บทที่ 2

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีทดลอง

2.1 อุปกรณ์

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่อุณหภูมิต่ำ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น Hermle Z320K, บริษัท BGH

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง (Ultracentrifuge) Hitachi รุ่น 55P-72, บริษัท Hitachi, Japan.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น spectronic 601 บริษัท Milton Roy, U.S.A.

เครื่องเก็บแยกส่วน (Fraction Collector) Waters บริษัท Millipore, U.S.A.

ปั๊มแบบเพอริสตอลติก Econo Pump System บริษัท Bio-Rad laboratories, U.S.A.

ชุดอิเลคโตรโฟรีซิส รุ่น Bio-Rad Minigel บริษัท Bio-Rad laboratories, U.S.A.

เครื่องทำเจลแห้ง (Gel Dryer) บริษัท Bio-Rad laboratories, U.S.A.

เครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงบนไมโครไตเตอร์เพลท (ELISA reader) รุ่น LP200 บริษัท Dinostics

2.2 สารเคมี

ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (Hydroxylapatite), บริษัท Bio-Rad laboratories, U.S.A.

เซฟาคริล เอส-300 (Sephacryl S-300), บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden.

โปรตีนมาตรฐาน: Sigma Marker High Range (36-205 kDa) ซึ่งประกอบด้วย glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ovalbumin, glutamic dehydrogenase, albumin, fructose-6-phosphate kinase, phosphorylase b, β-galactosidase และ myosin, บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

ถุงไดอะไลซิสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4 และ 22 มิลลิเมตร, บริษัท Thomas Scientific, U.S.A.

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวมาแล้วเป็นชนิดเกรดวิเคราะห์

2.3 สัตว์ทดลอง

ปลากะพงแดง, *L. argentimaculatus* เพศเมีย ความยาว 45.5 เซนติเมตร, น้ำหนัก 2.4 กิโลกรัม เลี้ยง ณ บ่อเลี้ยงปลาทะเลของสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อ. เกาะสีชัง จ. ชลบุรี

ปลากะพงแดง, *L. argentimaculatus* เพศเมียที่สมบูรณ์เพศ ความยาว 43.5 เซนติเมตร น้ำหนัก 2.2 กิโลกรัม น้ำหนักไข่ 34.01 กรัม

ปลากะพงแดง, *L. argentimaculatus* เพศผู้ ความยาว 46 เซนติเมตร, น้ำหนัก 3.2 กิโลกรัม, น้ำหนัก testis 1.52 กรัม

2.4 วิธีทดลอง

2.4.1 การเตรียมตัวอย่างพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง

นำปลากะพงแดงเพศเมียมาฉีดกระตุ้นที่กล้ามเนื้อบริเวณครีบหลังด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล (ในเอธานอลและนอร์มอลซาลีน 1:1) ปริมาณ 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 วัน ติดต่อกัน

หลังจากทำการฉีดกระตุ้นปลากะพงแดงเป็นเวลา 4 วัน แล้วนำปลากะพงแดงมาทำให้สลบด้วยควินาลดีน (quinaldine) เจาะเลือดปลาจากเส้นเลือดดำทางครีบหาง ปริมาตรประมาณ 30 มิลลิลิตร แบ่งใส่ในหลอดที่เคลือบด้วย PMSF 1% และเฮพาริน (heparin) หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสและป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้น นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกพลาสมาใส่ในหลอด ไมโครเซนติฟิวจ์ (microcentrifuge tube) แล้วเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปศึกษา

นำปลากะพงแดงที่ได้เก็บเลือดแล้ว มาผ่าท้องแล้วตัดเก็บไข่ออกมา โดยตัดชิ้นไขมันและเนื้อเยื่อออกให้หมด ชั่งน้ำหนัก แล้วเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาใช้

นำไข่ปลากะพงแดงมาสกัด โดยดัดแปลงวิธีของ Campbell และ Idler (1976) ตามขั้นตอนดังนี้

1) นำไข่มาชั่งน้ำหนักประมาณ 10 กรัม ล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.9%

