Srinagarind Hosp Med J 1991 ; 6(3) : 185-190

การหาแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* : I. การวิเคราะห์แอนติเจนที่เตรียมโดยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง ด้วยวิธี *SDS-PAGE* และ *immunoblot*

สุวิน ว่องวัจนะ สุพัตรา รัตนตระกูลเดชา** สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน* อัญชลี ตัตตะวะศาสตร์* กนกรัตน์ นันทิรุจ*** รศนา วงศ์รัตนชีวิน**** ชาตรี เศรษฐเสถียร******

** ภาควิชาจุลชีววิทยา, *** ภาควิชาอายุรศาสตร์, ***** ภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น *****ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

Search for specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* : I. An analysis of sonic extracted antigens of *P.pseudomallei* by SDS-PAGE and immunoblot

Suwin Wongwajana M.Sc.*, Supatra Ratanatragooldecha B.Sc.**, Surasakdi Wongratanacheewin Ph.D.*, Unchalee Tattawasart M.Sc.*, Kanokrut Nuntirooj M.D.***, Rasana Wongratanacheewin Ph.D.****, Chatri Settasatian M.Sc.*****

**Department of Microbiology, ***Department of Medicine and *****Department of Pathology, Faculty of Medicine, **Department of Microbiology, Faculty of Science, ****Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand.*

Melioidosis is still a fatal disease with high mortality rate, especially, in septicemic melioidosis. Clinical manifestations of this disease are protean and mimick those of other infectious diseases. Laboratory diagnosis is often too late as the patients died before the hemocultures were positive. Thus, measurement of antibody level is of the most appropriate diagnostic approach. In the past, the use of crude or non-specific antigens may account for false-positive results and high antibody levels in normal people in endemic areas. In this study, a search for specific antigens of *P. pseudomallei* was carried out by using SDS-PAGE and immunoblot techniques. The sonic extracted antigens obtained from 30 isolates of *P. pseudomallei* were analysed. They all showed the same protein profiles. The sonicated antigens which were found to be specific for *P. pseudomallei* had the molecular weight of 21, 18, 15.5 and 13 kDa.

Key words : *เมลิออยโดสิส, Pseudomonas pseudomallei, แอนติเจน,* SDS-PAGE, Western blot

บทคัดย่อ

โรคเมลิออยโอสิส ยังคงเป็นโรคที่ก่อให้เกิดอัตราตายค่อนข้างสูง โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคนี้สามารถแสดงได้หลายรูปแบบ ซึ่งคล้ายคลึงกับโรคติดเชื้ออื่น ๆ ทำให้การวินิจฉัยจากอาการทางคลินิกกระทำได้ลำบาก การวินิจฉัยที่แน่นอนต้องอาศัยผลของการเพาะเชื้อซึ่งต้องใช้เวลาหลายวัน ทำให้ผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตลงเสียก่อน การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *P.pseudomallei* ยังคงมีปัญหาทางด้านความจำเพาะที่ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องมาจากแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบยังมีความจำเพาะไม่เพียงพอ การศึกษาครั้งนี้ เป็นการหาแอนติเจนที่ที่จำเพาะของเชื้อ *P. pseudomallei* โดยใช้วิธี SDS-PAGE ร่วมกับ immunoblot ซึ่งพบว่าลักษณะรูปแบบของแอนติเจนที่เตรียมโดยวิธีทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงของเชื้อ *P.pseudomallei* ทั้ง 30 isolates มีรูปแบบที่เหมือนกัน และแอนติเจนที่จำเพาะสำหรับเชื้อ *P. pseudomallei* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 21, 18, 15.5 และ 13 kDa.

