บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับแอนติบอดี ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ได้รับยาอัลเบนคาโซล และ ยาไอเวอร์เมกติน โดยวิธี ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) และเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kDa ในน้ำเหลืองผู้ป่วยที่ได้รับยาอัลเบนคาโซล และ ยาไอเวอร์เมกติน โดยวิธี Western Blot

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษาเชิงทดลอง (Experimental Study) และนำใช้การสุ่มตัวอย่างแบบ randomized – control double blind study

การให้คำนิยามในเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational Definitions)

Cut – off = เป็นการหาค่าจุดตัดระหว่าง ค่าผลการทดสอบที่ให้ผลบวก กับ ผลลบ แยกจากกัน ชัดเจน เป็นค่าที่ใช้แยกระหว่างผลการทดสอบที่เป็นบวกหรือลบ โดยถ้าผลการทดสอบมีค่ามากกว่า cut – off ให้ถือว่า ได้ผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าน้อยกว่าเป็นลบ

อุปกรณ์

Magnetic stirrer (Thermolyne)

Stereomicroscope (Olympus)

Bio-shaker BR-300L (Taitec)

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด อ่านทศนิยมได้ 4 ตำแหน่ง (Precisa)

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด อ่านทศนิยมได้ 2 ตำแหน่ง (Precisa)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Ecomet)

ตู้เย็น 4° C (LG)

ตู้เย็น -40° C (Puffer Hubbard)

ตู้เย็น -20 °C (Whirlpool)

ตู้เย็น 4 °C (Sharp)

ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (Automatic Adjustable Micropipette) ขนาด 0.5 – 10, 20 – 200 และ 100 – 1000 ไมโครลิตร (GIBTHAI)

เครื่อง Centrifuge ขนาด 1.5 มล. x12 MICRO 12 (HANIL)

เครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Bio – Rad)

ตู้อบ (Memmert)

เครื่องกรองน้ำ Millipore (Milli-Q PF Plus)

Plate – Shaker (Titertek ™)

Finevortex (FINEPCR)

Hot plate (IKAMAG ® RCT)

Soniprep 150 (MSE Ltd. Crawley Sussex)

Heating box (ORGANON TEKNIKA N.V.)

Miini Trans – Blot ® Electrophoretic transfer Cell (Bio – Rad)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุ

กระบอกตวง ขนาด 10, 100, 500 และ 1,000 มล.

ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมี (Schott Duran)

ถุงมือยาง (Latex groves)

ที่วางหลอดทดลอง

บิกเกอร์ ขนาด 10, 100, 500 และ 1,000 มล.

ปากคีบ (forcep)

ปิเปตต์ทิป (Pipette tip) ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Euro Lab®)

หลอดทดลองขนาดเล็ก ชนิดมีฝาปิด (Micro tube) ขนาด 1.5 มล. (TTP®)

ถาดพลาสติก ขนาด 20x30x6 ซม.^{3}

กระดาษชำระ

ผ้าก๊อซ

หลอดหยดขนาดใหญ่สำหรับดูด AL_3 ของพยาธิตัวจี๊ด

เข็มเขี่ย (Needle)

กระดาษเซลโลเฟน

กระจกใส ขนาด 11x13 ซม.^{2}

ตัวหนีบ

Cuvettes

ขวดสีชาสำหรับใส่สารเคมี

แก้วรูปกรวยใช้ในการตกตะกอนพยาธิตัวจี๊ด

โกร่งบดยา, สาก

หลอดทดลองก้นแหลม

กระดาษ Nitrocellulose membrane

กล่องพลาสติก ขนาด 11x15 ซม.^{2} และ 8x11.5 ซม.^{2}

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

   - NaCl (amresco®)
   - KCl (J.T. Baker)
   - $NaHCO_3$ (AR®)
   - Bovine serum albumin (Sigma)
   - Pepsin (Sigma)
   - HCl (MERCK)
   - Alumina

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE

   - Acrylamide PAGE, 40% (Phamacia)
   - Methylenebis acrylamides (Pharmacia)