2) เติมโซเดียมคลอไรด์ 0.9% 1:4 โดยปริมาตร แล้วนำไปบดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer OMNI 2000 ความเร็ว 1.5 เป็นเวลา 2 นาที

3) ปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4) นำส่วนใสด้านบนไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Ultracentrifuge) ด้วยความเร็ว 45,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5) นำสารละลายชั้นกลางสีเหลืองใสมาใส่ในถุงไดอะไลซิส(dialysing bag)แล้วทำการไดอะไลซิสในน้ำกลั่นปริมาตร 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

7) นำตะกอนมาละลายด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 1:4 โดยปริมาตร

8) นำสารละลายมาใส่ในถุงไดอะไลซิส แล้วทำการไดอะไลซิสในน้ำกลั่นปริมาตร 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

9) นำสารละลายจากถุงไดอะไลซิสมาปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

10) เก็บสารละลายใสส่วนบนมาทำให้เข้มข้น แล้วแบ่งเก็บไว้ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปแยกไวเทลโลเจนินต่อไป

2.4.2 <u>การแยกโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ออกจากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดง</u>

การแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 (ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hara และคณะ (1980) ดังนี้

2.4.2.1 <u>คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์</u>

นำไฮดรอกซิลอะพาไทต์ 2.5 กรัม แช่ในน้ำกลั่นตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเทส่วนใสและผงละเอียดทิ้ง ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง แล้วบรรจุลงในคอลัมน์พลาสติกขนาด 1.6 x 10 เซนติเมตร ให้ได้ความสูงของไฮดรอกซิลอะพาไทต์ 6 เซนติเมตร ผ่านสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 ลงในคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้สารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรไฮดรอกซิลอะพาไทต์ เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุล นำสารละลายที่ออกจากคอลัมน์มาวัดพีเอช เพื่อให้แน่ใจว่าคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลในสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.8

ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์แบบเป็นขั้นตอน (stepwise elution) ด้วยสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, 0.4 โมลาร์ และ 1.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 60 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) แฟร็กชั่นละ 2 มิลลิลิตร นำสารละลายในหลอดที่เก็บได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับ BSA (Bovine Serum Albumin) มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมพีคแต่ละพีคที่ได้จากการชะด้วยสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์,0.4 โมลาร์ และ 1.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 ไว้ด้วยกัน ทำให้เข้มข้น และนำพีคที่ชะด้วยสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์, พีเอช 6.8 (ที่มีไวเทลโลเจนิน) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300

2.4.2.2 <u>คอลัมน์เซฟาคริล เอส-300</u>

บรรจุเซฟาคริล เอส-300 ในคอลัมน์ขนาด 1.5 x 90 เซนติเมตร ซึ่งมีน้ำกลั่นบรรจุอยู่เกือบเต็ม ค่อย ๆ เทเซฟาคริล เอส-300 ลงในคอลัมน์พร้อม ๆ กับปล่อยน้ำให้ไหลออกจากคอลัมน์ บรรจุเซฟาคริล เอส-300 จนมีความสูงของเจล 75 เซนติเมตร ปล่อยไว้ให้เม็ดเจลเรียงตัวอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงผ่านสารละลายทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 ลงในคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้สารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจลเพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุล นำสารละลายที่ออกจากคอลัมน์มาวัด pH เพื่อให้แน่ใจว่าคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 8.0

นำสารละลายที่เก็บรวบรวมได้จากการชะของสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ จากข้อ 2.4.2.1 มาเติมลงในคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ชะด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์, พีเอช 8.0 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนแฟรกชั่นละ 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับ BSA มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บรวบรวมพีคของสารละลายไว้ด้วยกันและทำให้เข้มข้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปทดสอบลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินต่อไป

2.4.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (ไวทเทลโลเจนิน) โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส

หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกได้จากพลาสมาและไข่ของปลากะพงแดงโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟรีซีส (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Leammli (1970) ดังนี้

2.4.3.1 การเตรียมสารละลาย

สารละลายอะคริลาไมด์

นำอะคริลาไมด์ 29.1 กรัม และบิสอะคริลาไมด์ 0.9 กรัม มาละลายน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายทริส/ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์, พีเอช 8.8