บทนำ

เมลิออยโดสิส (Melioidosis) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* โรคนี้พบมากทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย และทางแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้[1] สำหรับประเทศไทยจะพบโรคนี้มากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ[2,3] และภาคใต้[4] การระบาดของโรคมักจะพบในช่วงฤดูฝนซึ่งคาดว่าผู้ป่วยจะได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ตามดินและน้ำเข้าทางบาดแผลหรือสูดหายใจเข้าไป ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสชนิดเซ็พติซีเมีย มีอัตราการตายค่อนข้างสูงถึงมากกว่า 80%[5] และส่วนมากมักจะเสียชีวิตก่อนที่จะทราบผลการเพาะเชื้อ อาการทางคลินิกของผู้ป่วยเมลิออยโดสิสมีความคล้ายคลึงกับโรคติดเชื้ออื่น ๆ หลายชนิด[1,6,7] ทำให้การวินิจฉัยโรคจากอาการค่อนข้างจะทำได้ยาก การวินิจฉัยที่แน่นอนสำหรับโรคนี้ ต้องอาศัยผลการเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งต้องใช้เวลาหลายวัน หรือโดยการตรวจหาระดับแอนติบอดี ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น indirect hemagglutination (IHA), complement fixation (CF) และ indirect fluorescent antibodies staining (IFA) แต่ก็ยังคงมีปัญหาทางด้านผลบวกปลอม และระดับของแอนติบอดีในประชากรแต่ละพื้นที่ซึ่งมีระดับแอนติบอดีที่เป็น background ที่แตกต่างกัน หรือในบางครั้งระดับแอนติบอดีกลับไม่มีความสัมพันธ์กับอาการของผู้ป่วย[8,13] ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบยังมีความจำเพาะและความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการพยายามที่จะหาแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ *P. pseudomallei* ที่เตรียมโดยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง แล้วศึกษาโดยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ร่วมกับ Western blot เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและจำเพาะสำหรับผู้ป่วยเมลิออยโดสิสต่อไป ซึ่งจากผลการศึกษาพบแอนติเจนที่จำเพาะที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน อยู่ 4 ชนิด (band) และสามารถนำมาใช้ช่วยประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วยเมลิออยโดสิสได้

วัสดุและวิธีการ

ซีรั่มและเชื้อ

ซีรั่มจำนวนทั้งหมด 43 ตัวอย่าง ประกอบด้วยซีรั่มของผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาล

ศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งมีผลการเพาะเชื้อจากเลือด (hemoculture) เป็น *P. pseudomallei* 31 ราย, *Staphylococcus* coagulase negative 5 ราย, *Klebsiella pneumoniae* 2 ราย, *Escherichia coli* 1 ราย และ *Klebsiella pneumoniae* ร่วมกับ ∝ *Streptococcus* group D 1 ราย, ซีรั่มคนปกติ 3 ราย, pooled positive serum ซึ่งได้มาจากการรวมซีรั่มของผู้ป่วยเมลิออยโดสิสที่มีผลการเพาะเชื้อจากเลือดเป็น *P. pseudomallei* และ pooled negative serum ซึ่งได้มาจากการรวมซีรั่มของคนปกติที่มีระดับ melioid titer ต่ำ ๆ

เชื้อ *P. pseudomallei* จำนวน 30 isolates ที่แยกได้จากการเพาะเชื้อจากเลือดผู้ป่วย

การเตรียมแอนติเจนเพื่อวิเคราะห์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *P. pseudomallei* ใน tryptic soy broth เป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°ซ หลังจากนั้นนำเชื้อมา flood ลงบน tryptic soy agar แล้วอบเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ harvest เซลล์โดยใช้ normal saline solution (NSS) หลังจากปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4°ซ (BECKMAN, model J-6B) ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยใช้ NSS จากนั้นใส่ Phenylmethylsulfonyl (PMSF) และ N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone (TPCK) อย่างละ 0.1 mM แล้วจึงนำไปทำให้เซลล์แตกโดยเครื่อง ultrasonic disintegrator (Soniprep 150) ที่ amplitude 20 ไมครอน เป็นเวลา 15 นาที (2 นาที พัก 1 นาที) โดยแช่เซลล์ไว้ในน้ำแข็งตลอดเวลา จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4°ซ (BECKMAN, model J2-21, rotor JA 20.1) แล้วนำส่วนน้ำใส (supernatant) มากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีของ Lowry.[14] เก็บ sonicated antigen ที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ −20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

การวิเคราะห์แอนติเจนโดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ immunoblot

SDS-PAGE: sonicated antigen จะถูกแยกตามขนาดโมเลกุล โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli[15] โดยใช้ 12% separating gel และ 4% stacking gel แล้วทำการย้อมสีเพื่อดูตำแหน่งของโปรตีนขนาดต่าง ๆ ด้วย 0.2% Coomassie brilliant blue R

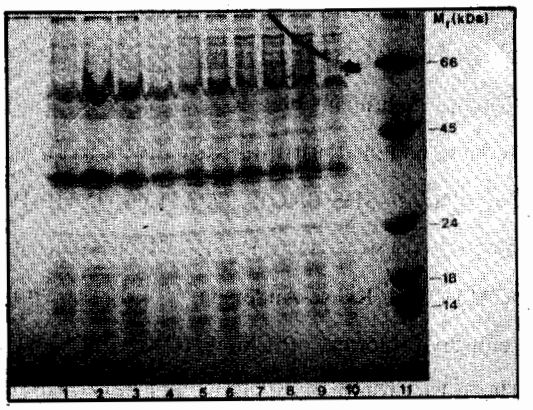
Western blot : หลังจากที่แยกแอนติเจนตามขนาดโมเลกุลโดย SDS-PAGE แล้วจะทำการถ่ายเทแอนติเจนจากวุ้นลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสตามวิธีของ Kyhse-Anderson[16] ด้วยเครื่อง semi-dry blotter (SEMI-PHOR, TE 70, HOEFER) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 0.8 มิลลิแอมแปร์/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

Immunostaining : เมื่อล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย NSS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีแล้ว ทำการ block ส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาของแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย 5% skim milk ซึ่งละลายใน 0.02 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5 (Tris buffer) ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ข้ามคืน จากนั้นตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นแถบ (strip) กว้าง 0.5 มิลลิเมตร นำแต่ละแถบมาทำปฏิกิริยากับซีรั่มผู้ป่วยแต่ละราย โดยเจือจางซีรั่มผู้ป่วย 1:100 ด้วย 2% skim milk ซึ่งละลายใน Tris buffer และปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกแล้ว จึงใส่ rabbit anti-human Ig-peroxidase

conjugate (Sigma) เจือจาง 1:100 ใน 2% skim milk ซึ่งละลายใน Tris buffer เมื่อปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารสับสเตรท-โครโมเจน α napthol/H_2O_2 เมื่อปฏิกิริยาเกิดจนมีสีเข้มชัดเจนแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง

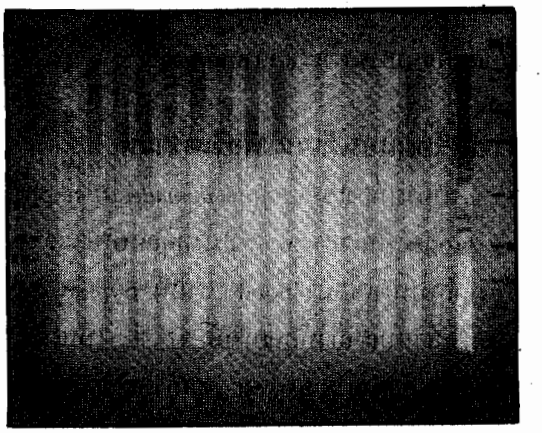
ผลการทดลอง

ลักษณะรูปแบบแอนติเจนของเชื้อ *P. pseudomallei* isolate ต่าง ๆ ที่เตรียมโดยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง และโดยวิธี SDS-PAGE ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1 จากการเปรียบเทียบลักษณะรูปแบบของแอนติเจนของเชื้อ *P. pseudomallei* จำนวน 10 isolates ทั้ง 30 isolates พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกเพียง 1 isolate เพื่อจะมาทำ Western blot และ immunostaining ต่อไป



รูปที่ 1 SDS-PAGE pattern ของแอนติเจนของเชื้อ *P. pseudomallei* จำนวน 10 isolates ที่เตรียมโดยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (lanes ที่ 1-10), lane ที่ 11 เป็น standard markers. ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R.