- Tris (USB®)
- Tris [hydroxymethyl] aminomethane (Sigma)
- Mercaptoethanol (Pharmacia)
- Ammonium persulphate (Phamacia)
- SDS (APS)
- TEMED (N' – tetramethylethylenediamine) (USB™)

3. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีเจล
   - Ethanol (MERCK)
   - Glacial acetic acid (MERCK)
   - Methonol (J.T. Baker)
   - Coomassie blue R – 250 (Amersham Pharmacia Biotech AB)
   - Ponceus S (Sigma)

4. สารเคมีที่เป็น Regent Kit
   - Silver Stain Kit (Bio – Rad)
   - Protein Assay Kit (Bio – Rad)
   - น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตราฐานสำหรับ เอสดีเอสอิเลคโตรโพริซิส (Pharmacia)

5. สารที่ใช้ในการทำ Western Blot

- Tween 20 (AMRESCO)
- Skim milk (HIMEDIA)
- Sodium azide
- 2, 6 – dichlorophenol-indophenol
- 30% H_2O_2 (PA Penrene)
- Conjugate, peroxidase-labelled anti-human immunoglobulin IgG

6. สารที่ใช้ในการทำ ELISA

- Na_2CO_3 (SIGMA)
- KH_2PO_4 (SIGMA)
- Na_2HPO_4 (SIGMA)
- Trisodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H2O$) (SIGMA)
- ABTS (SIGMA)
- 3 % H_2O_2 (SIGMA)
- Conjugate, peroxidase-labelled anti-human immunoglobulin IgG

ประชากร (Population)

ในการสุ่มกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยใช้เทคนิค randomized – control double blind study

1. กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาอัลเบนดาโซลจำนวน 14 ราย
2. กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาไอเวอร์เมกตินจำนวน 16 ราย
3. กลุ่มคนปกติ จำนวน 90 ราย

มีหลักเกณฑ์ในการคัดผู้ป่วยดังนี้

Inclusion criteria

การวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจี๊ดที่ผิวหนังคือ

1. การพบตัวพยาธิ
2. ถ้าไม่พบตัวพยาธิต้องมีหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้ โดยดูจากประวัติ อาการแสดง และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้

   2.1 มีประวัติรับประทานอาหารสุกๆดิบๆ ที่ทำจากสัตว์น้ำจืด เช่น ปลาน้ำจืด ปลาไหล งู กบ เป็นต้น

   2.2 มีอาการบวมแบบเคลื่อนที่ได้ (บวมติดต่อกันนานมากกว่า 48 ชั่วโมง)

   2.3 มีค่า absolute Eosinophil count มากกว่าหรือเท่ากับ 500 cumm.

   2.4 Western Blot for Gnathostomiasis positive

Exclusion criteria

1. ผู้ป่วยที่ใช้ยาฆ่าพยาธิภายใน 2 สัปดาห์ ก่อนการรักษา
2. อายุต่ำกว่า 15 ปีหรือมากกว่า 60 ปี
3. ผู้ป่วยที่ท้อง และผู้ป่วยให้นมบุตร

4. โรคเรื้อรังดังนี้

   4.1 โรคตับ (Liver disease)

   4.2 โรคไต (Renal disease)

   4.3 ผู้ป่วยโรคเบาหวาน (DM)

   4.4 โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง

5. มีประวัติการแพ้ยาในกลุ่ม เบนซิมิดาโซล หรือ อเวอร์เมกติน

การเตรียม Antigen

1. หั่นตับปลาไหลเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเติม Buffer ที่ช่วยในการย่อย (1 % pepsin และ 1 % HCl) ลงไปเป็นปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรตับ
2. ย่อยที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 3 – 4 ชั่วโมง โดยย่อยในตู้อบที่เขย่าตลอดเวลา
3. ทำการล้าง หลังจากนั้น ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
4. ตะกอนที่ได้ นำมาส่องหาพยาธิตัวจี๊ดด้วยกล้อง Stereomicroscope
5. ล้าง larva ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น
6. นำ larva ที่ได้มาบดด้วยโกร่ง และสากให้ละเอียดโดยเติม PBS และ Alumina ลงไปช่วยในการฉีก และบดตัวพยาธิ
7. จากนั้นนำไปทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเครื่อง Ultrasonicator ทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที
8. นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C แล้วเก็บส่วนที่เป็นของเหลวใส (Supernatant)

9. นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's method หรือ Commercial Kits ก็ได้

การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการวัดปริมาณโปรตีนจาก Antigen ที่เตรียมได้ ใช้ Bio-Rad Protein Assay (Bradford method) ซึ่งมีวิธีการทำ ดังนี้

1. เตรียม Standard protein ที่จะทำการวัด คือ 1 mg/ml ของ Bovine Serum Albumin (BSA) เตรียมเป็น 3 – 5 dilution ของ protein standard เช่น 1, 3, 5, 7 และ 9 µg/ml
2. โดยเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้กับตัวอย่างที่ต้องการวัด (ในที่นี่ใช้ น้ำกลั่น) เพื่อเป็นตัวแทนของโปรตีนที่จะทำการทดสอบ และสร้างเป็นกราฟมาตรฐานจากค่าที่วัดได้
3. เติม Standard solution แต่ละความเข้มข้น และ sample solution ใส่ลงในหลอดๆ ละ 80 µl
4. เติม Dye reagent concentration tube ละ 20 µl แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แต่ ไม่เกิน 1 ชั่วโมง
6. ใส่สารละลายผสมลงใน cuvettes และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 nm เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 nm แล้ว นำมาหาค่าปริมาณโปรตีนจากกราฟ มาตรฐาน

การตรวจด้วยวิธี ELISA

การหาสถานะที่เหมาะสมในการทำการทดสอบด้วยวิธี ELISA

Checkerboard titration

1. เจือจาง Antigen ด้วย 0.05 M Carbonate-bicarbornate buffer pH 9.6 ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 μg/ml
2. เติม Antigen ที่ทำการเจือจางแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 100 μl ลงในแต่ละหลุม
3. นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C
4. ล้าง Antigen ที่ไม่ต้องการออกด้วยน้ำยา Washing solution (Tween20-PBS) โดยใช้ Microshaker 2 ครั้ง
5. ยับยั้งส่วนที่ไม่ต้องการให้เกิดปฏิกิริยา ด้วย 1 % BSA ใน PBS pH 7.4-0.02 % sodium azide หลุมละ 150 μl เป็นเวลา 1 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C
6. ล้าง 2 ครั้ง
7. ทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองของผู้ป่วย Pool positive reference และ Pool negative reference ทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:400, และ 1:800 ด้วย diluent แล้วเติมหลุมละ 100 μl ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่งโมง
8. ล้าง 5 ครั้ง
9. ทำปฏิกิริยากับ Conjugate ทำการเจือจางด้วย T-PBS ที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000, 1:2000 และ 1:4000 โดยเติมหลุมละ 100 μl ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่งโมง
10. ล้าง 5 ครั้ง
11. เติม Substrate หลุมละ 100 μl จากนั้นอบในที่มืด 30 นาที
12. หยุดทำปฏิกิริยาด้วย 1 % SDS (Sodium dodecyl sulfate)
13. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm.

Prot.Ag	1 mg/ml				2 mg/ml				3 mg/ml					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Serum Dilute	
A				Bl				Bl				Bl	1:100	Pool Positive reference
B				Bl				Bl				Bl	1:200	
C				Bl				Bl				Bl	1:400	
D				Bl				Bl				Bl	1:800	
E				Bl				Bl				Bl	1:100	Pool Negative reference
F				Bl				Bl				Bl	1:200	
G				Bl				Bl				Bl	1:400	
H				Bl				Bl				Bl	1:800	
Conjugate dilution	1:500	1:1000	1:2000		1:500	1:1000	1:2000		1:500	1:1000	1:2000			