ละลายทริส 18.17 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

สารละลายทริส/ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์, พีเอช 6.8

ละลายทริส 3 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

สารละลายเอสดีเอส 10%

ละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต 1 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

สารละลายอีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ละลายอีดีทีเอ 3.72 กรัมในน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 1 กรัมในน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer)

ผสมกลีเซอรอล 5 มิลลิลิตร, โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต 1 กรัม, บรอมฟีนอลบลู 0.5 มิลลิกรัม, เมอร์แคปโตเอธานอล 250 ไมโครลิตร และสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.25 โมลาร์, พีเอช 6.8, 2 มิลลิลิตร (ละลายทริส 1.52 กรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร) เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

สารละลายทริส/ไกลซีนบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์, พีเอช 8.3

ละลายทริส 3 กรัม, ไกลซีน 14.4 กรัม และโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.3 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

น้ำยาย้อมสีโปรตีน (0.1% coomassie brilliant blue R-250)

ผสม coomassie brilliant blue R-250, 0.25 กรัม ในส่วนผสมของเมธานอล: กรดอะซิติก: น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 4:1:5 โดยปริมาตร

น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution)

ผสมเมทานอล 400 มิลลิลิตรกับกรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.4.3.2 การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น

เตรียมสารละลาย separating gel 8% โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 30%, 2 มิลลิลิตร, สารละลายทริส/ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์, พีเอช 8.8, 1.875 มิลลิลิตร, สารละลายเอสดีเอส 10%, 150 ไมโครลิตร, สารละลายอีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, 75 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 3.317 มิลลิลิตร, TEMED 7.5 ไมโครลิตร และ สารละลายแอมโมเนียม-เปอร์ซัลเฟต 10%, 75 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน เขย่าเบา ๆ แล้วบรรจุลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ (0.75 มิลลิเมตร) ให้ได้ความสูงของเจล 5 เซนติเมตร ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของเจล ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัว โดยสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างน้ำกลั่นกับเจลชัดเจน จึงเทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล นำ comb มาเสียบระหว่างแผ่นกระจกเหนือผิวหน้าเจล จากนั้นจึงเตรียมสารละลาย stacking gel 3.48% โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 30%, 0.39 มิลลิลิตร, สารละลายทริส/ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์, พีเอช 6.8, 1.25 มิลลิลิตร, สารละลายเอสดีเอส 10%, 100 ไมโครลิตร, สารละลายอีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, 50 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 1.455 มิลลิลิตร, TEMED 5 ไมโครลิตร และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%, 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ แล้วบรรจุลงบนผิวหน้าเจลที่แข็งตัว จนเต็มแผ่นกระจก ตั้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัว แล้วดึง comb ออก

2.4.3.3 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการแยกและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

นำโปรตีนที่ได้จากการผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ในข้อ 2.4.2.2, พลาสมาของปลากะพงแดงก่อนและหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล, พลาสมาของปลากะพงแดงเพศเมียที่สมบูรณ์เพศ และพลาสมาของปลากะพงแดงเพศผู้ มาละลายในน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาณ

โปรตีนประมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) ที่มีความเข้มข้น 5 เท่า, 25 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปหยอดลงในช่อง (well) ของเจล ช่องละ 5 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีนประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) และนำโปรตีนมาตรฐาน (จากข้อ 2.2 ซึ่งเตรียมโดยละลายในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร) มาหยอดช่องละ 5 ไมโครลิตร

2.4.3.4 <u>การทำอิเลคโตรโฟรีซิส</u>

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ที่มีสารละลายทริส/ไกลซีนบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์, พีเอช 8.3 นำสารละลายโปรตีนและพลาสมาที่เตรียมในข้อ 2.4.3.3 มาใส่ลงในช่องเจล จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าขนาด 120 โวลต์ จนกระทั่งแถบสี (tracking dye) ในบัฟเฟอร์ตัวอย่าง เคลื่อนลงไปจนถึงส่วนของ separating gel จึงเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 140 โวลต์ ปล่อยให้แถบสีเคลื่อนที่ลงไปจนเกือบถึงปลายแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

