บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวแก่พยาธิปากขอ

ตัวแก่พยาธิปากขอ ได้เก็บจากผู้ป่วยในของโรงพยาบาล ที่ตรวจพบการติดเชื้อพยาธิปากขอ ระดับปานกลาง ถึงระดับรุนแรง โดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี simple smear จะพบไข่พยาธิมากกว่า 20 ใบ ต่ออุจจาระ 1 มิลลิกรัม และหรือตรวจพบไข่มากกว่า 8,000 ใบ ต่อ 1 กรัม อุจจาระด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง (องุ่น และ บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ, 2527) ผู้ป่วยเหล่านี้จะได้รับยาถ่ายพยาธิ Albendazole 400 มิลลิกรัม รับประทานครั้งเดียว 1-2 วันหลังได้รับยา ตัวอย่างอุจจาระจะถูกเก็บทั้งหมดเพื่อหาตัวแก่พยาธิ เมื่อได้ตัวแล้ว จะล้างด้วยน้ำประปาอย่างน้อย 10 ครั้ง ตามด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (โซเดียมคลอไรด์ 0.9%) อีกอย่างน้อย 10 ครั้ง เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนที่ติดมากับตัวพยาธิ ตรวจดูตัวพยาธิปากขอภายใต้กล้อง Telescope หรือ แว่นขยาย หลังจากนี้ตัวแก่พยาธิเหล่านี้จะถูกเก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาต่อไป

การแบ่งเพศและชนิดพยาธิปากขอ

การแบ่งเพศพยาธิปากขอเป็นตัวผู้ หรือตัวเมียดูที่ครึ่งหลัง (posterior half) ของตัวคือ ตัวผู้ ส่วนหางงอขึ้น ส่วนปลายสุดแผ่ออกเป็น bursa และ มี spicules 2 อัน การแบ่งชนิดพยาธิปากขอเป็น *Ancylostoma* หรือ *Necator* ทำได้โดยการตรวจรูปร่างลักษณะของปากและ ลำตัว ด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์แสง พยาธิปากขอชนิด Ancylostoma จะมี cutting teeth แต่ Necator มี cutting plates และในตัว

ผู้ของ Ancylostoma จะมี spicules 2 อัน ที่ปลายแยกจากกันแต่ใน Necator มี spicules 2 อันที่ปลายเชื่อมติดกัน การศึกษาเพศ และชนิดของตัวแก่ทำภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมโฮโมจีเนท พยาธิปากขอ

นำตัวแก่พยาธิปากขอแต่ละตัว มาเติมสารละลาย Lysing Buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนผสม 0.15% Triton X-100 และ 100 มิลลิโมล Tris-HCl pH 8.0 (ภาคผนวก จ.1) พยาธิที่เติมสารละลายนี้ถูกนำมาบดด้วยมือ ก่อนนำไปบดด้วยคลื่นเสียงแรงสูง ยี่ห้อ BRAUNSONIC 1510 การบดด้วยคลื่นเสียง 1 รอบ ประกอบด้วย 2 จังหวัะสลับกันไป จังหวะแรกเป็นการบดด้วยคลื่นเสียงใช้เวลา 30 วินาที จังหวะที่ 2 พักการบด 15 วินาที ทำเช่นนี้ สลับกันไป 30 นาที หรือจนกระทั่งตัวพยาธิแตกละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันหมดไม่มีเศษเนื้อเป็นชิ้นๆ โดยการดูตัวอย่างโฮโมจิเนทด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงขยาย 40x10 เท่าโฮโมจิเนทนี้จะถูกนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อของ SORVALL ความเร็ว 10,000 เท่าของแรงดึงดูดของโลกเป็นเวลา 15 นาที สารละลายใสๆ ส่วนบนจะถูกนำไป เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ขั้นตอนการทำข้างต้นทุกขั้นตอนกระทำภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนระดับไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร (มค.ก./มล) ของพยาธิแต่ละตัว ทำโดยเติมสารสีผสมลงในของเหลว ตัวอย่างพยาธิที่ต้องการรู้ปริมาณโปรตีน แล้ววัดการดูดแสง (Absorbance = A) เทียบกับการดูดแสงของโปรตีนมาตรฐาน (โบวีนเซรุมอัลบุมิน = BSA) ที่รู้ความเข้มข้นแล้ว (concentration = conc.)ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Bradford (1976) วิธีการทดลองมี 2 ขั้นตอน คือ

