บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 วิธีการเตรียมสารละลาย

3.1.1 การเตรียมสารละลายกรดพาราอะมิโนเบนโซอิค 0.01 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดพาราอะมิโนเบนโซอิค 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำประปาจนครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.1.2 การเตรียมสารละลายลีเจียมซ่าเจือจาง

3.1.2.1 สารละลายลีเจียมซ่า

เตรียมผงลีเจียมซ่าบดให้ละเอียด 0.6 กรัม กลีเซอรอล 50 มิลลิลิตร และเมทธานอลบริสุทธิ์ 50 มิลลิลิตร เทรวมใส่ขวดแก้วทรงกรวยสะอาดขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นาน 6-8 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) แล้วจึงเติมเมทธานอลบริสุทธิ์อีก 50 มิลลิลิตร ปิดฝาภาชนะให้แน่นสนิท นำไปบ่ม (aging) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ก่อนจะนำไปใช้กรองสารละลายลีผ่านกระดาษกรอง เพื่อกำจัดตะกอน สารละลายลีเจียมซ่าที่ได้เก็บไว้ได้นานไม่ต่ำกว่า 12 เดือน

3.1.2.2 สารละลาย Sorensen pH บัฟเฟอร์ (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์)

ประกอบด้วย

สารละลาย A: ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 9.464 กรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย B: โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 9.073 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารละลายลีเจียมซ่าเจือจางที่ใช้ติดตามการเจริญของพลาสโมเดียม เตรียมได้จากผสมสารละลาย A 6 มิลลิลิตร กับสารละลาย B 4 มิลลิลิตร pH ของสารละลายบัฟเฟอร์นี้ประมาณ 7.0 - 7.2 หยดสารละลายลีเจียมซ่าที่เตรียมในข้อ 3.1.2.1 ลงไป 2-20 หยด เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทำการผสมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

3.1.3 การเตรียมสารละลายสำหรับเตรียมเลือดตัวอย่างจากหนูทดลอง

3.1.3.1 สารละลายป้องกันการแข็งตัวของเลือด : Acid Citrate Dextrose (ACD)

ซิ่งโซเดียมซีเตรต 1.32 กรัม กรดซีตริค 0.48 กรัม และเดกซ์โทรส (Dextrose หรือ D-(+)- กลูโคส) 1.40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3.2 สารละลาย 5 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4

ซิ่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4346 กรัม โซเดียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟต 0.3022 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับให้ค่า pH ของสารละลายเป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ซิ่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่เตรียมให้มีปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

3.1.4 การเตรียมซัสเปนชันของไพริเมธามีน (Yoeli และคณะ, 1969)

ซัสเปนชันของไพริเมธามีน เพื่อใช้ทดสอบความไวต่อยาของ พลาสโมเดียม ซ่าบอดี ทำได้โดยใช้ไพริเมธามีน 150 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เติม Tween 80 ลงไป 1 หยด หลังจากนั้นนำไปทำให้เป็นซัสเปนชันด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง โดยใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ (soni-cator) นาน 5 นาที เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

3.1.5 การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrime-thamine

3.1.5.1 สารละลาย Toluene Base Scintillation Fluid Triton X-100 ประกอบด้วย :

2,5-Diphenyloxazole (PPO) 7.3 กรัม

1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzole (POPOP) 0.167 กรัม

Triton X-100 250 มิลลิลิตร

เติม Toluene ให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.5.2 สารละลายฟิทช์มีเดียม (Fitch, 1969)

สารละลายฟิทช์บัฟเฟอร์ 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ 1.462 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.358 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.296 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 7.098 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับให้เป็น pH 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 3 นอร์มัล เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้เติมกลูโคส 1.704 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร

3.1.5.3 สารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ ฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4

ฮั่งฮีพส์ (HEPES) 4.766 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล จนได้ pH 7.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ในบางการทดลองอาจต้องเติมสารต่อไปนี้ ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ได้แก่ กลูโคส 1.704 กรัม (86 มิลลิโมลาร์) กลูโคส 1.982 กรัม (0.1 โมลาร์) โซเดียมไพรูเวต 1.1 กรัม (0.1 โมลาร์) โซเดียมซัคซีเนต 2.7 กรัม (0.1 โมลาร์) 2,4-ไดไนโตรฟีนอล 18 มิลลิกรัม (1 มิลลิโมลาร์) โซเดียมฟลูออไรด์ 42 มิลลิกรัม (1 มิลลิโมลาร์) และโซเดียมอาร์ซีเนต 1.87 กรัม (60 มิลลิโมลาร์)

3.1.5.4 สารละลาย ^{14}C-pyrimethamine และไพริเมธามีน

จากสารละลาย ^{14}C-pyrimethamine (ค่ารังสีจำเพาะ 54 มิลลิคูรีต่อมิลลิโมล) และไพริเมธามีนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ในสารละลาย 0.5 เปอร์เซนต์กรดแลคติค นำมาเจือจางด้วยฟิทช์มีเดียม หรือฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 อย่างใดอย่างหนึ่งขึ้นอยู่กับการทดลองการนำเข้าว่าจะทำการทดลองในสารละลายชนิดใด โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อมิได้ทำการทดลองเก็บโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพของยา เก็บไว้ได้ตลอดการวิจัย (ก่อนนำมาใช้ต้องทำการทดสอบค่ารังสีโดยการนับใน Scintillation Fluid ทุกครั้ง)

3.1.5.5 สารละลาย 1 ไมโครโมลาร์ ไพริเมธามีน ใน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแลคติค หรือ 95 เปอร์เซ็นต์เอทธานอล