2.4.3.5 <u>การย้อมสีแถบโปรตีนในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล</u>

นำแผ่นเจลมาย้อมสีโดยแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution) จนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอยู่บนแผ่นเจลชัดเจนและพื้นเจลใส นำแผ่นเจลที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำเจลแห้ง (gel dryer)

2.4.3.6 <u>การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน</u>

ทำโดยวัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่ และระยะทางที่แถบสีตามรอย (tracking dye) เคลื่อนที่ในแผ่นเจล แล้วคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility: Rm) จากสูตร

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

คำนวนค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ovalbumin, glutamic dehydrogenase, albumin, fructose-6-phosphate kinase, phosphorylase b, β-galactosidase และ myosin ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 36, 45, 55, 66, 84, 97, 116 และ 205 kDa ตามลำดับ

2.4.4 การทดสอบสมบัติความเป็นไลโปฟอสโฟกลโคโปรตีนของไวเทลโลเจนิน โดยวิธีโพลีอะคริ-ลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ ดัดแปลงจากวิธีของ Davis (1964)

2.4.4.1 การเตรียมสารละลาย

สารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer)

ผสมกลีเซอรอล 5 มิลลิลิตร, บรอมฟีนอลบลู 0.5 มิลลิกรัม และสารละลายทริส/ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.25 โมลาร์, พีเอช 6.8, 2 มิลลิลิตร (ละลายทริส 1.52 กรัม ในน้ำ 5 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

สารละลายทริส/ไกลซีนบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์, พีเอช 8.3

ละลายทริส 3 กรัม, ไกลซีน 14.4 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.3 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

น้ำยาย้อมสีไลโปโปรตีน (sudan black B staining solution)

ละลายซูดานแบล็คบี 0.5 กรัมในอะซีโตน 20 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก 15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

น้ำยาล้างสีย้อมไลโปโปรตีน

ผสมอะซิโตน 200 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก 150 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

น้ำยาย้อมสีไกลโคโปรตีน (fuchsin-sulfite staining solution)

ละลายโปตัสเซียมไพโรซัลไฟต์ 4 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดร-คลอริกเข้มข้น 5.25 มิลลิลิตร และฟุชซิน เบสิก 2 กรัม กวนเบา ๆ ข้ามคืน แล้วกรองด้วย active charcoal 2 กรัม เก็บในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายกรดเพอริดิก 1% ในสารละลายกรดอะซิติก 3%

ละลายกรดเพอริดิก 2.5 กรัม ในกรดสารละลายกรดอะซิติก 3%, 250 มิลลิลิตร

น้ำยาย้อมสีฟอสโฟโปรตีน (0.5% methylgreen)

ละลายเมธิลกรีน 0.5 กรัมในสารละลายกรดอะซิติก 7%, 100 มิลลิลิตร

สารละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก 10% ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

- ละลายแคลเซียมคลอไรด์ 7.351 กรัม ในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร
- ละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก 10 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้ง 2 ส่วนมาผสมกันแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

น้ำยาล้างสีย้อมฟอสโฟโปรตีน

ละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก 100 กรัมในน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.4.4.2 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ

เตรียมสารละลาย separating gel 7.5% โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 30%, 1.875 มิลลิลิตร, สารละลายทริส/ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์, พีเอช 8.8, 1.875 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 3.668 มิลลิลิตร, TEMED 7.5 ไมโครลิตร และ สารละลายแอมโมเนียม-เปอร์ซัลเฟต 10%, 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เขย่าเบา ๆ แล้วบรรจุลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกให้ได้ความสูงของเจล 5 เซนติเมตร ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของเจล ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเจลแข็งตัว โดยสังเกตจากรอยต่อระหว่างน้ำกลั่นกับเจลชัดเจน จึงเทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล นำ comb มาเสียบระหว่างแผ่นกระจกเหนือผิวหน้าเจล จากนั้นจึงเตรียมสารละลาย stacking gel 3.48% โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 30%, 0.39 มิลลิลิตร, สารละลายทริส/ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์, พีเอช 6.8, 1.25 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 1.685 มิลลิลิตร, TEMED 5 ไมโครลิตร และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%, 30 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ แล้วบรรจุลงในแผ่นกระจกบนผิวหน้าเจลที่แข็งตัวเช่นเดียวกับวิธีการเตรียมเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล

2.4.4.3 การเตรียมโปรตีนที่ต้องการแยก

นำสารละลายโปรตีนที่ได้จากข้อ 2.4.2.2. ผสมกับน้ำกลั่น ให้มีปริมาณโปรตีน 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (100 ไมโครลิตรในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่างความเข้มข้น 5 เท่าตัว, 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหยอดในช่องเจล ช่องละ 10-20 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีน 20-40 ไมโครกรัม/ช่องเจล) และใช้โปรตีนต่าง ๆ เป็นสารมาตรฐานดังนี้ BSA เป็นสารมาตรฐานเมื่อย้อมสีทดสอบโปรตีน, อะโปไลโปโปรตีน (apolipoprotein) เป็นสารมาตรฐานเมื่อย้อมสีทดสอบไลโปโปรตีน, โครีออนิกโกนาโดโทรปิน เป็นสารมาตรฐานเมื่อ

ย้อมสีทดสอบไกลโคโปรตีน และเคซีน (casein) เป็นสารมาตรฐานเมื่อย้อมสีทดสอบฟอสโฟ-โปรตีน

2.4.4.4 <u>การทำอิเลคโตรโฟรีซีส</u>

นำแผ่นเจลที่เตรียมไว้วางในอ่างบัฟเฟอร์ที่มีสารละลายทริส/ไกลซีนบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์, พีเอช 8.3 นำสารละลายโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่เตรียมในข้อ 2.4.4.3 ใส่ลงในช่องเจล จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีเคลื่อนที่มาจนถึง separating gel จึงเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 120 โวลต์ จนแถบสีเคลื่อนที่เกือบถึงปลายแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

2.4.4.5 <u>การย้อมสีแถบโปรตีนในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล</u>

เหมือนในข้อ 2.4.3.5

2.4.4.6 <u>การย้อมสีแถบไลโปโปรตีนบนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล</u>

ย้อมสีไลโปโปรตีน ตามวิธีของ Prat และคณะ (1969) โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลายซูดาน แบล็ค บี (sudan black B staining solution) ข้ามคืน จากนั้นนำมาล้างสีด้วยน้ำยาล้างสีย้อมไลโปโปรตีน จนเห็นแถบสีดำของไลโปโปรตีน อยู่บนแผ่นเจลใส นำแผ่นเจลไปทำแห้งด้วยเครื่องทำเจลแห้ง

2.4.4.7 <u>การย้อมสีไกลโคโปรตีนบนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล</u>

ย้อมสีไกลโคโปรตีนตามวิธีของ Zacharius และคณะ (1970) ตามขั้นตอน ดังนี้

1) นำเจลมาแช่ในสารละลาย 12.5% TCA ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อเจล 1 แผ่น เป็นเวลา 30 นาที
2) นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในสารละลายกรดเพอริดิก 1% ใน สารละลายกรด-อะซิติก 3% เป็นเวลา 50 นาที
3) ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นอย่างน้อย 6 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นแช่เจลในน้ำกลั่นข้ามคืน
4) ย้ายเจลลงในสีย้อมไกลโคโปรตีน (periodic acid-Schiff's reagent) ในที่มืด เป็นเวลา 50 นาที
5) ล้างเจลด้วยสารละลายโปตัสเซียมไพโรซัลไฟต์ 0.5% 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
6) ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง
7) นำเจลไปทำแห้งด้วยเครื่องทำเจลแห้ง หรือเก็บไว้ในสารละลายกรดอะซิติก 7%

2.4.4.8 <u>การย้อมสีแถบฟอสโฟโปรตีนบนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล</u>

ย้อมสีแถบฟอสโฟโปรตีนตามวิธีของ Cutting และ Roth (1973) ตามขั้นตอน ดังนี้

1) นำเจลมาแช่ในสารละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก 10% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
2) ย้ายเจลลงในสารละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก 10% ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3) ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
4) ย้ายเจลลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
5) ล้างเจลด้วยสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 1% 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
6) ย้ายเจลลงในสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 1% ที่มีกรดไนตริกเข้มข้น 1 นอร์มอล เป็นเวลา 30 นาที
7) ย้ายเจลลงในสารละลายเมธิลกรีน 0.5% ในสารละลายกรดอะซิติก 7% เป็นเวลา 30 นาที
8) ล้างเจลด้วยสารละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก 10% จนเห็นแถบเขียวเข้มของฟอสโฟโปรตีนบนแผ่นเจล
9) นำแผ่นเจลไปแช่เก็บไว้ในสารละลายกรดอะซิติก 7%

2.4.5 <u>การหาปริมาณฟอสฟอรัส</u>

หาปริมาณฟอสฟอรัสในโปรตีนที่แยกได้ในข้อ 2.4.2.2 ในรูปของอัลคาไลน์-เลบายล์ ฟอสฟอรัส ตามวิธีของ Nath และ Sundararaj (1981) และ Norberg และ Haux (1985)

2.4.5.1 <u>การเตรียมสารละลาย</u>

<u>สารละลาย TCA 20%</u>

ละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 20 กรัม ในน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

<u>ซิลิโคทังสเตท รีเอเจนต์</u>

- ละลายโซเดียม เมตาซิลิเกต 0.213 กรัม ในน้ำกลั่น 24.25 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.75 มิลลิลิตร
- ละลายโซเดียมทังสเตทไดไฮเดรต 3.79 กรัมในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งสองส่วนผสมกัน จะได้สารละลายสีเหลืองใส

<u>โมลิบเดต รีเอเจนต์</u>

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต เตตราไฮเดรท 12.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 นอร์มอล ลงไป 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

<u>กรดเอธานอลิก ซัลฟิวริก</u>

เจือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ในเอธานอล 490 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

<u>สารละลายสแตนนัส คลอไรด์เข้มข้น</u>

ละลายสแตนนัส(II)คลอไรด์ ไดไฮเดรต 2 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร

<u>สารละลายสแตนนัส คลอไรด์เจือจาง</u>

นำสารละลายสแตนนัสคลอไรด์เข้มข้น 30 ไมโครลิตร เติมลงในกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล, 5970 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.4.5.2 <u>วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในไวเทลโลเจนินในรูปของอัลคาไลน์-เลบายล์ ฟอสฟอรัส (alkaline-labile phosphorus)</u> ดัดแปลงจากวิธีของ Nath และ Sundararaj (1981) และ Norberg และ Haux (1985) ตามขั้นตอนดังนี้

1) นำโปรตีนที่แยกออกจากคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ในข้อ 2.4.2.2 มา 100 ไมโครลิตร ตกตะกอนด้วยสารละลาย TCA 20% , 2.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2) ปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
3) นำตะกอนออกมาล้างด้วยเอธานอลร้อน, คลอโรฟอร์ม: อีเทอร์: เอธานอล (1: 2: 2), อะซีโตน และอีเทอร์ ตามลำดับ
4) นำตะกอนที่แห้งแล้วมาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งไว้ให้เย็น เติมกรดไฮโดร-คลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มอล, 1 มิลลิลิตร เพื่อปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางแล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตร
5) เติมสารละลายไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์: โทลูอีน (1:1) 5 มิลลิลิตร
6) เติมซิลิโคทังสเตท รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร
7) เติมโมลิบเดต รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นใช้เครื่องผสมสาร (vortex mixer) ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้จนแยกชั้น ใช้เวลาประมาณ 15 นาที

8) ใช้ปิเปตดูดชั้นของสารละลายไอโซบิวทิลแอลกอฮอร์: โทลูอีน (1:1) (ชั้นบน) ออกมาใส่ในหลอดทดลอง (ขนาด 15 มิลลิลิตร), 2 มิลลิลิตร

9) เจือจางด้วยสารละลายกรดเอธานอลิก ซัลฟิวริก 7.8 มิลลิลิตร

10) เติมสารละลายสแตนนัส คลอไรด์เจือจาง 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารทันที ตั้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร

2.4.5.3 <u>การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส</u>

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสโดยใช้โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) น้ำหนักโมเลกุล 136.09

เตรียมสารละลายโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น (stock solution) โดยละลาย KH_2PO_4 13.609 กรัม ในน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะมีฟอสฟอรัสอยู่ 30.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีฟอสฟอรัส 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำสารละลายเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ 29.97 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) ให้มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเป็น 640, 320, 160, 80, 40, 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน

นำสารละลายฟอสฟอรัสมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มาความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร แล้วเริ่มทำตามขั้นตอนในข้อ 2.4.5.2 ตั้งแต่ข้อ 5 เป็นต้นมา นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านจากฟอสฟอรัสมาตรฐานมาสร้างกราฟ โดยพลอตค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของฟอสฟอรัส นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากตัวอย่าง มาอ่านค่าปริมาณฟอสฟอรัสจากกราฟนี้ ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างจะคิดออกมาเป็นปริมาณฟอสฟอรัสต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ค่าที่ได้นี้เรียกว่า ปริมาณอัลคาไลน์-เลบายล์ฟอสฟอรัสต่อมิลลิกรัมของโปรตีน แล้วนำมาคำนวนเป็นเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสต่อมิลลิกรัมโปรตีน

2.4.6 <u>การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมาและไข่โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น</u>

นำโปรตีนที่แยกได้ในข้อ 2.4.2.2 ผสมกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ได้ของเหลวสีขาวหนืด จากนั้นนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังของกระต่ายขาว (subcutaneous injection) ตรงแนวข้างกระดูกสันหลังของกระต่าย ทำการฉีดซ้ำ (booster injection) ทุกสัปดาห์หลังจากที่ฉีดครั้งแรก 1 สัปดาห์ และก่อนทำการฉีดทุกครั้งจะเจาะเลือดจากเส้นเลือดแดงบริเวณหลังใบหูของกระต่ายมาตรวจวัดระดับแอนติบอดีทุกครั้งก่อน แล้ว

นำซีรัมของกระต่ายที่มีระดับแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินสูงสุดมาทำการทดสอบปฏิกิริยาโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่นดังนี้

ต้มอะกาโรส (agarose) 1.2% ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05โมลาร์, พีเอช 8.2 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปตอะกาโรสปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปล่อยลงบนกระจกสไลด์ขนาด 2.5x7.5 เซนติเมตร รอจนกระทั่งอะกาโรสแข็งตัว เจาะรูบนอะกาโรส นำไวเทลโลเจนินจากพลาสมาและไข่ที่แยกได้ในข้อ 2.4.2.2., พลาสมาของปลากะพงแดงเพศเมียที่สมบูรณ์เพศ, พลาสมาของปลากะพงแดงเพศผู้, พลาสมาของปลากะพงแดงที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 บีต้า-เอสตราไดออล และไข่สกัด มาหยอดลงในหลุม หลุมละ 5 ไมโครลิตร นำแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินมาหยอดลงในหลุมตรงกลาง 5 ไมโครลิตร เก็บแผ่นกระจกสไลด์ไว้ในกล่องที่มีความชื้น ตั้งไว้นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลที่ได้มาหยอดน้ำกลั่นให้เต็มหลุม แล้วใช้กระดาษฟางวางทับหน้าเจลบนแผ่นกระจกแล้วใช้หนังสือทับไว้อย่างน้อย 10 นาที นำสไลด์มาแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% เพื่อล้างเอาโปรตีนส่วนเกินออก อย่างน้อย 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 10 นาที นำมาทับด้วยกระดาษฟางอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนวุ้นใส (ใช้เวลาประมาณ 10-30 นาที) นำกระจกสไลด์ที่แห้งแล้วมาย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน (0.1% coomassie blue R-250) เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำยาล้าง สีย้อมโปรตีน (destaining solution) จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินบนแผ่นเจลใส