ก. <u>การสร้างกราฟมาตรฐาน</u>

กราฟของโปรตีนมาตรฐานเกิดจากการวัดค่าดูดแสงของโบวีนเซรุ่มอัลบุมินที่รู้ปริมาณความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยแกนนอนและแกนตั้งเป็น conc. และ A. ของโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้นนั้นๆ ตามลำดับ วิธีการทำคือ

1. <u>การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน</u> นำโบวีนเซรุ่มวัลบุมินมาละลายใน DDW เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานมีความเข้มข้น 10,20,30 และ 40 มค.ก/มล.

2. <u>การเตรียมสารสี</u> นำสารสีเข้มข้น Coomassie Brilliant Blue G–250 (ภาคผนวก ข) มาเจือจางด้วย DDW ด้วยอัตราส่วน 1:4

3. <u>การวัดค่าดูดแสงของโปรตีนมาตรฐาน</u> นำโบวีนเซรุ่มอัลบุมินแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100ไมโครลิตร ผสมกับสารสีเจือจางแล้ว 5 เท่าปริมาตร 1.2 มล. นำไปวัดค่าการดูดแสงของสารผสม ด้วยเครื่องวัดการดูดแสง (Spectrophotometer) SHIMADZU 160–UV ใช้ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร ภายในระยะเวลา 2–60 นาที หลังผสม นำค่า A. และปริมาณโปรตีนไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ข. <u>การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของตัวแก่พยาธิแต่ละตัว</u>

นำสารละลายตัวอย่างของพยาธิปากขอแต่ละตัว ปริมาตร 2–5 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น (กลั่น 2 ครั้ง) ซึ่งปราศจากเชื้อ ปริมาตร 98–95 ไมโครลิตร เป็นปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารสีเจือจาง 5 เท่า ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดแสงไปหาค่าปริมาณโปรตีนของตัวแก่แต่ละตัว จากกราฟมาตรฐานหรือจากสูตรของกราฟมาตรฐานดังนี้คือ

$$C = K \times (A_S - A_B)$$

C = ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์

K = ค่า slope ของกราฟมาตรฐาน

A_S = ค่าการดูดแสงของตัวอย่าง

A_B = ค่าการดูดแสงของ blank

วิธีศึกษารูปแบบโปรตีนของพยาธิตัวแก่

นำโฮโมจิเนทของพยาธิตัวแก่แต่ละตัวมาศึกษารูปแบบโปรตีนโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใช้เทคนิค โซเดียมโดดีซิล ซัลเฟต (เอสดีเอส) โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรฟอเรซิส (Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE) ใช้ความเข้มข้นของเจล 11% ตามวิธีการของ Laemmli (1970)

ก. การเตรียมตัวอย่างของพยาธิ

นำโฮโมจิเนทของ ตัวแก่พยาธิแต่ละตัว ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.4 ไมโครกรัม นำมาผสมกับบัฟเฟอร์ของตัวอย่างปริมาตรเท่ากัน การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (2x) มีส่วนผสมที่แน่นอนคือ 0.0625 M, Tris-HCl (pH 6.8), 2% เอสดีเอส, 10% กลีเซอรอล และ 5% Mercaptoethanol แล้วเติมสารสีฟ้า 0.01% Bromphenol blue (ภาคผนวก จ.2) เมื่อผสมเข้ากันดีแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 5 นาที ก่อนนำไปใส่ในช่องเจล