ชั่งไพริเมธามีน 0.0025 กรัม ละลายในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแลคติคหรือ 95 เปอร์เซ็นต์เอทธานอล 100 มิลลิลิตร (สังเกตให้ละลายหมดจนได้สารละลายใส) ซึ่งจะมีไพริเมธามีนคิดเป็นความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เมื่อจะใช้ ทำการเจือจางลง 100 เท่า วิธีเก็บรักษาเช่นเดียวกับข้อ 3.1.5.4

3.1.6 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณฮีโมโกลบิน

สารละลายทั้งหมดในหัวข้อนี้เตรียมในสภาวะที่ปราศจากเหล็กอิออน

3.1.6.1 สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์เบนซิดีน

ชั่งเบนซิดีน 1 กรัมละลายในกรดอะซิติค (glacial acetic acid) 90 มิลลิลิตร จนละลายหมด จึงเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.1.6.2 สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนเปอรอกไซด์

ดูดสารละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ 1 มิลลิลิตร ทำให้เป็น 30 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เตรียมใช้ทันที

3.1.6.3 สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติค

ดูดสารละลายกรดอะซิติค (glacial) 10 มิลลิลิตร ทำให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.6.4 สารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐาน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ละลาย horse hemoglobin 1 มิลลิกรัมด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3.1.7 การเตรียมสารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์จากพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี

3.1.7.1 สารละลาย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนิน (saponin)

ละลายซาโปนิน 0.015 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (ข้อ 3.1.3.2) 100 มิลลิลิตร

3.1.7.2 สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ ไตรตอน X-100 (Triton X-100)

ผสมไตรตอนเอกX-100 1 มิลลิลิตรในน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

3.1.8 การเตรียมสารละลายที่ใช้หาปริมาณโปรตีน

3.1.8.1 สารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (alkali copper)

เป็นส่วนผสมของ 1 เปอร์เซ็นต์คอปเปอร์ซัลเฟต 1 มิลลิลิตร กับ 1 เปอร์-เซ็นต์ โปแตสเซียม-โซเดียมตาร์เตรต 1 มิลลิลิตร และ 2 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มิลลิลิตร

3.1.8.2 สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตต 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดต 12.5 กรัม น้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร 85 เปอร์เซ็นต์กรดฟอสฟอริค 25 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ (reflux) ด้วยความร้อนต่ำ ๆ นาน 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเก็บในขวดสีชา สารละลายนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน 3-6 เดือน เวลาใช้ทำให้เจือจางลง 2 เท่าด้วยน้ำกลั่น

3.1.8.3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชั่งโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) บริสุทธิ์ 0.1 กรัม ละลายในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ ไตรตอน X-100 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.1.9 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส

3.1.9.1 สารละลาย 1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร และอาจเจือจางให้เป็น 0.1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยน้ำที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์เช่นกัน

3.1.9.2 สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมแอสโคเบต

ละลายกรดแอสโคบิค 1 กรัมในน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร (pH จะมีค่าประมาณ 1.4) ค่อย ๆ ปรับให้เป็น pH 6.0 ด้วย 1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์พร้อมกับกวน (stir) ตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer จะใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 6 มิลลิลิตร ทำให้

ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.9.3 สารละลายกรดโฟลิคใน 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมแอสโคเบต

ชั่งกรดโฟลิค 38.2 มิลลิกรัมละลายใน 0.1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.6 มิลลิลิตร นำไปผสมกับสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมแอสโคเบต (ข้อ 3.1.9.2) แล้วทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร

3.1.9.4 สารละลายไดไฮโดรโฟเลต (Futterman,1957 และBlakely,1960)

ค่อย ๆ เติมโซเดียมไดไธโอไนท์ครั้งละน้อย ๆ ลงในสารละลายกรดโฟลิค (ข้อ 3.1.9.3) พร้อมกับกวนอยู่ตลอดเวลาจนครบ 0.4 กรัม (ใช้เวลาเติมมากกว่า 5 นาที) กรดโฟลิคจะถูกรีดิวซ์เป็นไดไฮโดรโฟเลต (เกลือโซเดียม) โดยมีกรดแอสโคบิคเป็นสารป้องกันการออกซิไดซ์ (antioxidant) นำสารละลายที่ได้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งรอจนกระทั่งอุณหภูมิลดลงถึง 2-4 องศาเซลเซียส แล้วค่อย ๆ หยด 1 นอร์มัลกรดไฮโดรคลอริคที่เย็นพร้อมกับกวนให้เข้ากันอย่างเร็ว จน pH ของสารละลายลดลงเหลือ 2.80 (ใช้เวลาประมาณ 30 นาที) จะได้ผลึกของไดไฮโดรโฟเลตที่เป็นแบบผลึกอสัณฐานต้องทำการตกผลึกซ้ำอีกครั้งโดยการนำตะกอนที่ได้จากการปั่นแยก 5 นาที ที่ 5000 รอบต่อนาทีมาละลายด้วย 10 มิลลิลิตรของ 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมแอสโคเบต pH 6.0 pH ของสารละลายอาจลดลงเล็กน้อยเป็นผลให้ผลึกละลายไม่หมด ค่อย ๆ เติม 1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปจนกระทั่งผลึกละลายพอดี (pH ต้องไม่เกิน 6.0) แล้วตกผลึกซ้ำด้วยกรดไฮโดรคลอริคในลักษณะเดียวกับครั้งแรก ในขั้นนี้จะได้ผลึกไดไฮโดรโฟเลต ซึ่งมีโครงสร้างที่เสถียร (stable) มีสีขาวนวล ปั่นแยกผลึกและล้าง 3 ครั้งด้วย 0.001 นอร์มัลกรดไฮโดรคลอริค ทำผลึกให้เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ซัสเปนชันใน 0.001 นอร์มัล กรดไฮโดรคลอริค เก็บภายใต้สภาวะก๊าซไนโตรเจนและแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 70 องศาเซลเซียส จะเก็บไว้ได้นานมากกว่า 3 เดือน

เมื่อจะนำไดไฮโดรโฟเลตมาใช้เป็นสับสเตรตของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ละลายผลึกด้วย 0.05 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.1 โมลาร์ของ 2-เมอร์เคพโตเอทธานอลผสมอยู่ด้วย เตรียมไดไฮโดรโฟเลตความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ โดยอาศัยค่า molar extinction coefficient เท่ากับ 2.84×10^4 (โมลาร์)$^{-1}$ (เซนติเมตร)$^{-1}$ ที่ความยาวคลื่นแสง 282 นาโนเมตร

3.1.9.5 สารละลาย 1.5 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์

ชั่งโปแตสเซียมคลอไรด์ 11.184 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

3.1.9.6 สารละลาย 1 มิลลิโมลาร์นิโคตินาไมด์

ละลาย NADPH 0.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

3.1.9.7 สารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์เคพโตเอทธานอล

ดูด 2-เมอร์เคพโตเอทธานอล 0.14 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดสีชา

3.1.9.8 สารละลาย 0.05 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.1 โมลาร์ 2-เมอร์เคพโตเอทธานอล

สารละลาย 200 มิลลิลิตร มีทริส 1.2114 กรัม ปรับให้เป็น pH 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค เติม 2-เมอร์เคพโตเอทธานอล 1.4 มิลลิลิตร

3.1.9.9 สารละลาย 0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.0 - 9.0

สารละลาย 25 มิลลิลิตรมีทริส 1.514 กรัม (ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์)

3.1.9.10 สารละลาย 0.5 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 - 7.5

สารละลาย 25 มิลลิลิตร มีไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.177 กรัม และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.170 กรัม (ปรับ pH ด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์)

3.1.9.11 สารละลาย 0.5 โมลาร์ซีเตรตบัฟเฟอร์ pH 5.0-6.5

สารละลาย 25 มิลลิลิตร มีโซเดียมซีเตรต 3.676 กรัม และกรดซีตริค 2.627 กรัม (ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์)

3.1.10 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส

3.1.10.1 การเตรียม 0.02 โมลาร์เตตระไฮโดรโฟเลต

ละลายเตตระไฮโดรโฟเลต 250 มิลลิกรัมด้วย 0.5 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ซึ่งมีไดไธโอธริอิตอล 0.16 โมลาร์ (ข้อ 3.1.10.4.1) จนละลายหมดพอดี (ใช้บัฟเฟอร์ 7 มิลลิลิตร) แล้วเติม 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ซึ่งมีไดไธโอธริอิตอล 0.16 โมลาร์ จนปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 มิลลิลิตร การเตรียมทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายที่ได้จะมีสีเหลืองอ่อน แบ่งเก็บเป็นส่วน ๆ ภายใต้ก๊าซอาร์กอนในหลอดปิดฝาสนิทและหุ้มมิดชิดด้วยอลูมินัมฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานถึง 2-3 เดือน

3.1.10.2 สารละลาย 0.1 โมลาร์กรดอะมิโนเซอรีน (ค่ารังสีประมาณ 2.5×10^4 DPM ต่อไมโครโมล)

ชั่งกรดอะมิโนเซอรีน 0.1051 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เติม ^{14}C-serine (น้ำหนักโมเลกุล 107 และค่ารังสีจำเพาะ 56 มิลลิคูรีต่อมิลลิโมล) ลงไป 230 ไมโครลิตร ก่อนนำมาใช้ต้องทดสอบค่ารังสีด้วยการนับใน liquid scintillation counter ทุกครั้ง

3.1.10.3 สารละลาย 2 มิลลิโมลาร์ไพริดอกซอล-5'-ฟอสเฟต

ชั่งไพริดอกซอล-5'-ฟอสเฟต 5.3 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

3.1.10.4 สารละลาย 0.16 โมลาร์ไดไธโอธริอิตอลใน 0.5 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

ชั่งไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.177 กรัม และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.702 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ปรับให้เป็น pH 7.4 ด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ชั่งไดไธโอธริอิตอล 0.617 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ดังกล่าว

3.1.10.5 สารละลาย 0.6 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.5-9.0

สารละลาย 25 มิลลิลิตรมีทริส 1.817 กรัม (ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริค)

3.1.10.6 สารละลาย 0.3 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0-7.5

ชั่งไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.306 กรัม และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.021 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร (ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริคหรือโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์)

3.1.10.7 สารละลาย 0.4 โมลาร์ Dimedon ใน 50 เปอร์เซนต์เอทธานอล

ชั่ง Dimedon 5.608 กรัม ละลายใน 95 เปอร์เซนต์เอทธานอล 52.6 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดแล้วจึงเติมน้ำกลั่น 47.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในภาชนะที่ฝาปิดแน่น ถ้าเกิดผลึกของ Dimedon ขึ้น ก่อนใช้ให้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 37-40 องศาเซลเซียส

3.1.11 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส

3.1.11.1 สารละลาย 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทธิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต (DHPP) (ดัดแปลงจาก Friedkin และคณะ, 1962)

ชั่ง 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทธิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต 0.1 กรัม และโซเดียมไดไธโอไนท์ 0.1 กรัม ใส่ใน 1 มิลลิลิตร ของ 1 โมลาร์ 2-เมอร์เคพโตเอทธานอล เขย่าพร้อมกับผ่านก๊าซอาร์กอนนานประมาณ 10 นาที ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ส่วนน้ำใสคือผลิตภัณฑ์ DHPP ที่ต้องการ แบ่งเป็นส่วน ๆ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย DHPP ที่เตรียมได้ ก่อนนำมาใช้จะต้องทดสอบคุณสมบัติและวัดความเข้มข้นโดยอาศัยคุณสมบัติในการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 330 นาโนเมตร และค่า molar extinction coefficient ที่ pH 7.1 เท่ากับ 6.2×10^3 (โมลาร์)$^{-1}$ (เซนติเมตร)$^{-1}$ (Shiota และคณะ: 1969) โดยเฉลี่ยความเข้มข้นของ DHPP ในสารละลายที่เตรียมได้มีค่าประมาณ 14 มิลลิโมลาร์

3.1.11.2 สารละลาย 0.23 มิลลิโมลาร์กรดพาราอะมิโนเบนโซอิค (ค่ารังสีประมาณ 1.5×10^4 DPM ต่อนาโนโมล)

ละลาย ^{14}C-p-aminobenzoic acid 50 ไมโครคูรี (น้ำหนักโมเลกุล 137 และค่ารังสีจำเพาะ 24 มิลลิคูรีต่อมิลลิโมล) ใน 2 มิลลิลิตรของ 0.2 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ความเข้มข้นของสารละลายคือ 1.04 มิลลิโมลาร์ เก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส เวลาใช้เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.23 มิลลิโมลาร์ แล้วผสมกับ 0.23 มิลลิโมลาร์ กรดพาราอะมิโนเบนโซอิค ในอัตราส่วน 1: 1 ใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ก่อนนำมาใช้ต้องทดสอบค่ารังสีด้วยการนับใน liquid scintillation counter ทุกครั้ง

3.1.11.3 สารละลาย 2 โมลาร์แมกนีเซียมคลอไรด์

ชั่งแมกนีเซียมคลอไรด์ 4.066 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร

3.1.11.4 สารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

ละลายไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 6.6363 กรัม และโปแตสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.0907 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับให้เป็น pH 7.0 ด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์

3.2 วิธีการเลี้ยงและระวังรักษาหนูทดลอง

ใช้หนูไมซ์พันธุ์ Fischer ไม่จำกัดเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 35 กรัม (30-40 กรัม) อายุประมาณ $2\frac{1}{2}$ - 3 เดือน ได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย เพาะพันธุ์และเลี้ยงเองในห้องทดลองปรับอากาศของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับน้ำประปาและอาหารสำเร็จรูป ซื้อจากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ตลอดเวลา

3.3 วิธีการทำให้หนูทดลองติดเชื้อพลาสโมเดียม ชาบอดี

นำหนูทดลองซึ่งติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี จนกระทั่งเปอร์เซนต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ (percent parasitemia) มีค่าประมาณ 40-50 เปอร์เซนต์มาฆ่าโดยใช้อีเธอร์ แล้วดูดเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) โดยใช้เข็มฉีดยาซึ่งมีสารละลาย ACD 0.2 มิลลิลิตร ฉีดเลือดติดเชื้อที่ได้เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) ของหนูทดลองที่ต้องการทำให้ติดเชื้อโดยให้หนูได้รับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อตัวละประมาณ 10^8 เซลล์ หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องซึ่งออกแบบพิเศษ สามารถควบคุมแสงสว่างอัตโนมัติโดยใช้ไฟฟลูออเรสเซนต์ กำหนดการปิดไฟเวลา 8.30-17.30 น. และเปิดไฟเวลา 17.30- 8.30 น. (Newbold และคณะ, 1982) ให้อาหารปกติแต่ให้น้ำดื่มซึ่งมีกรดพาราอะมิโนเบนโซอิค 0.01 เปอร์เซนต์แทนน้ำประปา (Peters, 1967)

3.4 วิธีติดตามการเจริญเติบโตและระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ชาบอดี ในเม็ดเลือดแดงหนู (ดัดแปลงจากวิธีของ WHO, 1961)

หยดเลือด 1 หยด(จากการขลิบปลายหางหนู) ลงที่ปลายข้างหนึ่งของสไลด์ แตะปลายสไลด์ แผ่นที่สองซึ่งสะอาดและเรียบลงบนสไลด์แผ่นแรกแล้วลากถอยไปแตะกับหยดเลือดให้แผ่กระจายจนเต็มหน้าของสไลด์แผ่นที่สอง ไถสไลด์ไปข้างหน้าโดยทำมุมกับแผ่นแรก 30-40 องศา ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จะได้แผ่นฟิล์มบางของเลือด ลนเปลวไฟให้แห้ง แล้วนำสไลด์แช่ในเมทธานอลบริสุทธิ์ 5-10 วินาที เพื่อตรึงแผ่นฟิล์มบางของเลือด หยดสารละลายสีเจียมซ่าเจือจาง (ข้อ 3.1.2) ลงไปให้เต็มสไลด์ฟิล์มบาง ทิ้งไว้จนครบเวลาตามที่แสดงในตารางข้างล่าง จึงล้างสีและไล่ตะกอนสีออกด้วยน้ำเบา ๆ เมื่อสไลด์แห้ง นำไปนับจำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 1000 เซลล์ ด้วยกล้องจุลทัศน์ใช้เลนส์กำลังขยาย 10 x 100 คำนวณ

อัตราส่วนผสม เลียมซา : Sorensen pH บัฟเฟอร์	เวลาของการย้อมสี
1 : 10	15 นาที
1 : 15	20 นาที
1 : 50	45 นาที
1 : 100	2 ชั่วโมง

เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อได้จาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด}} \times 100$$

ติดตามการเจริญเติบโตของพลาสโมเดียมจากการเพิ่มของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อและลังเกตระยะการเจริญโดยมีหลัก คือ

ระยะวงแหวน (ring form) โครมาตินติดสีเข้ม ไซโตพลาสมเป็นรูปวงแหวนติดสีฟ้า

ระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite) ไซโตพลาสมเริ่มเปลี่ยนรูปร่างอาจเป็นรูปยาวรีหรือหนาขึ้น โครมาตินติดสีแดงเข้ม

ระยะไซซอนต์ (shizont) ไซโตพลาสมใหญ่ขึ้นมากติดฟ้า โครมาตินแบ่งเป็น 2 หรือมากกว่า 2 อัน ติดสีแดงเข้ม

ในการทดลองยังลังเกตและนับจำนวนว่า เม็ดเลือดแดง 1 เซลล์ถูกบุกรุกด้วยพาราไซต์กี่เซลล์ โดยดูลักษณะการติดสีของไซโตพลาสมภายในขอบเขตของเยื่อเซลล์

3.5 วิธีทดสอบความไวของพลาสโมเดียม ชาบอดีต่อไพริเมธามีน (drug sensitivity test) (Beale และคณะ, 1978)

วิธีทดสอบความไวของ พลาสโมเดียม ชาบอดี AS และ AS(Pr_1) ต่อไพริเมธามีน ทำได้ดังนี้ แบ่งหนูออกเป็นกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม กลุ่มละ 5 ตัว ชั่งน้ำหนักหนูในวันเริ่มทำการทดสอบ แล้วใช้น้ำหนักเฉลี่ยไปคำนวณปริมาตรของสารละลายไพริเมธามีนที่จะใช้ฉีด

I 18000402

เริ่มทดลอบโดยให้หนูทั้งสองกลุ่มได้รับเชื้อ (ประมาณ 10.00 น.) และเลี้ยงหนูตามข้อ 3.3 หลังจากนั้น 6 ชั่วโมง (ประมาณ 16.00 น.) ฉีดไพริเมธามีน 10,15 กับ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเข้าทางช่องท้องของหนูติดเชื้อโคลน AS และ 15, 20, 30 กับ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเข้าทางช่องท้องของหนูติดเชื้อโคลน AS(Pr_1)

สังเกตและติดตามการเจริญโดยเทคนิคฟิล์มบางและย้อมลีเจียมซ่า (ข้อ 3.4) พร้อมกับฉีดไพริเมธามีนเป็นประจำทุกวันนาน 4 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อในหนูกลุ่มควบคุม ซึ่งฉีดตัวทำละลาย (น้ำกลั่นที่มี Tween 80) ด้วยวิธีเดียวกันในปริมาตรเท่ากับที่หนูกลุ่มทดลองได้รับซัลเฟนซันของไพริเมธามีน

3.6 <u>วิธีกำจัดเม็ดเลือดขาวออกจากเลือดตัวอย่าง เพื่อใช้ทดลองการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine</u> (Richards และ Williams, 1973)

ฆ่าหนูซึ่งติดเชื้อ<u>พลาสโมเดียม ชาบอดี</u> เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อสูงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง) และเก็บตัวอย่างเลือดตามวิธีข้อ 3.3 นำไปปั่นแยกที่แรงเหวี่ยง 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที เซลล์เม็ดเลือด (packed cells) ที่ได้นำมาทำให้เป็น 50 เปอร์เซ็นต์เซลล์ ซัสเปนชันในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ผ่านเซลล์ซัสเปนชันลงในคอลัมน์ซึ่งบรรจุแน่นด้วยเซลลูโลส CF-11 (1.5 กรัม เซลลูโลสต่อเลือดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิห้อง ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ซาลีนที่เย็น เม็ดเลือดแดงจะไหลผ่านออกมาส่วนเม็ดเลือดขาวมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์จะถูกกรองไว้ในคอลัมน์ (ย้อมติดสีม่วงเข้มของลีเจียมซ่า) ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้ 3 ครั้งด้วยมีเดียม (medium) ซึ่งใช้ในการศึกษาการนำเข้า ตรวจดูระยะการเจริญและเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อทุกครั้งด้วยเทคนิคฟิล์มบางและย้อมลีเจียมซ่า (ข้อ 3.4) แล้วทำให้เป็น 25 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ซัสเปนชันนำไปนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมดด้วยเครื่องฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer)

ในกรณีที่เลือดติดเชื้อมีเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการเจือจางให้เหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยเม็ดเลือดแดงปกติซึ่งเตรียมมาโดยวิธีเดียวกัน

i 1800040x

3.7 วิธีการนับเม็ดเลือดแดงและจำนวนเซลล์ติดเชื้อ

ใช้ปิเปตต์สำหรับเจือจางเลือด (ชนิด Thomatype) ดูดเลือดถึงขีด 0.5 แล้วดูดสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์จนถึงขีด 101 เขย่าเลือดให้เข้ากันนาน 5 นาที หยดลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ 1 หยด ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปนับจำนวนเม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทัศน์เลนส์กำลังขยาย 10 x 40 ค่าที่ได้จะเป็นจำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ด้วยวิธีการเตรียมเลือดตัวอย่างตามวิธีข้อ 3.6 จะมีจำนวนเม็ดเลือดแดงอยู่ระหว่าง $3.6 \times 10^9 - 4.8 \times 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของ 25 เปอร์เซ็นต์ซัสเปนชัน

การคำนวณหาจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อในเลือดตัวอย่าง ทำได้โดยอาศัยข้อมูลจากเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ (ข้อ 3.4) และจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดต่อปริมาตรที่ทราบ โดยการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.8 วิธีการศึกษาการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี

3.8.1 การศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

ใช้ 25 เปอร์เซ็นต์เซลล์ซัสเปนชันของเลือดตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.6 ในปริมาตรที่ทำให้ได้เซลล์จำนวน 5.5×10^8 เซลล์ เติมสารละลาย ^{14}C-pyrimethamine 0.2 มิลลิลิตร และสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีนสำหรับการนำเข้าจนปริมาตรทั้งหมดเป็น 2 มิลลิลิตร อินคิวเบต โดยการเขย่าเบา ๆ (100 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาการนำเข้า โดยการแช่หลอดในอ่างน้ำแข็งรีบนำไปปั่น 5000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที เพื่อแยก ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งไม่ถูกนำเข้าเซลล์ออก จากนั้นปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ครั้งละ 1 มิลลิลิตร เซลล์ที่ได้นำไปย่อย ^{14}C-pyrimethamine และวัดปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีข้อ 3.8.2.1 หรือ 3.8.2.2 คำนวณค่าการนำเข้าเป็นพิโคโมลของ ^{14}C-pyrimethamine ต่อ 10^9 เซลล์ โดยเทียบจากค่ากัมมันตรังสีของสารละลายมาตรฐาน ^{14}C-pyrimethamine

3.8.2 การสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง

3.8.2.1 สกัดโดยอาศัยคุณสมบัติของการละลายใน 0.5 เปอร์เซ็นต์กรดแลคติค (ดัดแปลงจากวิธีของ Ploydanai, 1982)

นำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 มาทำให้แตกด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแลคติค (ซึ่งมีไพริเมธามีน 1 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าวอร์เทคซ์ (vortex mixer) นาน 15 วินาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดนาน 1 นาที ตกตะกอนโปรตีนที่เหลือด้วย 10 เปอร์เซ็นต์กรดไตรคลอโรอะซีติค 500 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรง นำไปปั่นแยกและดูดเอาส่วนน้ำใส่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ไปวัดจำนวน ^{14}C-pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลล์ โดยเติม Toluene Base Scintillation Fluid Triton X-100 ปริมาตร 6.3 มิลลิลิตร นับปริมาณกัมมันตรังสีด้วยเครื่อง Packard PL-Tricarb Liquid Scintillation Counter โดยมี ^{14}C-toluene เป็น external standard

3.8.2.2 สกัดโดยอาศัยคุณสมบัติของการละลายในเอทธานอล

นำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้จากการทดลองข้อ 3.8.1 มาทำให้เซลล์แตกเสียก่อน โดยการเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าวอร์เทคซ์นาน 30 วินาที แล้วจึงเติม 95 เปอร์เซ็นต์เอทธานอล (ซึ่งมีไพริเมธามีน 1 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร เขย่าต่อไปอีก 1 นาที ปั่นแยกและดูดเอาส่วนน้ำใส่ปริมาตร 500 ไมโครลิตรไปวัดจำนวน ^{14}C-pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลล์โดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.8.2.1

3.8.3 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง

3.8.3.1 % recovery ของการสกัด

ทำการทดลองโดยใช้ 25 เปอร์เซ็นต์เซลล์ชั้นเปนยันของเม็ดเลือดแดงปกติมาปั่นแยกเอาเฉพาะเซลล์ให้ได้ 5.5×10^8 เซลล์ เติมสารละลาย ^{14}C-pyrimethamine ลงไป 100 ไมโครลิตร โดยมีเนื้อไพริเมธามีนอยู่ในช่วง 0.78 - 6.72 พิโคโมล อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ทำการสกัดและนับปริมาณกัมมันตรังสีตามวิธีข้อ 3.8.2.1 เปรียบเทียบกับวิธีข้อ 3.8.2.2 และคำนวณหา% recovery ของการสกัด

เมื่อกำหนดให้ ^{14}C-pyrimethamine ที่เติมมีค่าเป็น 100 เปอร์เซนต์

3.8.3.2 ความแม่นยำ (precision)

เติมสารละลาย ^{14}C-pyrimethamine 100 ไมโครลิตร ซึ่งมีเนื้อไพริเมธามีนปริมาณ 0.78 และ 2.0 พิโคโมล ให้แก่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ 5.5×10^8 เซลล์ อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำการล้างและนับปริมาณกัมมันตรังสีตามวิธีข้อ 3.8.2.1 และ 3.8.2.2 เปรียบเทียบความแม่นยำในการวัดที่แต่ละปริมาณของ ^{14}C-pyrimethamine เมื่อทำการวัดหลาย ๆ ครั้ง พร้อม ๆ กัน (within assay)

ค่าความแม่นยำคำนวณได้จากค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of Variation; C.V.) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร $C.V. = \frac{S.D. \times 100}{\bar{X}}$

3.8.4 การทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงขาดอาหาร (glucose depleted cells)

ในการศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine บางสภาวะการทดลองจำเป็นต้องทำให้เซลล์ขาดอาหารเสียก่อน ซึ่งทำได้โดยดูด 25 เปอร์เซนต์เซลล์ซัสเปนชันของเลือดตัวอย่าง (5.5×10^8 เซลล์) ลงในหลอดทดลองซึ่งบรรจุ ฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 โดยที่ไม่ให้สารอาหาร (กลูโคสหรือน้ำตาลอื่น ๆ) แก่เซลล์เลย เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

3.9 วิธีการศึกษาการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง

ภาชนะเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองต่อไปนี้ต้องทำให้สะอาดโดยแช่ในกรดไนตริค 50 เปอร์เซนต์ และล้างด้วยน้ำที่ปราศจากอิออนของเหล็ก

3.9.1 การวัดปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธีเบนซีดีน (Benzidine method) (Crosby และ Furth, 1956)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณฮีโมโกลบิน 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย 1 เปอร์เซนต์เบนซีดีนและ 1 เปอร์เซนต์ไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ทำให้ละลายเข้ากัน โดยการหมุนหลอด (swirl) เบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง

ประมาณ 20 นาที (เปลี่ยนจากสีชมพูไปเป็นสีน้ำตาลแกมแดง) เติม 10 เปอร์เซ็นต์กรดอะซีติค 10 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางสี พลิกกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดการดูดแสงของสารละลายสีซึ่งเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 515 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณฮีโมโกลบินของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นจากสารละลายฮีโมโกลบินมาตรฐานที่มีปริมาณฮีโมโกลบินตั้งแต่ 0-20 ไมโครกรัม

3.9.2 การวัดปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง

นำ 25 เปอร์เซ็นต์เซลล์ซัสเปนชัน ของเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี (ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) ด้วยเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อและลักษณะการติดเชื้อต่างๆ กันมาปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนเซลล์ให้ได้ 10^9 เซลล์ ทำให้เซลล์แตกโดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่น (ที่ปราศจากอิออนของเหล็ก) 20 มิลลิลิตร วัดปริมาณฮีโมโกลบินตามวิธีในข้อ 3.9.1 แล้วคำนวณปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด ต่อ 10^9 เซลล์

3.9.3 การคำนวณปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงที่แตกตัวในสภาวะต่าง ๆ กัน ของการทดลองการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

หลังจากอินคิวเบตเซลล์กับ ^{14}C-pyrimethamine ในสภาวะต่าง ๆ ของการทดลองและปั่นแยกเซลล์ เพื่อศึกษาปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine แล้ว ส่วนน้ำใสคือฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีนนำมารวมกับ 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์จากการปั่นล้าง 3 ครั้ง นำไปวัดปริมาณฮีโมโกลบินตามวิธีข้อ 3.9.1 คำนวณปริมาณฮีโมโกลบินต่อปริมาตรทั้งหมด เทียบกลับเป็นจำนวนเซลล์ที่แตกโดยอาศัยค่าการแตกตัวของเซลล์ที่ทราบจำนวนจากผลในข้อ 3.9.2 และแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การแตกตัวของเซลล์ที่ใช้ทดลองศึกษาการนำเข้า

3.10 วิธีการเตรียมเอนไซม์จากพลาสโมเดียม ชาบอดี

3.10.1 การเตรียมเซลล์พลาสโมเดียม ชาบอดี ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ (พัฒนาจากวิธีของ Kramer และ Matusik, 1971)

นำ 25 เปอร์เซ็นต์เซลล์ซัสเปนชันของเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี มาปั่นเอาเฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์ แล้วนำไปแยกพาราไซต์ออกโดยทำลายเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (ทั้งเซลล์ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ) ด้วยสารละลาย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนินปริมาตรเป็น

20 เท่าของปริมาตรเซลล์ทั้งหมด อินคิวเบต โดยการเขย่า (100 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ปั่นแยก ทิ้งส่วนน้ำใสและล้างตะกอน 3 ครั้งด้วยฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) โดยใช้ปริมาตรครั้งละ 10 เท่าของปริมาตรตะกอน ตะกอนที่ได้คือ เซลล์พลาสโมเดียมอิสระ (erythrocyte-free parasite)

วิธีคำนวณหาจำนวนเซลล์พลาสโมเดียมทำได้โดยอาศัยข้อมูลจากเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อรวมทั้ง multi-infection แบบต่าง ๆ ของเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ (ข้อ 3.4) และจำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อทั้งหมด (ข้อ 3.7)

3.10.2 <u>การสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์พลาสโมเดียม ชาบอตี</u>

ทำลายเยื่อเซลล์ของพลาสโมเดียมด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ไตรตอน X-100 ในอัตราส่วน 2 : 1 โดยปริมาตร เขย่าที่ "speed 4" ของเครื่องเขย่าวอร์เทคซ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ช่วงละ 15 วินาทีจนครบ 2 นาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ชั้นน้ำใสจะเป็นสารละลายเอนไซม์สำหรับการศึกษาต่อไป

เฉพาะกรณีที่จะนำสารละลายเอนไซม์ไปศึกษาเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส เติม 2-เมอร์เคพโตเอทธานอลให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิโมลาร์

3.11 <u>วิธีการวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี</u> (Lowry และคณะ, 1951)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที นำไปปั่นที่ 4000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดการดูดแสงของสารละลายสีซึ่งเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานใน 1 เปอร์เซ็นต์ไตรตอน X-100 ที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัม

3.12 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิล-ทรานสเฟอเรส และไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส

3.12.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส (McCullough และคณะ, 1971)

สารละลายที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ประกอบด้วย 200 ไมโครลิตรของ 0.5 โมลาร์ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 5.9 100 ไมโครลิตรของ 1.5 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ 50 ไมโครลิตรของ 20 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์เคพโตเอทธานอล 100 ไมโครลิตรของ 1 มิลลิโมลาร์NADPH 50 ไมโครลิตรของ 3 มิลลิโมลาร์ไดไฮโดรโฟเลต และน้ำกลั่น อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 45 และ 35 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์ซึ่งสกัดจาก พลาสโมเดียม ชาบอดี AS(Pr_1) และ AS ตามลำดับ นาน 3 นาที เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายเอนไซม์ (ปริมาณโปรตีนไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัม) ปริมาตรของสารละลายผสมทั้งหมดเท่ากับ 1 มิลลิลิตร แอคติวิตีของเอนไซม์ติดตามจากการลดลงของ NADPH ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ในการรีดิวซ์ไดไฮโดรโฟเลตไปเป็นเตตระไฮโดรโฟเลต โดยติดตามการลดลงของการดูดแสงความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Shimadzu Spectrophotometer (UV-240) และคำนวณปริมาณ NADPH ที่เปลี่ยนไปโดย เทียบจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐาน NADPH ณ สภาวะ pH ที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์

แอคติวิตีของเอนไซม์แสดงเป็นนาโนโมลของ NADPH

กำหนดให้ 1 หน่วย (unit) ของเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไดไฮโดรโฟเลต 1 นาโนโมล ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

3.12.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส (Taylor และ Weissbach, 1965)

ผสม 50 ไมโครลิตรของ 2 มิลลิโมลาร์ไพริดอกซอล-5'-ฟอสเฟต 100 ไมโครลิตรของ 0.1 โมลาร์กรดอะมิโนเซอรีน (ค่ารังสีประมาณ 2.5×10^5 DPM) 80 ไมโครลิตรของ 0.6 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.3 น้ำกลั่นและสารละลายเอนไซม์ (ปริมาณโปรตีน 0.1 - 0.4 มิลลิกรัม) ในหลอดแก้วก้นแหลมขนาด 12 มิลลิลิตร ปริมาตร

ของสารละลายผสมนี้คือ 400 ไมโครลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที แล้วเริ่มต้นปฏิกิริยาด้วย 20 มิลลิโมลาร์เตตระไฮโดรโฟเลตใน 0.16 โมลาร์ ไดไธโอธริธิตอล 50 ไมโครลิตร เมื่ออินคิวเบตต่อไปจนครบ 30 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.3 มิลลิลิตรของ 0.4 โมลาร์ "Dimedon" เขย่าทันทีด้วยเครื่องเขย่าวอร์เทคซ์และแช่หลอดในอ่างน้ำแข็งจนกว่าจะทำการทดลองขั้นต่อไป

นำสารละลายไปต้มเพื่อเร่งให้เกิด "Dimedon-Aldehyde Adduct" ในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที (ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว) แล้วทำให้เย็นลงทันทีโดยการแช่หลอดในอ่างน้ำแข็ง เติมทอลูอีน 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าวอร์เทคซ์ (speed 6) ติดต่อกันเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นที่ 4000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที เพื่อแยกชั้นสารละลาย ดูดชั้นของทอลูอีน (ซึ่งมี "Dimedon-Aldehyde Adduct" ละลายอยู่) 2 มิลลิลิตรไปนับปริมาณกัมมันตรังสี ใน Toluene Base Scintillation Fluid Triton X-100 4 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Packard PL-Tricarb Liquid Scintillation Counter (ในการทดลองวัดแอคติวิตีแต่ละครั้งต้องทำหลอดควบคุมเพื่อนับปริมาณกัมมันตรังสีของกรดอะมิโนเซอรีนที่อาจถูกสกัดเข้าไปอยู่ในชั้นทอลูอีน ควบคู่ไปด้วย)

แอคติวิตีของเอนไซม์แสดงเป็นนาโนโมลของผลิตภัณฑ์ (^{14}C-methylene-tetrahydrofolate) ที่เกิดขึ้น ซึ่งคำนวณได้จากค่ารังสีของกรดอะมิโนเซอรีนในปฏิกิริยา

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด ^{14}C-methylenetetrahydrofolate 1 นาโนโมล ต่อนาทีภายใต้สภาวะที่ทดลอง

3.12.3 <u>การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส</u> (Ho และคณะ, 1974)

ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.9 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร 2 โมลาร์แมกนีเซียมคลอไรด์ 20 ไมโครลิตร 0.23 มิลลิโมลาร์กรดพาราอะมิโนเบนโซอิค 20 ไมโครลิตร (ค่ารังสีประมาณ 6.9×10^4 DPM) สารละลายเอนไซม์ (0.2 - 0.4 มิลลิกรัม โปรตีน) และน้ำกลั่นจนปริมาตรทั้งหมดเป็น 190 ไมโครลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที เติม 14 มิลลิโมลาร์ DHPP 10 ไมโครลิตร และอินคิวเบตต่อไปอีก 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์เคพโตเอทธานอล

80 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นแยกส่วนที่เป็นตะกอนออก วัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา โดยวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี (paper chromatography) ดังนี้ นำยั้นน้ำใส่ 100 ไมโครลิตรมาหยด (spot) บนกระดาษกรอง Whatman 3 MM ภายในขอบเขตของพื้นที่ 1 x 1 เซนติเมตร เป็นจุดเริ่มต้น แยกสับสเตรตออกโดยชะผ่านจุดเริ่มต้นลงมา (descending chromatography) ด้วย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ภายในอ่างโครมาโตกราฟฟีที่อุณหภูมิห้องจนได้ระยะ 15 เซนติเมตร นำยั้นมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแยกโดยใช้ DHPP เป็นดรรชนีบ่งชี้ ส่องดูโครมาโตแกรม (chromatogram) ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต DHPP จะเรืองแสงสีฟ้าสว่างในขณะที่ 7,8-^{14}C-dihydropteroate ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จะอยู่ที่จุดเริ่มต้นและเรืองแสงสีเทาปนฟ้า ตัดกระดาษบริเวณรอบจุดเริ่มต้น (2 x 2 เซนติเมตร) เป็นยั้นเล็ก ๆ ใส่ในขวดที่มี Toluene Base Scintillation Fluid Triton X-100 5 มิลลิลิตร นับปริมาณกัมมันตรังสีด้วยเครื่อง Packard PL-Tricarb Liquid Scintillation Counter (ในกรณีที่การแยกระหว่างผลิตภัณฑ์และสับสเตรตยังไม่สมบูรณ์สามารถทำการชะซ้ำได้อีกครั้งหนึ่ง หลังอบกระดาษจนแห้งสนิท)

แอคติวิตีของเอนไซม์แสดงเป็นพิโคโมลของ 7,8-^{14}C-dihydropteroate ที่เกิดขึ้น ซึ่งคำนวณได้จากค่ารังสีของกรดพาราอะมิโนเบนโซอิคในปฏิกิริยา

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด 7,8-^{14}C-dihydropteroate 1 นาโนโมลต่อนาทีภายใต้สภาวะที่ทดลอง