จากการทำ Western blot แล้วทำปฏิกิริยากับซีรั่มของผู้ป่วยต่าง ๆ พบว่า ชนิด (band) ของแอนติเจนที่ให้ผลบวกเฉพาะเมื่อทดสอบกับซีรั่มของผู้ป่วยเมลิออยโดสิส แต่ให้ผลลบเมื่อทดสอบกับซีรั่มของผู้ป่วยโรคอื่น ๆ และซีรั่มของคนปกติ คือ ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21, 18, 15.5 และ 13 kDa ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 2 ความถี่ของแอนติเจนแต่ละชนิดที่ทำปฏิกิริยากับซีรั่มผู้ป่วยต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าซีรั่มของผู้ป่วยเมลิออยโดสิสที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21, 18, 15.5 และ 13 kDa มีจำนวน 6, 9, 5 และ 7 ราย และถ้าคิดเป็นร้อยละ จะมีค่าเท่ากับ 19, 28, 16 และ 22 ตามลำดับ ส่วนจำนวนซีรั่มของผู้ป่วยเมลิออยโดสิสที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่งใน 4 ชนิดนี้ มีจำนวนเท่ากับ 17 ราย ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 53



รูปที่ 2 แสดง Western blot analysis. Lanes ที่ 1-7 ทดสอบกับซีรั่มผู้ป่วยเมลิออยโดลิสแต่ละคน, lane ที่ 8 ทดสอบกับซีรั่มผู้ป่วย *Staphylococcus* coagulase negative, lane ที่ 9 ทดสอบกับซีรั่มผู้ป่วย *K. pneumoniae*, lane ที่ 10 ทดสอบกับซีรั่มผู้ป่วย *E. coli*, lane ที่ 11 ทดสอบกับซีรั่มผู้ป่วย *K. pneumoniae* + ∝ Streptococcus group D, lane ที่ 12 ทดสอบกับซีรั่มคนปกติ, lane ที่ 13 ทดสอบกับ pooled negative serum, lane ที่ 14 ทดสอบกับ pooled positive serum. Lane ที่ 15 เป็น control strip, lane ที่ 16 เป็น strip ที่ย้อมดูตำแหน่งของแอนติเจนชนิด (band) ต่าง ๆ ด้วย india ink staining (17). เครื่องหมายลูกศรชี้แสดงตำแหน่งของแอนติเจนที่จำเพาะ

ตารางที่ 1 จำนวนร้อยละของซีรั่มของผู้ป่วยต่าง ๆ ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ *P. pseudomallei* โดยวิธี immunoblot

ซีรั่ม	จำนวนที่ทดสอบ	จำนวนที่ทำปฏิกิริยา (ร้อยละ)				
		21 kDa	18 kDa	15.5 kDa	13 kDa	21, 18, 15.5 หรือ 13 kDa
เมลิออยโดลิส	32	6(19)	9(28)	5(16)	7(22)	17(53)
โรคอื่น ๆ	9	0	0	0	0	0
คนปกติ	4	0	0	0	0	0

วิจารณ์

จากการเปรียบเทียบลักษณะรูปแบบของแอนติเจนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่า sonicated antigen จากเชื้อทั้ง 30 isolates ให้ลักษณะรูปแบบของแอนติเจนที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือก sonicated antigen ที่เตรียมจากเชื้อเพียง 1 isolate มาทำ Western blot และ immunostaining เพื่อจะตรวจหา แอนติเจนที่จำเพาะต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า แอนติเจนที่จำเพาะสำหรับเชื้อ *P. pseudomallei* มีอยู่ 4 ชนิด ด้วยกัน คือ ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21, 18, 15.5 และ 13 kDa แต่เนื่องจากซีรั่มของผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดสอบยังมีจำนวนไม่มากพอ ดังนั้นแอนติเจนทั้ง 4 ชนิดนี้อาจจะไม่ใช่แอนติเจนที่จำเพาะทั้งหมดก็ได้ แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะได้แอนติเจนที่จำเพาะ 4 ชนิด เมื่อคิดความไวของการทดสอบ (sensitivity) โดยใช้เกณฑ์ว่า ซีรั่มใดก็ตามที่ให้ผลบวกกับแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่ง ใน 4 ชนิดนี้ ถือว่าให้ผลบวกสำหรับโรคเมลิออยโดลิส จะได้ความไวของการทดสอบเพียง 53% (17/32) ซึ่งยังมีค่าที่ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากสาเหตุหลาย ๆ ประการด้วยกัน เช่น แอนติเจนทั้ง 4 ชนิดนี้อาจจะมี immunogenicity ต่ำ, ผู้ป่วยมีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือมี transient seronegative[8] ทำให้ไม่สร้างแอนติบอดี หรืออาจจะเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับแต่ละบุคคลเช่น กรรมพันธุ์, ภาวะทุกขโภชนาการ เป็นต้น นอกจากนั้นอาจเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่จำเพาะทั้ง 4 ชนิดนี้แล้ว แต่เนื่องจากมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะตรวจสอบโดยวิธีนี้ได้ ดังนั้น การสกัดแยกนำเอาเฉพาะแอนติเจนที่จำเพาะทั้ง 4 นี้ มาใช้ในการทดสอบอื่น ๆ ที่มีความไวมากกว่า เช่น ELISA หรือ RIA ก็อาจจะให้ผลการทดสอบที่ดีขึ้นได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนบางส่วนจาก สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (กพวท.) STDB GRANT NO. CPT 88B-1-04-070

เอกสารอ้างอิง

1. Leelarasamee A. Epidemiology of melioidosis. J Infect Dis Antimicrob Agents 1986; 3: 84-93.
2. สุภาภรณ์ พัวเพิ่มพูลศิริ, ประจักษ์ พัวเพิ่มพูลศิริ. เมลิออยโดลิส : รายงานผู้ป่วย 43 รายที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์. รามาธิบดีเวชสาร 2526; 6: 96-105.
3. นิตยา ธีระวัฒนสุข, พิมพ์ใจ นัยโกวิทย์, ภิญโญ ศุษิลวรณ์. สถิติการตรวจพบเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* ที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี ในปี พ.ศ. 2527 และ 2528. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2530; 15: 13-17.
4. ขจรศักดิ์ ศิลปโภชากุล, สินีนาฏ กาลเนาวกุล, สุเทพ จารุรัตนศิริกุล และคณะ. เมลิออยโดลิสในภาคใต้ของประเทศไทย : I รายงานผู้ป่วย 16 ราย. รามาธิบดีเวชสาร 2528; 8: 1-10.
5. นลินี อัศวโภคี การรักษาโรคเมลิออยโดลิสด้วยยาปฏิชีวนะ. การประชุมเชิงปฏิบัติการ melioidosis 14-15 มกราคม 2531: 48-53.
6. Piggot A, Hochholzer L, Human melioidosis : A histopathological study of acute and chronic melioidosis. Arch Pathol 1970; 90: 101-111.
7. Weber DR, Douglass LE, Brundage WG, Stallkamp TC. Acute varieties of melioidosis occuring in U.S. soldiers in Vietnam. Am J Med 1969; 46: 234-244.
8. Alexander AD, Huxsoll DL, Warner JR, *et al.* Serological diagnosis of human melioidosis with indirect hemagglutination and complement fixation tests. Appl Microbiol 1970; 20: 825-833.
9. Ashdown LR, Demonstration of human antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* by indirect fluorescent antibody staining. Pathology 1981; 13: 597-601.
10. Ashdown LR, Guard RW. The prevalence of human melioidosis in nothern Queensland. Am J Trop Med Hyg. 1984; 33: 474-478.
11. Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Pornpatkul M. Diagnostic value of the indirect hemagglutination test for melioidosis in an endemic area. Am J Trop Med Hyg 1990; 42: 248-253.
12. Ashdown LR. Relationship and significance of specific immunoglobulin M antibody response in clinical and subclinical melioidosis. J Clin Microbiol 1981; 14 : 361-364.
13. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน. การวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสทางห้องปฏิบัติการ : แนวทางการพัฒนาจากอดีตถึงปัจจุบันสู่อนาคต. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2532; 17: 137-142.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
16. Kyhse-Anderson J. Electroblotting of multiple gels : a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods 1984; 10: 203-209.
17. Hencock K, Tsang VCW. India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. Anal Biochem 1983; 133: 157-162.