by SDS-PAGE with an internal standard protein: A new method with special reference to small volume tears. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2010; 248(6): 853-62.
6. Rícný J, Soukup T. Comparison of new ELISA method with established SDS-PAGE method for determination of muscle myosin heavy chain isoforms. Physiol Res 2011; 60(6): 899-904.
7. Leong SSJ, Chen WN. Preparing recombinant single chain antibodies. Chem Eng Sci 2008; 63(6): 1401-14.
8. Lim KP, Li H, Nathan S. Expression and purification of a recombinant scFv towards the exotoxin of the pathogen, Burkholderia pseudomallei. J Microbiol 2004; 42(2):126-32.
9. Tragoolpua K, Intasai N, Kasinrerk W, Mai S, Yuan Y, Tayapiwatana C. Generation of functional scFv intrabody to abate the expression of CD147 surface molecule of 293A cells. BMC Biotechnol 2008; 8(1).
10. Mukhtar MM, Li S, Li W, Wan T, Mu Y, Wei W, et al. Single-chain intracellular antibodies inhibit influenza virus replication by disrupting interaction of proteins involved in viral replication and transcription. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41(3): 554-60.
11. Gal-Tanamy M, Zemel R, Bachmatov L, Jangra RK, Shapira A, Villanueva RA, et al. Inhibition of protease-inhibitor-resistant hepatitis C virus replicons and infectious virus by intracellular intrabodies. Antiviral Res. 2010; 88(1): 95-106.
12. Zupan J, Mavri J, Raspor P. Quantitative cell wall protein profiling of invasive and non-invasive Saccharomyces cerevisiae strains. J Microbiol Methods. 2009; 79(3): 260-265.