Bl = Blank

A-D = Pool positive reference ที่ความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:400, และ 1:800 ตามลำดับ

E-H = Pool negative reference ที่ความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:400, และ 1:800 ตามลำดับ

ปฏิกิริยาแต่ละความเข้มข้น ใช้ Conjugate ที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000, และ 1:2000 ตามลำดับ

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ด้วยวิธี ELISA แล้วนำมาทำการทดสอบกับน้ำเหลืองของผู้ป่วยจริงได้ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการวิจัยครั้งนี้ คือ

1. Protein Antigen ที่ความเข้มข้น 3 µg/ml
2. Serum Dilution ที่ความเข้มข้น 1:400
3. Conjugate Dilution ที่ความเข้มข้น 1:4,000

จากนั้น นำมาทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

1. เจือจาง Antigen ให้ได้ความเข้มข้น 3 µg/ml ด้วย 0.05 M Carbonate-bicarbornate buffer pH 9.6 (Coating solution)
2. เติม Antigen ที่ได้ปริมาณ 100 µl ลงในแต่ละหลุม
3. นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ / หรือ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C
4. ล้าง Antigen ที่ไม่ต้องการออกด้วยน้ำยา Washing solution (Tween20-PBS) โดยใช้ Microshaker 2 ครั้ง
5. ยับยั้งส่วนที่ไม่ต้องการให้เกิดปฏิกิริยา ด้วย 1 % BSA ใน PBS pH 7.4-0.02 % sodium azide หลุมละ 150 µl เป็นเวลา 1 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C
6. ล้าง 2 ครั้ง
7. ทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองของผู้ป่วย Pool positive reference และ Pool negative reference ทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 1:400 โดยเจือจางด้วย diluent หลุมละ 100 µl ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่งโมง
8. ล้าง 5 ครั้ง
9. ทำปฏิกิริยากับ Conjugate ทำการเจือจางด้วย T-PBS ที่ความเข้มข้น 1:4000 หลุมละ 100 µl ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่งโมง
10. ล้าง 5 ครั้ง
11. เติม Substrate หลุมละ 100 µl จากนั้นอบในที่มืด 30 นาที

12. หยุดทำปฏิกิริยาด้วย 1 % SDS

13. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm.

การหาค่า Cut-off

ค่า พิจารณาจากการหา ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน จาก ค่าการดูดกลืนแสง ของกลุ่ม Negative reference ที่ใช้ในการวิจัย

Cut-off = X + SD of ODs Negative reference

การทำ SDS-PAGE

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกโปรตีนจากตัวอย่าง แล้วทำการตรวจสอบ ด้วยการย้อมสี (Straining)

ขั้นตอนการเตรียมเจล (Preparation of gel)

ในการเตรียมเจล เนื้อเจลประกอบด้วย 2 ส่วน ซึ่งปรับปรุงมาจากวิธีของ Harlow and Lane (1988) คือ

เจลชั้นล่าง (Resolving Gel : 12 %)	5 ml.	10 ml.
H_2O	1.6	3.3
30 % acrylamide mix	2.0	4.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5
10 % SDS	0.05	0.1
10 % ammonium persulfate	0.05	0.1
TEMED	0.002	0.004

<u>เจลชั้นบน</u> (Stacking Gel : 5 %)	1 ml.	2 ml.
H_2O	0.68	1.4
30 % acrylamide mix	0.17	0.33
1.5 M Tris (pH 8.8)	0.13	0.25
10 % SDS	0.01	0.02
10 % ammonium persulfate	0.01	0.02
TEMED	0.001	0.002

โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้คือ

1. ทำการประกอบเครื่องมือ และเตรียมแผ่นกระจกสำหรับใส่เจล ตามคู่มือ
2. เตรียมเจลชั้นล่าง (Resolving Gel ; 12 %) ตามส่วนผสมข้างต้น แล้วใส่ลง Plate ที่เป็นแผ่นกระจก ประมาณ 3.5 ml. ซึ่งส่วนผสม 2 อย่างสุดท้าย คือ ammonium persulfate และ TEMED จะเป็นตัวทำให้เจลแข็งตัว จากนั้นเติม ddH_2O ลงไปประมาณ 1 ml. เพื่อให้หน้าเจลเรียบ ทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที
3. ซับน้ำออก ด้วยกระดาษทิชชู จากนั้นจึงเตรียมเจลชั้นบน (Stacking Gel ; 5 %) แล้วใส่ลง Plate แล้วนำหวี (Comb) ใส่ด้านบนของเจลชั้นบนทันที ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว
4. เมื่อเจลแผ่นแข็งตัวแล้ว นำหวี (Comb) ออก แล้วนำ Plate ที่มีเจลใส่ใน Tank
5. เติม 1x SDS-Plate Gel Running buffer ใน Tank ด้านในให้ท่วมพอดีเจล และด้านนอกพอท่วมเส้นลวด (หรือ ประมาณครึ่ง Tank)
6. ทำการเติม Antigen 150 µl (เตรียม Antigen โดย ใส่ Antigen150 µl + diluent 150 µl แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C เป็นเวลา 3 นาที) และตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุล

ของโปรตีนมาตราฐาน (Protein Molecular Weight Marker) 3 µl เพื่อการเปรียบเทียบ

7. ทำการต่อเข้าระบบ ใช้กระแสไฟคงที่ ขนาด 100 V เป็นเวลา 110 นาที

การตรวจสอบโปรตีน หลังจากการทำ SDS-PAGE

1. การย้อมด้วย Commassie Brilliant Blue (Commassie Brilliant Blue Staining)
   - ย้อมเจลด้วย 0.2 % Commassie Blue เป็นเวลา 30 นาที
   - ทำการล้างสีที่เจลออกด้วย Destaining solution
   - ล้างเจลด้วย ddH_2O
2. การย้อมด้วย Silver (Silver Staining)

   ใช้ Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad)
   - วางเจลลงในน้ำยา Fixative (50 % Methanol, 10% acetic acid, 10% Fixative Enhancer Concentration, 30% ddH_2O v/v) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 20 นาที
   - ล้างเจลใน ddH_2O 2 ครั้งๆละ 10 นาที
   - วางเจลใน Silver reagent (35 ml ddH_2O, 5 ml Silver Complex Solution, 5 ml Reduction Moderator Solution, 5 ml Image Development Reagent, 50 ml Develooment Accelerator Solution) และเขย่าเบาๆ เป็นเวลาประมาณ 15 – 20 นาที
   - หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่เจลใน 5% acetic acid เป็นเวลา 15 นาที
   - ล้างเจลด้วย ddH_2O 5 นาที ประมาณ 2 ครั้ง

การทำเจลให้แห้ง

การทำเจลให้แห้งทำโดย นำเจลที่ย้อมสีแล้วปิดด้วยกระดาษเซลโลเฟนที่ชุบน้ำ ซึ่งวางอยู่บนกระจก แล้วหนีบด้วยตัวหนีบทั้ง 4 ด้าน ทิ้งข้ามคืนจนเจลแห้ง

การทำ Protein Blotting (Western Blotting) และ Immunodetection

1. เตรียม Nitrocellulose paper, support pads และ filter papers แช่ในสารละลาย transfer buffer จนอิ่มตัว
2. หลังจากทำ SDS – PAGE แล้ว ใส่เจลใน transfer buffer pH 8.3 ประมาณ 15 – 30 นาที
3. เตรียมการ transfer gel แบบ sandwich โดยเรียงลำดับตามนี้

Support pads – filter paper (anode +) – NCP – gel – filter paper – support pads

4. transfer ชิ้นของโปรตีนจากเจลลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ที่ความต่างศักย์ 100 Volt ด้วยกระแส 350 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่ความต่างศักย์ 30 Volt ด้วยกระแส 90 mA ทิ้งไว้ข้ามคืน
5. หยุดกระแสไฟฟ้า
6. ล้าง blot (membrane) ด้วย PBS
7. ย้อมรูปแบบของโปรตีนด้วย Ponceus S (SIGMA) ประมาณ 2 – 3 นาที
8. แล้วล้าง membrane ด้วยน้ำกลั่น และทำเครื่องหมายที่รูปแบบโปรตีนแต่ละน้ำหนักโมเลกุล
9. ตัด strip โดยแยกส่วนที่เป็นโปรตีนมาตราฐานมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
10. ล้าง blot (membrane) ด้วย Tween20 – PBS จนกระทั่งสะอาด

การตรวจวัดแอนติบอดี (Antibody Detection)

1. ยับยั้งโปรตีนส่วนที่ไม่ต้องการในการทำปฏิกิริยาที่อยู่บน nitrocellulose membrane ด้วย Blocking solution
2. ตัด blot เป็น strip เล็กๆ เท่าๆกัน (ถ้า strip แห้งให้แช่ strip ใน Tween20 – PBS)
3. นำ strip มาทำปฏิกิริยากับน้ำเหลือง ทำการเจือจางด้วย Tween20 – PBS ที่ความเข้มข้น 1 : 100 (รวมถึง positive control, negative control และน้ำเหลืองจากการติดเชื้อพยาธิชนิดอื่น ฯ ล ฯ) ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาข้ามคืน
4. ล้างด้วย Tween20 – PBS บน rocking platform 5 ครั้งๆละ 5 นาที
5. นำ strip มาทำปฏิกิริยากับ secondary antibody (conjugate, peroxidase – labeled anti – human immunoglobulin IgG, 1:1000) เจือจางด้วย PBS เป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง บน rocking platform
6. ล้าง
7. ตรวจวัดการทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันโดยใช้ substrate solution (ประกอบด้วย 2,6 – dichlorophenol – indophenol) เป็นเวลา 5 นาทีหรือมากกว่า
8. คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนตามระยะทางที่เคลื่อนที่

การแปลผลการทดสอบ

แถบโปรตีนที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองที่ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่นและกลุ่มคนปกติ และแถบโปรตีนนี้จะพบเฉพาะในน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่เป็นพยาธิตัวจี๊ดเท่านั้น

I21704831

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูล การทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยดูการเปลี่ยนแปลงระดับแอนติบอดีของกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาอัลเบนดาโซล และ กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาไอเวอร์เมกติน ซึ่งนำค่า cut – off ที่ได้จากค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มคนปกติ รวม กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มาเป็นจุดตัดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ได้ผลบวก กับผู้ป่วยที่ได้ผลลบ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูล การทดสอบด้วยวิธี Western Blot โดยนำรูปแบบโปรตีนของกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาอัลเบนดาโซล และ กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาไอเวอร์เมกติน ที่ปรากฏบนแผ่น nitrocellulose membrane มาวิเคราะห์ศึกษาเชิงเปรียบเทียบ โดยดูการเปลี่ยนแปลงจำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏทั้งหมด และดูน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 24 kD เป็นโปรตีนที่เฉพาะกับผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจี๊ด

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ทำได้โดย คำนวณค่า R_f ซึ่งได้จาก ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุล หารด้วย ระยะการเคลื่อนที่ของ dye marker แล้วหาค่า $\log_{10}$ (M.W.) จากกราฟมาตรฐาน (Calbribation curve) ซึ่งสร้างจากค่า R_f และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (M_r(Da)) จากนั้นคำนวณกลับออกมาเป็นน้ำหนักโมเลกุล (M.W.)

ในการวัดปริมาณโปรตีน สามารถหาค่าปริมาณโปรตีนที่วัดได้โดย สร้างกราฟมาตรฐานจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm. ของตัวอย่างที่ทำการวัดมาหาค่าโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น

ในการเปรียบเทียบการติดตามผลการรักษาของกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาอัลเบนดาโซล และกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาไอเวอร์เมกติน สามารถเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ t – test เพื่อดูความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม