2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

ปลาตัวอย่าง

ปลาที่ใช้ในการศึกษาคือปลากระบอกดำเพศเมีย ที่มีขนาดลำตัวยาว 10-20 เซนติเมตร จากบริเวณชายฝั่งปากแม่น้ำสวี อำเภอสวี จังหวัดชุมพร และคลองปากละวะ อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา ปลาบางส่วนได้รับความอนุเคราะห์จากคุณชวลิต จินาชี และ คุณกรชนก วุ่นหนู

กระต่าย

กระต่ายที่ใช้สังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายขาว ตาแดง เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน ซึ่งเลี้ยงไว้ในหน่วยสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และให้อาหารปกติ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	J.T. Baker
Acrylamide	Merck
Amido black B	Sigma Chemical Co.
Ammonium persulphate	Merck
Ammonium sulphate	Merck

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate	Sigma Chemical Co.
Bisacrylamide (N,N'-methylene diacrylamide)	Fluka Chemika-Biochemika
Bovine serum albumin	Sigma Chemical Co.
Broad range protein molecular weight marker	Promega Corporation
Bromophenol blue	Carlo Erba
Calcium chloride	Unilab
Carboxymethyl-cellulose	Sigma Chemical Co.
Citric acid	Ajex Chemicals
Coomassie brilliant blue G-250	Sigma Chemical Co.
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma Chemical Co.
3,3'-Diaminobenzidine	Sigma Chemical Co.
Diethylaminoethyl-Sephacel	Sigma Chemical Co.
Dimethylsulphoxide	Lab-Scan
2,4-Dinitrofluorobenzene	Sigma Chemical Co.
Dipotassium hydrogen phosphate	Fluka Chemika-Biochemika
Ethanol	Merck
Ethylenediaminetetraacetic acid	Fluka Chemika-Biochemika
Freund's complete adjuvant	Sigma Chemical Co.
Freund's incomplete adjuvant	Sigma Chemical Co.
Glucose monohydrate	Seelze-Hannover
Glycerol	Sigma Chemical Co.
Glycine	UniVar
High molecular weight gel filtration calibration kit	Pharmacia
Hydrochloric acid	Merck

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Hydrogenperoxide	Carlo Erba
Leupeptin	Sigma Chemical Co.
Methanol	Merck
n-Octyl-β-D-glucopyranoside	Sigma Chemical Co.
o-Phenylenediamine dihydrochloride (tablet)	Sigma Chemical Co.
Phenylmethylsulphonylfluoride	Sigma Chemical Co.
Phosphoric acid	J.T. Baker
Potassium bromide	Merck
Potassium dihydrogen phosphate	Merck
Sodium borohydride	Fluka
Sodium carbonate anhydrous	Carlo Erba
Sodium chloride	Merck
Sodium dihydrogen phosphate	Merck
Sodium dodecyl sulphate	Riedel-de Haen
Sodium (meta) periodate	Fluka Chemika-Biochemika
Sulphuric acid	Lab-Scan
Superdex 200 HR 10/30 column	Pharmacia
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Fluka Chemika-Biochemika
Tris Base	Promega
Trisodium citrate dihydrate	Carlo Erba
Tween 20	Asia Pacific Specialty Chemical

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	GT410	Ohaus
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-5	Mettler
Centrifuge	5415C	Eppendorf
	5804R	Eppendorf
ELISA plate reader	Elx808	Bio-Tek Instruments Inc.
Fast protein liquid chromatography	-	Pharmacia Biotech
Micropipette	-	Gilson
Microtube pump MP-3	MP-3N	Eyela
Mighty small™ Transphor	TE22	Hoefer Phamacia Biotech
Orbital shaker	OS 20	Boeco
pH meter	Accumet 15	Fisher Scientific
Power supply	1000/500	Bio-Rad
Refrigerated super speed centrifuge	J2-21	Beckman
Slab gel electrophoresis apparatus	AE-6400	Atto
Ultracentrifuge	L8-70M	Beckman
UV-VIS spectrophotometer	160A	Shimadzu
Vortex	G-560E	Scientific Industries

วิธีการ

2.1 การเตรียมพลาสมาจากปลากระบอกดำ

นำปลาที่จับได้เจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณใต้กระดูกสันหลัง โดยใช้ acid citrate dextrose (ACD, 114 mM glucose - 72 mM NaCl - 27.2 mM sodium citrate - 2.62 mM citric acid) เป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำเลือดไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,610 x g ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที กำจัดเม็ดเลือดแดงออก แล้วเติม PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride) ในพลาสมาให้มีความเข้มข้นเป็น 1 mM แล้วเก็บไว้ที่ –20 °ซ

2.2 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง โดยทำควบคู่กับ BSA (bovine serum albumin) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน เจือจาง BSA มาตรฐานให้มีปริมาณโปรตีน 0 -10 ไมโครกรัม ผสมกับสารละลาย Bradford (0.01% Coomassie brilliant blue G-250 – 4.7% ethanol – 8.5% phosphoric acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี นาน 1-2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595)

2.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส

(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10x12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร

2.3.1 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 4-10% หรือ 6% ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel	Separating gel		
	3% (5 ml)	4% (3 ml)	6% (3 ml)	10% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.40 ml	0.60 ml	1.00 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.63 ml	-	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.50 ml	1.50 ml	1.50 ml
10% Ammonium persulphate	50 μl	30 μl	30 μl	30 μl
TEMED	5 μl	3 μl	3 μl	3 μl
Distilled water	3.82 ml	1.07 ml	0.87 ml	0.47 ml

2.3.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% glycerol และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ให้ได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นโปรตีนพอเหมาะ และเตรียมโปรตีนมาตรฐานในทำนองเดียวกัน

2.3.1.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris – 0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟคงที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.3.2 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) ตามวิธีของ Laemmli (1970) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล (6-18%) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	6% (3 ml)	18% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.60 ml	1.80 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	0.75 ml	0.75 ml
0.2 M EDTA	50 µl	30 µl	30 µl
10 % SDS	50 µl	30 µl	30 µl
10% Ammonium persulphate	50 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl
Distilled water	3.10 ml	1.56 ml	0.36 ml

2.3.2.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานโดยผสมสารตัวอย่าง 2 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.375 M Tris-HCl, pH 6.8, 6 mM EDTA, 4% SDS, 30% glycerol และ 0.021% โบรโมฟีนอลบลู ให้ได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นโปรตีนพอเหมาะ สำหรับโปรตีนมาตรฐานใช้ของบริษัท Promega ซึ่งอยู่ใน 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% กลีเซอรอล, 0.2 M เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) และ 0.007% โบรโมฟีนอลบลู

2.3.2.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องของเจลส่วนบนแยกกัน โดยใช้ 0.025 M Tris – 0.192 M glycine - 1% SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรฟอรีซิส เปิดกระแสไฟคงที่ 15 mA นาน

2 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.3.3 การย้อมสีโปรตีน

ย้อมสีโปรตีนในเจลด้วยสีคูมาซีบลู (Coomassie brilliant blue R-250) โดยแช่เจลในสารละลาย 0.08% คูมาซีบลู - 50% เมธานอล (methanol) - 7.5% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 5% เมธานอล - 7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

2.4 การทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำ

ทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากระบอกดำ ตามวิธีของพีรพงษ์ พึ่งแย้ม (2545) ดังต่อไปนี้

2.4.1 การแยกพลาสมาโดยวิธีการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูง (Ultracentrifugation)

นำพลาสมาปลากระบอกดำเพศเมียมีไข่ที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 10 มิลลิกรัม (1 มิลลิลิตร) ผสมกับ KBr 0.5 กรัม ใส่ลงก้นหลอดเซนตริฟิวจ์ เขย่าเบา ๆ ให้ KBr ละลายหมด จากนั้นเติมสารละลาย KBr ที่มีค่าความหนาแน่น 1.29 กรัมต่อมิลลิลิตร (d=1.29), 1.24 กรัมต่อมิลลิลิตร (d=1.24) และ 1.20 กรัมต่อมิลลิลิตร (d=1.20) ความหนาแน่นละ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ และสารละลาย KBr มีค่าความหนาแน่น 1.15 กรัมต่อมิลลิลิตร (d=1.15) และ 1.097 กรัมต่อมิลลิลิตร (d=1.097) ความหนาแน่นละ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปิดทับสารละลายชั้นบนด้วย 0.9% NaCl นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงในโรเตอร์ (rotor) SW41Ti ด้วยความเร็ว 14,433 x g นาน 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ หลังการเซนตริฟิวจ์ ดูดสารละลายออกมาใส่หลอดแยกกันครั้งละ 0.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายแต่ละหลอดไปไดแอไลซ์ (dialyse) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (TB) นาน 12 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง แล้วนำไปหาโปรตีน ทำ nondenaturing PAGE และนำสารละลายหลอดที่มีไวเทลโลจีนินรวมเข้าด้วยกัน แล้วทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose และไดแอไลซ์ใน TB

นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30

2.4.2 การแยกไวเทลโลจีนินโดยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30

ใช้คอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 ขนาด 1 X 30 เซนติเมตร ปริมาตรเรซินประมาณ 24 มิลลิลิตร ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC (fast protein liquid chromatography) ล้างและปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 – 1 mM PMSF (TB-PMSF) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วสูงซึ่งไดแอไลซ์เรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ฉีดใส่คอลัมน์ Superdex 200 HR ชะคอลัมน์ด้วย TB-PMSF ให้มีอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.3 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) และติดตามแถบโปรตีนโดยการทำ nondenaturing PAGE แล้วรวมสารละลายหลอดที่มีไวเทลโลจีนินเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose นำไปทดสอบการมีไวเทลโลจีนินด้วยแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ (พีรพงษ์ พึ่งแย้ม, 2545)

2.5 การเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ

2.5.1 การกระตุ้นการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ในกระต่าย

กระต่ายที่ใช้สังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายขาว ตาแดง น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน นำไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ซึ่งเตรียมได้จากคอลัมน์ Superdex 200 ไปฉีดในผิวหนัง 3-4 จุด และใต้ผิวหนัง 2-3 จุด โดยใช้ปริมาณไวเทลโลจีนินและระยะเวลาการกระตุ้น ดังนี้ สัปดาห์ที่ 1 และ 2 ฉีดไวเทลโลจีนินสัปดาห์ละ 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร และ อีก 2 สัปดาห์ต่อมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 0.8 มิลลิลิตร

เจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดบริเวณหู 5 มิลลิลิตร ทุกครั้งก่อนฉีดไวเทลโลจีนินแต่ละครั้ง และหลังจากการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์

ทิ้งเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 18 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 x g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บซีรัมไว้ที่ –20 °ซ เพื่อใช้ทดสอบแอนติบอดี

2.5.2 การทดสอบการมีแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

ทดสอบการมีแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน ด้วยวิธี Dot blot ดังนี้ นำสารละลายไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ปริมาณ 1 ไมโครกรัม (ปริมาตร 5 ไมโครลิตร) หยดลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลสที่ทำตารางขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ทิ้งให้แห้ง แล้วหยดสารละลาย 3 % BSA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้ง จากนั้นเติมซีรัมของกระต่ายก่อนและหลังฉีดไวเทลโลจีนิน ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างออกด้วย TBS (25 mM Tris-HCl, pH7.5 – 0.15 M NaCl) นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปแช่ในสารละลาย 2^{o}Ab (anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugate) ที่เจือจาง 1: 20,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TBS ที่มี 0.05 % Tween 20 (TBS-T20) นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง และล้างออกด้วย TBS นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นย้อมด้วยสารละลาย 3,3'-diaminobenzidine (DAB) เข้มข้น 0.052 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน TBS ที่มี 0.0082% H_2O_2 เป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยา และหยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่น ไนโทรเซลลูโลสด้วย TBS-T20 นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง และล้างออกด้วย TBS นาน 5 นาที จำนวน 5 ครั้ง

2.5.3 การแยกแอนติบอดี

หลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่าย 10-15 มิลลิลิตร ตั้งเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 18 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 x g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนซีรัม แล้วแยกแอนติบอดีจากซีรัมตามวิธีของ Warden และ Giese (1984) โดยนำซีรัมไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) ที่ความอิ่มตัว 50% นาน 10 ชั่วโมง แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 22,000 x g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ละลายตะกอนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 แล้วนำไปไดแอไลซ์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม นาน 10 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ผ่านลงคอลัมน์ DEAE-Sephacel (ขนาด 2.6 x 10

เซนติเมตร) ที่ปรับให้สมดุลก่อนด้วย TB, pH 7.5 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินจะหลุดออกมาในพีค (peak) แรก (Wallace, 1965) รวมสารละลายของพีคแรกเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose แล้วทดสอบการมีแอนติบอดีโดยวิธี Dot blot

2.6 การวัดปริมาณไวเทลโลจีนินโดย ELISA

2.6.1 การหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดปริมาณไวเทลโลจีนิน

ในการหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค ELISAนั้น มีขั้นตอนต่าง ๆ คือ

2.6.1.1 การเจือจางแอนติบอดีที่เหมาะสม

การวัดปริมาณไวเทลโลจีนินโดย ELISA มีการใช้แอนติบอดี 2 ชนิด คือ แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากระบอกดำ (1^{o}Ab) และแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (anti-rabbit IgG peroxidase conjugated, 2^{o}Ab) ในการทดสอบได้ใช้ปริมาณไวเทลโลจีนินสำหรับเคลือบผิวเพลท (plate) ที่ 500 ไมโครกรัมต่อหลุม และเจือจาง 1^{o}Ab ด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ (assay buffer, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 0.05% Tween 20) ที่ 1:1,000, 1:2,000, 1:3,000, 1:4,000, 1:6,000, 1:8,000 และ 1:10,000 ส่วน 2^{o}Ab เจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ ที่ 1:10,000, 1:25,000, 1:50,000, 1:75,000, 1:100,000 และ 1:200,000 ซึ่งนำไปทำตามขั้นตอนของ ELISA ดังนี้

ทำการทดลองแต่ละหลุม โดยนำไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์เจือจางด้วยบัฟเฟอร์เคลือบ (coating buffer, 50 mM Na_2CO_3, pH 9.6) เติมลงในเพลทหรือไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ขนาด 96 หลุม (Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Denmark) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 °ซ อย่างน้อย 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 – 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการล้างซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ขัดขวาง (blocking buffer,

0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 3% BSA – 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง แล้วเติม 1^{o}Ab ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติมสารละลาย 2^{o}Ab ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ล้างปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติม *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) ใน 50 mM sodium citrate phosphate, pH 5.0 ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H_2O_2 ใช้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (A492)

2.6.1.2 การหาภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ที่เหมาะสม โดยกำหนดปริมาณไวเทลโลจีนิน 500 ไมโครกรัมต่อหลุม และการเจือจางของ 1^{o}Ab และ 2^{o}Ab เป็น 1:3,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ หาภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาดังนี้ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสับสเทรท (substrate) ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส คือ OPD โดยกำหนดความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ 0.01% และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 20 นาที และความเข้มข้นของ OPD ในช่วง 0-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H_2O_2 โดยกำหนดความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 20 นาที และความเข้มข้นของ H_2O_2 ในช่วง 0-0.018% สำหรับระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม โดยกำหนดความเข้มข้น OPD ที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ 0.01% และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในช่วง 0-60 นาที จากนั้นนำไปทดลองตามวิธีการข้อ 2.6.1.1

2.6.2 การทำกราฟมาตรฐานไวเทลโลจีนิน

ทำกราฟมาตรฐานไวเทลโลจีนินโดยใช้ไวเทลโลจีนินสำหรับเคลือบผิวเพลทมีปริมาณต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-500 นาโนกรัม โดยกำหนดการเจือจางของ 1^{o}Ab และ 2^{o}Ab เป็น 1:3,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ ความเข้มข้น OPDที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ 0.01% และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 20 นาที จากนั้นนำไปทดลองตามวิธีการข้อ 2.6.1.1

2.6.3 การวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมา

ทำการเจือจางพลาสมาของปลาที่หาปริมาณโปรตีนแล้วด้วยบัฟเฟอร์เคลือบที่ 1:10, 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 โดยใช้ 1^{o}Ab และ 2^{o}Ab ที่เจือจางเป็น 1:3,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ ความเข้มข้น OPD ที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ 0.01% และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 20 นาที จากนั้นนำไปทดลองตามวิธีการข้อ 2.6.1.1

2.7 การศึกษาตัวรับไวเทลโลจีนินในเมมเบรนของเซลล์โอโอไซท์

2.7.1 การสกัดตัวรับไวเทลโลจีนินจากเมมเบรนของเซลล์โอโอไซท์

การสกัดตัวรับไวเทลโลจีนินจากเมมเบรนของเซลล์โอโอไซท์ ดัดแปลงวิธีของ Tao และคณะ (1996) ทำโดยนำรังไข่ปลากระบอกดำล้างด้วย TBS-PMSF แล้วกรองผ่านแผ่นตาข่ายไนลอนที่มีรูขนาด 320/420 แยกเอาเฉพาะโอโอไซท์ แล้วล้างด้วย TBS-PMSF อีกครั้ง จากนั้นนำโอโอไซท์ไปโฮโมจีไนซ์ (homogenize) ด้วย hand homogenizer ในบัฟเฟอร์ A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 0.5 M NaCl - 2 mM $CaCl_2$ - 1 mM PMSF และ 2 μM leupeptin) 10 stroke แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,200 x g ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 10 นาที ตะกอนที่ได้นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วย hand homogenizer ในบัฟเฟอร์ A 15 stroke แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิม นาน 10 นาที จากนั้นนำตะกอนไปล้างโปรตีนโยล์คออกโดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิม นาน 10 นาที 4-5 ครั้ง แล้วละลายตะกอนด้วย 250 mM Tris-HCl, pH 6 - 2 mM $CaCl_2$ - 1 mM PMSF - 2 μM leupeptin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์สกัด

(extracting buffer, 2 mM $CaCl_2$ - 0.3 M NaCl - 2% n-Octyl-β-D-glucopyrano side) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 30 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 18,900 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายส่วนใส (สารสกัดเมมเบรน) เพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีน และตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินโดยวิธีต่าง ๆ ต่อไป

2.7.2 การตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนโดย Western blot

นำสารสกัดเมมเบรนจากโอโอไซท์ แยกใน 6-18% gel ด้วย SDS-PAGE สภาพไม่รีดิวส์ จากนั้นขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลส ตามวิธีของ Towbin และคณะ (1979) โดยทำในบัฟเฟอร์ Towbin (0.025 M Tris – 0.192 M glycine – 20% methanol, pH 8.3) และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 500 mA นาน 1 ชั่วโมง ติดตามการขนถ่ายโปรตีนโดยย้อมด้วย 0.5% Ponceau S – 1% กรดน้ำส้ม ล้างสี Ponceau S ออกด้วย TB-NaCl (25 mM Tris–HCl, pH 7.5 – 0.5 M NaCl) จนสีออกหมด นำแผ่นไนโทรเซลลูโลสไปบ่มด้วย 3% BSA ใน TB-NaCl ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วย TB-NaCl นาน 10 นาที 2 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วยสารละลายไวเทลโลจีนินใน TB-NaCl ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง แล้วล้างแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วย TB-NaCl นาน 10 นาที 3 ครั้ง บ่มด้วยสารละลาย 1^{o}Ab ที่เจือจาง 1:1,000 ด้วย TB-NaCl ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วย TB-NaCl นาน 10 นาที 3 ครั้ง นำไปแช่ในสารละลาย 2^{o}Ab (เจือจาง 1:20,000 ด้วย TB-NaCl) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TB-NaCl ที่มี 0.35% Tween 20 นาน 10 นาที 2 ครั้ง และ TB-NaCl นาน 10 นาที 3 ครั้ง จากนั้นย้อมด้วยสารละลาย DAB เข้มข้น 0.052 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน TBS ที่มี 0.0082% H_2O_2 เป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยา และหยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วย TB-NaCl ที่มี 0.35% Tween 20 นาน 10 นาที 3 ครั้ง และ TB-NaCl นาน 10 นาที 5 ครั้ง

2.7.3 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนโดย ELISA

การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรน โดยนำสารสกัดเมมเบรนไปเจือจางด้วยบัฟเฟอร์เคลือบให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.6.1.1 โดยใช้ 1^{o}Ab และ 2^{o}Ab ที่เจือจางเป็น 1:3,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ แต่หลังการบ่มด้วยบัฟเฟอร์ขัดขวาง เพิ่มขั้นตอนการบ่มและไม่บ่มด้วยสารละลายไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ปริมาณ 500 ไมโครกรัม (ปริมาตร 150 ไมโครลิตร) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง

2.8 การเตรียมไวเทลโลจีนินเปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (Vitellogenin peroxidase conjugate, VPC)

การเตรียมไวเทลโลจีนินเปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต ซึ่งในวิทยานิพนธ์นี้ขอเรียกเป็น VPC ทำโดยยึดไวเทลโลจีนินให้ติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยดัดแปลงวิธีของ O' Sullivan และ Marks (1981) ดังนี้ นำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 0.5 มิลลิกรัม ละลายใน 0.3 M sodium bicarbonate, pH 8.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตัดส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์ออกด้วย 1% dinitrofluorobenzene ในเอธานอล (ethanol) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วตั้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.06 M sodium periodate ($NaIO_4$) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร คนให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วเติม 0.06 M glycerol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไดแอไลซ์ด้วย 0.01 M sodium carbonate buffer, pH 9.5 ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 16 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 0.5 มิลลิกรัม คนให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม sodium borohydride ($NaBH_4$) 0.5 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากันดี (มีฟองอากาศเกิดขึ้น) จึงนำไปเก็บที่ 4°ซ นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำไปไดแอไลซ์ด้วย TB ที่ 4°ซ นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดตะกอนโดยการเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 18,900 x g ส่วนใสที่ได้ไปแยก VPC ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Superdex 200 HR (ขนาด 0.5 x 40 เซนติเมตร มีปริมาตร 31.5 มิลลิลิตร) ที่เชื่อมต่อ

กับเครื่อง FPLC ซึ่งปรับให้สมดุลก่อนด้วย TB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ให้มีอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตร (A403) รวมทั้งนำไปหาแอคทิวีที (activity) ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ตามวิธีการข้อ 2.9.1

2.9 การศึกษาสมบัติของ VPC

2.9.1 การวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนั้นวัดได้โดยนำสารละลายแต่ละหลอดที่ผ่านคอลัมน์ Superdex 200 HR ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทหลุมละ 2 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย OPD ใน 50 mM sodium citrate phosphate buffer, pH 5.0 ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H_2O_2 ปริมาตร 150 มิลลิลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปวัดค่า A492

2.9.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ VPC โดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

หาน้ำหนักโมเลกุลของ VPC โดยใช้คอลัมน์ Superdex 200 HR ขนาด 0.5 x 40 เซนติเมตร ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC ซึ่งปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วย TB แล้วเติม VPC, $K_2Cr_2O_7$ (M_r 294) บลูเด็กซ์แตรน (blue dextran, M_r 2,000,000) และโปรตีนมาตรฐาน อันได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (thyroglobulin, M_r 669,000) เฟอร์ริติน (ferritin, M_r 440,000) คาทาเลส (catalase, M_r 232,000) อัลโดเลส (aldolase, M_r 158,000) BSA (M_r 67,000) เปอร์ออกซิเดส (M_r 44,000) และ โอวัลบูมิน (ovalbumin, M_r 43,000) ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจล (void volume, V_o) จากค่าปริมาตรชะของบลูเด็กซ์แตรนที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และปริมาตรทั้งหมด (total volume, V_t) ของคอลัมน์จากค่าปริมาตรชะของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 480 นาโนเมตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 หาปริมาตรชะ (elution volume, V_e) ของแต่ละโปรตีน แล้วคำนวณหาค่า distribution coefficient (K_{av}) ของโปรตีนแต่ละชนิดจากสมการ

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

นำค่าที่ได้เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน และคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของ VPC

2.10 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในเมมเบรนของเซลล์โอโอไซท์โดย Enzyme-Linked Vitellogenin Binding Assay (ELVBA)

2.10.1 การหาภาวะที่เหมาะสมของการใช้ VPC เพื่อใช้ในการทำ ELVBA

หาภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสใน VPC ดังนี้

2.10.1.1 การหาปริมาณ VPC ที่เหมาะสมในการใช้วัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรน

โดยเติม VPC ในไมโครไตเตอร์เพลท ปริมาณในช่วง 0-100 นาโนกรัม จากนั้นเติมสารละลาย OPD ใน 50 mM sodium citrate phosphate, pH 5.0 ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H_2O_2 ใช้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่า A492

2.10.1.2 การหาความเข้มข้นของ OPD ที่เหมาะสม

โดยกำหนดปริมาณของ VPC ในแต่ละหลุมเป็น 15 ไมโครกรัม ความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 0.01% และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเป็น 5 นาที หาความเข้มข้นของ OPD ในช่วง 0-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำตามวิธีการข้อ 2.10.1.1

2.10.1.3 การหาความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เหมาะสม

โดยกำหนดปริมาณของ VPC ในแต่ละหลุมเป็น 15 ไมโครกรัม ความเข้มข้นของ OPD เป็น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และระยะเวลาในการเกิด

ปฏิกิริยาเป็น 5 นาที หาความเข้มข้นของ H_2O_2 ในช่วง 0-0.016% จากนั้นทำตามวิธีการข้อ 2.10.1.1

2.10.1.4 การหาระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม

โดยกำหนดปริมาณของ VPC เป็น 15 ไมโครกรัมต่อหลุม ความเข้มข้นของ OPD เป็น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของ H_2O_2 เป็น 0.01% หาระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในช่วง 0-60 นาที จากนั้นทำตามวิธีการข้อ 2.10.1.1

2.10.2 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรนโดย ELVBA

วัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินในสารสกัดเมมเบรน โดยนำสารสกัดเมมเบรนที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ไปเคลือบบนผิวไมโครไตเตอร์เพลทให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 °ซ อย่างน้อย 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการล้างซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ขัดขวาง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย VPC ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร (15 นาโนกรัม) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติม OPD ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H_2O_2 ใช้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่า A492

2.10.3 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินของโอโอไซท์โดย ELVBA

2.10.3.1 การเตรียมโอโอไซท์

นำโอโอไซท์ที่แยกออกจากรังไข่ ล้างด้วย PBS (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 0.15 M NaCl) 2 ครั้ง แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 x g เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนตะกอนซึ่งเป็นโอโอไซท์ไปเติมบัฟเฟอร์

ขัดขวาง (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 – 0.15 M NaCl – 3% BSA) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิมเพื่อแยกโอโอไซท์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างโอโอไซท์ด้วย PBS 2 ครั้ง ด้วยการเซนตริฟิวจ์ จากนั้นนำโอโอไซท์แบ่งใส่หลอด ๆ ละ 0.2 กรัม นับจำนวนโดยเติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในโอโอไซท์ที่ชั่งไว้ 0.2 กรัม เขย่าให้โอโอไซท์กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน จึงดูดมาปริมาตร 25 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นกระจก แล้วนับโอโอไซท์ทีละฟองด้วยปลายเข็มฉีดยาบันทึกจำนวน ทำซ้ำกัน 4 ครั้ง และวัดขนาดของโอโอไซท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า โดยวัดขนาดจำนวน 10-15 ฟอง คำนวณขนาดของโอโอไซท์โดยเฉลี่ย

2.10.3.2 การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินโดย ELVBA

นำโอโอไซท์ที่เตรียมไว้ หลอดละ 0.2 กรัม จากข้อ 2.10.3.1 ไปเติม VPC ที่เจือจางด้วย 0.1 M PBS (0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 0.15 M NaCl) ให้มีปริมาณต่าง ๆ กัน ปริมาตรหลอดละ 400 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 4 ครั้ง แต่ละครั้งเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 x g นาน 5 นาที ดูดส่วนใสออกให้หมด จากนั้นเติม OPD ใน 50 mM sodium citrate phosphate buffer, pH 5.0 ที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี 0.01% H_2O_2 ปริมาตรหลอดละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 x g นาน 5 นาที เพื่อแยกโอโอไซท์ออก จากนั้นนำสารละลายส่วนใสไปวัดค่า A492 นำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณของไวเทลโลจีนินที่จับกับตัวรับต่อโอโอไซท์

2.10.4 การศึกษาผลของปัจจัยต่อการวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินโดย ELVBA

การวัดปริมาณตัวรับไวเทลโลจีนินโดย ELVBA มีปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ อุณหภูมิและระยะเวลาบ่มระหว่างโอโอไซท์กับ VPC, pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจาง VPC สำหรับบ่มโอโอไซท์ และความเข้มข้นของไอออน (ion) จึงได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมหรือผลของปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

2.10.4.1 การหาอุณหภูมิและระยะเวลาของการบ่มที่เหมาะสม

นำโอโอไซท์ที่เตรียมไว้หลอดละ 0.2 กรัม จากข้อ 2.10.3.1 บ่มกับ VPC (ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เจือจาง 1:400 เท่า ด้วย 0.1 M PBS ปริมาตรหลอดละ 400 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ อุณหภูมิห้อง (26 °ซ) และ 37 °ซ ณ แต่ละอุณหภูมิใช้ระยะเวลาของการบ่มในช่วง 0-8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดลองตามวิธีการข้อ 2.10.3.2

2.10.4.2 การหา pH ที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจาง VPC

นำโอโอไซท์ที่เตรียมไว้หลอดละ 0.2 กรัม จากข้อ 2.10.3.1 บ่มกับ VPC (ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เจือจาง 1:400 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ คือ acetate buffer, pH 4.0, 5.0, 5.5 และ 6.0 และ Tris-HCl buffer, pH 6.0, 7.0, 7.5, 8.0 และ 9.0 ปริมาตรหลอดละ 400 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง และใช้ระยะเวลาบ่มนาน 4 ชั่งโมง จากนั้นนำไปทดลองตามวิธีการข้อ 2.10.3.2

2.10.4.3 การศึกษาผลของ Ca^{2+} และ Mg^{2+}

นำโอโอไซท์ที่เตรียมไว้หลอดละ 0.2 กรัม จากข้อ 2.10.3.1 บ่มกับ VPC (ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เจือจาง 1:400 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M PBS ที่มี Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} ความเข้มข้นในช่วง 0-20 mM ปริมาตรหลอดละ 400 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่งโมง จากนั้นนำไปทดลองตามวิธีการข้อ 2.10.3.2