ข. <u>การเตรียมเจลแผ่นแบบตั้งตรง</u>

เตรียมเจลขนาด 10.5 x 8.5 x 0.075 เซนติเมตรโดยใช้ชุดเตรียมของ LKB Midget 2050 ซึ่งเนื้อเจลประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1. SEPARATING เจล 11% อยู่ส่วนล่างของแผ่น เตรียมจากสต๊อกของสารละลาย Acrylamide 30% (น้ำหนัก/ปริมาตร, ภาคผนวก ก) ผสมใน 0.375 M Tris-HCl pH 8.8 และ 0.1% เอสดีเอส ส่วนผสมเจลทำให้เกิด polymerize และแข็งตัวโดยการเติมสาร 10% APS และ TEMED อย่างละ 0.05% ของปริมาตรเจลทั้งหมด (ผนวก ง.1) ปิดผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นผสมกับ Isobutanol เข้มข้น เพื่อไล่ออกซิเจนบริเวณผิวออกไปและช่วยทำให้ขอบบนของเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งประมาณ 45-90 นาที

2. STACKING เจล เมื่อชั้น Separating เจลแข็งตัวแล้วเทน้ำและ Isobutanol ออกจนหมด เทเจล 5% บน separating เจล (เจลล่าง)วิธีเตรียมชั้น stacking เหมือนเจลล่าง ยกเว้นสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 (ภาคผนวก ง.2) หลังจากเติม APS และ TEMED เทเจลเสียบหวีแล้วปล่อยเจลทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้แข็งตัว

ค. <u>การทำอิเล็กโตรฟอเรซิส.</u>

เมื่อเจลแผ่นแข็งตัวแล้ว นำไปต่อเข้าระบบใส่อิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 0.025 M glycine 0.192 M และ เอสดีเอส 0.1% (ภาคผนวก จ.3) บรรจุตัวอย่างโฮโมจิเนทของพยาธิซึ่งเตรียมไว้ ใส่ช่องที่ stacking gel ช่องละ 1 ตัวอย่างพยาธิ และตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐาน (Protein molecular weight marker) เพื่อการเปรียบเทียบ และคำนวนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกได้ สำหรับตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐาน จะต้องใส่ทุกเจล ใช้กระแสคงที่ขนาด 20 มิลลิแอมแปร์ ในการทำอิเล็กโตรฟอเรซิส ต่อ 1 เจล ใช้เวลาประมาณ 45 นาที หรือจนกระทั่งขอบล่างของสารสีฟ้าเดินทางไปถึงขอบล่างเจล

ง. การย้อมสีเจลด้วย Silver และ Coomassie blue

ย้อมสีเจลด้วย Silver ตามวิธีการ ของ Wray และคณะ (1981)เพื่อแสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของรูปแบบโปรตีนพยาธิตัวแก่แต่ละตัวบนเจล และย้อมสีซ้ำด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อเพิ่มความไวในการติดสีแม้มีปริมาณโปรตีนน้อยมากระดับนาโนกรัม ทุกขั้นของการย้อมสีใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ กลั่น 2 ครั้ง กล่องพลาสติดสะอาด และใส่ถุงมือตลอดเวลา

1. วิธีการย้อมสีด้วย Silver หลังเสร็จจากอิเล็คโตรฟอเรซิสนำเจลมา fix ในสารละลายผสม 50% methyl alcohol (MeOH) และ 10% Acetic acid (AcOH) (ภาคผนวก ฉ.4) เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 2 ครั้ง ใช้เวลา 30 นาที แล้วแช่ใน 50% MeOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตรอย่างน้อย 30 นาที เพื่อขจัด ampholytes, detergent, reducing agent,catalyst และ buffer ions (Glycine) จากนั้นนำเจลไปย้อมสีเงิน โดยแช่ในสารละลายเงิน (silver-solution) 10 นาที ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ย้อมเจล สารละลายเงินประกอบด้วย silver nitrate ($AgNo_3$).05 กรัม ละลายใน NaOH-NH_4OH solution (ภาคผนวก ฉ.1) หลักการย้อมสีเงิน ล้างสารสีส่วนเกินที่ผิวข้างบนเจลออกด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 3 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ขั้นสุดท้ายนำเจลไปใส่กล่องพลาสติกที่มีสาร developer ซึ่งเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ สาร developer 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 40% formalin 50 ไมโครลิตร และ 1% citric acid 500 ไมโครลิตร เขย่ากล่องเบา ๆ ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จนกระทั่งแถบรูปแบบของโปรตีนปรากฏชัดเจน ล้างด้วยน้ำกลั่น (2 ครั้ง) ครั้งละ 250 มิลลิลิตร เมื่อล้างสีเงินส่วนเกินออกหมดแล้ว แช่เจลใน 1% AcOH ประมาณ 10 นาที เขย่าเบา ๆ จนเห็นแถบของโปรตีนเป็นสีทอง ล้างด้วยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตรอีกครั้ง จึงหยุดปฏิกิริยา developer ด้วยการเติม MeOH 50% ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เก็บเจลใน MeOH 50% จนกว่าจะนำไปอ่านผล

2. การย้อมสี Coomassie Blue หลังจากย้อมสีด้วย silver เจลจะถูกย้อมซ้ำด้วย Coomassie Blue R-250 ความเข้มข้น 0.1% ซึ่งละลายใน MeOH 50% และ AcOH 10% (ภาคผนวก ฉ.2) เป็นเวลา 15 นาที และล้างสีออกด้วย MeOH 10% และ AcOH 10% (ภาคผนวก ฉ.3) เจลที่ย้อมเสร็จตามขั้นตอนจะถ่ายรูปไว้ก่อนจึงนำไปทำให้เจลแห้ง

จ. <u>การทำเจลแห้ง</u>

การทำให้เจลแห้งทำโดยวิธีอบ (Oven drying) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Jaung และคณะ(1984) ดังนี้คือ

- นำเจลที่ย้อมสีแล้ว ล้างในน้ำกลั่น 5 นาที
- นำไปแช่ในสารละลายผสม MeOH 65% และ Glycerol 0.5% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ช.) เป็นเวลา 10 นาที
- นำเจลที่เปียกจากการแช่ ปิดด้วยแผ่น cellophane ซึ่งวางอยู่บนกระจก หนีบด้วยไม้หนีบ 4 ด้าน แล้วนำไปอบในตู้ความร้อนอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส ทิ้งค้างคืนจนเจลแห้ง
- นำเจลแห้งมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวิเคราะห์

<u>การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของตัวแก่พยาธิปากขอ</u>

นำรูปแบบโปรตีนของพยาธิปากขอ แต่ละตัวไม่ว่าชนิดหรือเพศใดที่ปรากฏบนแผ่นเอส ดี เอส โพลีอคริลาไมด์ เจล มาวิเคราะห์ศึกษาเชิงเปรียบเทียบโดยดูจำนวนแถบทั้งหมด ตำแหน่งแสดง ความเข้มการติดสีของแถบโปรตีนที่แตกต่างกันด้วยตาเปล่า คำนวนค่า MW และวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Laser Densitometer และ Gel Scan version 1,2 ของ LKB ซึ่งทำงานโดยใช้คำสั่งใน software computer ผลการสแกนเจล แถบโปรตีนต่าง ๆ จะให้ข้อมูลเป็น peak ต่าง ๆ ซึ่งสามารถวิเคราะห์เป็น พื้นที่ใต้ peak

ความสูง และ ตำแหน่งของ peak รวมทั้งพื้นที่สัมพัทธ์ แล้วสามารถ integrate ความเข้มข้นของแถบโปรตีนคาดคะเนได้จากการแบ่งช่วงความสูงของ peak ดังนี้คือ

+++ = ความสูง peak มากกว่า 0.8

++ = ความสูง peak มากกว่า 0.45-0.8

+ = ความสูง peak มากกว่า 0.30-0.45