2.4.7 <u>การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินกับไวเทลโลเจนินโดยวิธี ELISA</u>

2.4.7.1 <u>การเตรียมสารละลาย</u>

<u>PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5</u>

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4 $12H_2O$) 2.87 กรัม, โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 8 กรัม, โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม และ Tween-20 0.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

<u>คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์, พีเอช 9.6</u>

- เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1 โมลาร์, 100 มิลลิลิตร (ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10.6 กรัม ในน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร)

- เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1 โมลาร์, 100 มิลลิลิตร (ละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 8.4 กรัม ในน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร)

นำสารละลายทั้ง 2 ส่วนมารวมกันเพื่อปรับพีเอชให้ได้ 9.6

<u>คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์, พีเอช 9.6</u>

นำคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 โมลาร์, พีเอช 9.6 , 2.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 42 มิลลิลิตร

<u>ไวเทลโลเจนินมาตรฐาน</u>

นำไวเทลโลเจนินที่ได้จากพลาสมา (ข้อ 2.4.2.2) เตรียมให้มีความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางด้วย PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5 แล้วนำมาเจือจางแบบอนุกรมให้มีความเข้มข้นของไวเทลโลเจนินเป็น 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>แอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน</u>

ใช้แอนติบอดีที่ได้จากข้อ 2.4.6 มาเจือจางด้วยคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์, พีเอช 9.6 ในอัตราส่วน 1: 10,000

<u>IgG conjugate HRP</u>

นำ IgG conjugate HRP ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr.A. Takemura มาเจือจางด้วย PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5 ในอัตราส่วน 1:2000

<u>สารละลายเจลาติน 1% ใน PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5</u>

ละลายเจลาติน 5 กรัม ใน PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5 ประมาณ 200 มิลลิลิตร แล้วอุ่นจนเจลาตินละลายหมด ตั้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรด้วย PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5 จนปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

<u>สารละลายซิตริกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์, พีเอช 5.5</u>

ละลายกรดซิตริก 3.65 กรัม, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4 $12H_2O$) 11.935 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 400 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชเป็น 5.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

<u>สารละลาย OPD</u>

ละลายออโธ-เฟนิลีนไดเอมีน 8 มิลลิกรัม ในสารละลายซิตริกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์, พีเอช 5.5, 12 มิลลิลิตร แล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5 ไมโครลิตร

2.4.7.2 การสร้างกราฟมาตรฐานไวเทลโลเจนินโดยวิธี ELISA

สร้างกราฟมาตรฐานไวเทลโลเจนินโดยวิธี ELISA แบบแซนวิช (sandwich method) บนไมโครไตเตอร์เพลท ดังนี้

1) นำแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน มาเติมในเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตรแล้วเก็บในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2) นำเพลทออกมาล้างด้วย PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5 หลุมละ 250 ไมโครลิตร 4 ครั้ง

3) เติมสารละลายเจลาติน 1% ใน PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4) นำเพลทออกมาล้างด้วย PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5 หลุมละ 250 ไมโครลิตร 4 ครั้ง

5) เติมไวเทลโลเจนินมาตรฐาน ความเข้มข้นต่าง ๆ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6) นำเพลทออกมาล้างด้วย PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5 หลุมละ 250 ไมโครลิตร 4 ครั้ง

7) เติม IgG-HRP หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8) นำเพลทออกมาล้างด้วย PBS-Tween บัฟเฟอร์, พีเอช 7.5 หลุมละ 250 ไมโครลิตร 4 ครั้ง

9) เติม OPD หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

10) เติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 4 นอร์มอล หลุมละ 50 ไมโครลิตร

11) นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปพลอตกับค่าความเข้มข้นของไวเทลโลเจนินมาตรฐาน ได้กราฟมาตรฐานไวเทลโลเจนิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย