2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

สัตว์ทดลอง

กุ้งที่ใช้ในการศึกษา คือ กุ้งแชบ๊วย (Banana prawn, *Peneaus merguiensis* de Man) เป็นกุ้งที่มีขนาดลำตัวยาว 10-14 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 30 กรัม อายุ 300-350 วัน เลี้ยงในบ่อพื้นดินขอบซีเมนต์ ที่สถานีประมงชายฝั่งจังหวัดตรัง อำเภอสิเกาจังหวัดตรัง กุ้งตัวอย่างเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุพจน์ จึงแย้มปิ่น หัวหน้าสถานีประมงชายฝั่งจังหวัดตรัง และว่าที่ร้อยตรีชัยรัตน์ พุ่มช่วย นักวิชาการประมง

กระต่ายที่ใช้ศึกษาเม็ดเลือดแดงเป็นกระต่ายขาวตาแดงสายพันธุ์ New Zealand น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน ซึ่งเลี้ยงไว้ในหน่วยสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และให้อาหารปกติ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อจากบริษัทต่างๆ ดังนี้

จากบริษัท Ajax Chemicals ได้แก่ Citric acid, Calcium chloride และ Magnesium chloride

จากบริษัท Bio-Rad ได้แก่ Silver stain kit

จากบริษัท Difco Laboratories ได้แก่ Heparin, Luria-Bertani broth และ Tryptric soy agar

จากบริษัท Fluka ได้แก่ Ammonium sulphate, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ethylenediaminetetraacetic acid และ Glycine

จากบริษัท Merck ได้แก่ Acetic acid, Acrylamide, Bromophenol blue, Bisacrylamide (N,N'-methylene diacrylamide), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, β-Mercaptoethanol, Sodium citrate และ N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

จากบริษัท Pharmacia ได้แก่ Standard protein markers และ Superdex 200 HR 10/30 column

จากบริษัท Sigma Chemical Co. ได้แก่ Ammonium persulphate, Asialofetuin, Bovine serum albumin, Ethylenediaminetetraacetic acid, Ethyleneglycoltetraacetic acid, Fetuin, Fetuin-agarose, Galactose, Glucose, Glycerol, Mannose, N-Acetyl-D-glucosamine, N-Acetyl-D-galactosamine, N-Acetyl-D-mannosamine, N-Acetyl neuraminic acid, Porcine stomach mucin, Sodium dodecyl sulphate, Tris(hydroxymethyl)aminomethane และ Triton X-100

อุปกรณ์

Refrigerated superspeed centrifuge ของ Beckman รุ่น JA-20, Serofuge centrifuge ของ Clay Adams, Microcentrifuge รุ่น 5415C และรุ่น 5804R ของ Shimadzu, UV-VIS spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น 160A, Micropipette ของ Eppendoff และ Finn, Slab gel electrophoresis apparatus ของ Atto, Automatic fraction collector ของ Gilson รุ่น 202, Microtube pump MP-3 ของ Eyela, Vortex mixer ของ Scientific Industries, Power supply ของ Biorad รุ่น 1000/500, pH meter รุ่น PHM b1 ของ Radiometer Copenhagen และ Fast Protein Liquid Chromatography ของ Pharmacia Biotech

วิธีการ

2.1 การเตรียมซีรัมเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้ง

ใช้ผ้าก๊อซชุบน้ำทะเลจับตัวกุ้ง แล้วใช้เข็มเบอร์ 18 และกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร เจาะฮีโมลิมฟ์จากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ตรงบริเวณแอ่งเลือดที่เรียก ventral sinus เก็บฮีโมลิมฟ์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ฮีโมลิมฟ์แข็งตัว จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 30 นาที ส่วนใสที่ได้คือ ซีรัมใช้หาปริมาณโปรตีนและทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 การทดสอบสมบัติในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคติน

ดูดเลือดจากกระต่าย นำไปผสมกับเฮพาริน (heparin) เพื่อกันเลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 x g ที่ 4 °ซ นาน 5 นาที แล้วล้างเม็ดเลือดแดงด้วย TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.9% NaCl) โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิม 3 ครั้ง แขวนลอยเม็ดเลือดแดงใน TBS ด้วยความเข้มข้น 2% แล้วนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงตามวิธีของ Kilpatrick and Yeoman (1978) โดยผสมกับสารละลายเลคตินที่เจือจางแบบ 1:2 ตามลำดับ (1:2 serial dilution) 25 ไมโครลิตร กับ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดง 25 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทนสารละลายเลคติน

แอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (hemagglutinating activity, HA) มีค่าเป็นส่วนกลับของไตเตอร์ (titer) ที่เป็นค่าการเจือจางสูงสุดของสารละลายเลคติน ซึ่งยังทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้สมบูรณ์ ดังตัวอย่างเช่น ถ้าไตเตอร์มีค่า 1:8 แอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเซลล์มีค่า 8 หน่วยต่อปริมาตรสารละลายเลคตินที่ใช้ 25 ไมโครลิตร แอคทิวิทีจำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง(specific hemagglutinating activity) มีค่าเป็นแอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

2.3 การศึกษาผลการยับยั้งของน้ำตาลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลคติน

เจือจางสารละลายเลคตินให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 64 หน่วย ใช้เลคตินที่เจือจาง 25 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำตาลที่ต้องการทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในช่วง 0-400 mM ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำสารผสมทั้งหมดไปผสมกับสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย 2% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม จากการทดลองนี้สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินได้ 100%

2.4 การศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออน และ EGTA ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย

ไดแอไลซ์ (dialyse) สารละลายเลคตินในน้ำปลอดไอออน (deionized water) นาน 12 ชั่วโมง และตามด้วย TBS อีก 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเจือจางให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 64 หน่วย แล้วผสมเลคตินปริมาตร 25 ไมโครลิตร กับ EGTA (ethyleneglycoltetraacetic acid) ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำสารผสมทั้งหมดไปผสมกับ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เปรียบเทียบผลกับเลคตินที่ใช้ TBS แทน EGTA แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ EGTA ที่ยับยั้งเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้สมบูรณ์

ทำการทดสอบผลของไดวาเลนท์แคทไอออนซึ่งได้แก่ Ca^{+2} หรือ Mg^{+2} ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วยเลคตินโดยเจือจางสารละลายเลคตินให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 64 หน่วย ด้วย TBS ที่มี EGTA ณ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้สมบูรณ์ จากนั้นผสมสารละลายเลคตินปริมาตร 25 ไมโครลิตร กับไดวาเลนท์แคทไอออนความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำสารผสม

ทั้งหมดไปผสมกับ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เปรียบเทียบผลกับเลคติน ที่ใช้ TBS แทนไดวาเลนท์แคทไอออน

2.5 **ผลของ pH**

ทดสอบผลการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารละลายเลคติน ในช่วง pH 4 - 11 โดยใช้บัฟเฟอร์ต่าง ๆ ดังนี้ 50 mM sodium acetate, pH 4 - 6, 50 mM Tris-HCl, pH 6 - 9 และ 50 mM glycine NaOH, pH 9 - 11 ผสมบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร กับเลคติน 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเม็ดเลือดแดงกระต่ายเข้มข้น 10% ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที แล้วดูผลการเกาะกลุ่มเซลล์เทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS, pH 7.5 แทนบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ

2.6 **ความเสถียรต่อ pH**

ปรับสารละลายเลคตินให้มี pH อยู่ในช่วง 4 – 11 โดยใช้บัฟเฟอร์ต่อไปนี้ 50 mM sodium acetate, pH 4 - 6, 50 mM Tris-HCl, pH 6 - 9 และ 50 mM glycine NaOH, pH 9 - 11 นำแต่ละบัฟเฟอร์ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับเลคติน 10 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH ของเลคตินทุก pH กลับไปเป็น 7.5 โดย 0.5 M Tris-HCl, pH 7.7 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำเลคตินที่ปรับ pH เป็น 7.5 แล้วปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที แล้วดูผลการเกาะกลุ่มเซลล์เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS, pH 7.5 แทนบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ

2.7 **ความเสถียรต่ออุณหภูมิ**

ทดสอบความเสถียรของสารละลายเลคตินต่ออุณหภูมิ โดยการอุ่นเลคตินในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 °ซ นาน 20 นาที ทำให้เย็นโดยเร็วด้วยการแช่บนน้ำแข็ง กำจัดตะกอนที่อาจเกิดขึ้นโดย

การเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 2,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 10 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเทียบกับเลคตินซึ่งเก็บไว้ที่ 0 °ซ

2.8 การหาปริมาณโปรตีน

2.8.1 โดยวิธี Lowry

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยนำสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH :1% potassium sodium tartrate : 0.5% $CuSO_4$ อัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติมสารละลายฟอลิน-ฟีนอล (Folin- phenol reagent : น้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1) 0.3 มิลลิลิตร ผสมไว้นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานโดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.8.2 โดยวิธี Bradford

ทำการหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำควบคู่ไปกับโบวีนซีรัมอัลบูมินซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเจือจางโบวีนซีรัมอัลบูมินให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0-30 ไมโครกรัม ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Bradford (0.01% Coomassie brilliant blue G-250 - 4.7% เอธานอล (ethanol) - 8.5% phosphoric acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้กัน 1-2 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

2.9 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส

(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10x12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วนคือ เจลส่วนบน (stacking gel) มี

ความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร

2.9.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, Nondenaturing PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจล เป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	4% (3 ml)	12% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.40 ml	1.20 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
10% Ammonium persulphate	50 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl
น้ำกลั่น	3.82 ml	1.07 ml	0.27 ml

2.9.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยการผสมสารตัวอย่าง 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 (bromo-phenol blue) ให้ได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะ เตรียมโปรตีนมาตรฐานในทำนองเดียวกัน

2.9.1.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 18 mA นาน 2 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.9.2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) ตามวิธีของ Laemmli (1970) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	7% (3 ml)	15% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.70 ml	1.50 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
น้ำกลั่น	3.10 ml	1.46 ml	0.66 ml

2.9.2.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานโดยการผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% glycerol, 4% SDS, 4% เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู ให้ได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะ เตรียมโปรตีนมาตรฐานในทำนองเดียวกัน แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ก่อนทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

2.9.2.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris - 0.192 M

glycine - 1% SDS, pH 8.3 เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 18 mM นาน 2 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.9.3 **การย้อมสีโปรตีน**

2.9.3.1 **การย้อมด้วยสีคูมาซีบลู**

ย้อมสีโปรตีนในเจลด้วยสีคูมาซีบลู (Coomassie brilliant blue R-250) แช่เจลในสารละลาย 0.02% คูมาซีบลู - 50% เมธานอล (methanol) - 7.5% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 50% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วยสารละลาย 5% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

2.9.3.2 **การย้อมด้วยซิลเวอร์** (Silver stain)

ย้อมสีโปรตีนในเจลด้วยชุดย้อมซิลเวอร์ (silver stain kit) ของบริษัท Bio-Rad โดยแช่เจลในสารละลาย 40% เอธานอล - 5% กรดน้ำส้ม นานครั้งละ 15 นาที 2 ครั้ง จากนั้นแช่เจลต่อในออกซิไดเซอร์ (oxidizer) นาน 3 นาที แล้วล้างออกซิไดเซอร์ออกด้วยน้ำปลอดไอออน ล้างซ้ำจนกว่าเจลหมดสีเหลือง แล้วทำการย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ (silver reagent) นาน 15 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำปลอดไอออนอีกครั้ง แล้วแช่ในดีวีโลเปอร์ (developer) โดยเปลี่ยนดีวีโลเปอร์เมื่อดีวีโลเปอร์เป็นสีดำ ประมาณ 3-4 ครั้ง จนกว่าจะปรากฏแถบโปรตีนชัดเจน แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่เจลใน 5% กรดน้ำส้ม ระหว่างการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ต้องใส่ถุงมือยาง เนื่องจากการย้อมนี้มีความไวต่อปริมาณโปรตีนสูงมาก

2.10 **การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัม**

2.10.1 **โดยคอลัมน์** Fetuin-agarose

เตรียมคอลัมน์ Fetuin-agarose ที่มีขนาด 1.2 x 18 เซนติเมตร มีปริมาตรเจล 22 มิลลิลิตร ซึ่งปรับให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มี 0.3 M NaCl และ 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ในกรณีที่เป็นคอลัมน์ที่เคยใช้แล้ว ล้างคอลัมน์ด้วย 0.2 M sodium citrate - 0.2% Triton X-100 ตามวิธีของ Wallace (1965) แล้วล้างต่อด้วย 0.1 M sodium acetate, pH 4.5-0.5 M

NaCl จากนั้นปรับคอลัมน์ให้สมดุลตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

นำซีรัม 6 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ผ่านลงในคอลัมน์ Fetuin-agarose แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.3 M NaCl-0.1 M $CaCl_2$ ให้มีอัตราไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะคอลัมน์ด้วย 20 mM เอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยอัตราเร็วและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 ไดแอไลซ์ใน TBS แล้วทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกระต่าย รวมสารละลายหลอดที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose ไดแอไลซ์ใน TBS แล้วนำไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (ตามวิธีการข้อ 2.9.1)

2.10.2 **โดยคอลัมน์** Superdex 200

ปรับคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 (มีปริมาตรเจล 24 มิลลิลิตร) ให้สมดุลก่อนด้วย TBS ที่มี 20 mM เอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายเลคตินพีค (peak) F2 ปริมาณ 0.17 มิลลิกรัม ที่ได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ข้อ 2.10.1 ผ่านลงในคอลัมน์ Superdex 200 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ให้มีอัตราไหล 24 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.9 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 ไดแอไลซ์ใน TBS และทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย รวมสารละลายหลอดที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose และไดแอไลซ์ใน TBS แล้วนำไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

2.11 การศึกษาสมบัติของเลคตินบริสุทธิ์

2.11.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

จากการแยกเลคตินตามข้อ 2.10.2 โดยคอลัมน์ Superdex 200 สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ ได้โดยการแยกโปรตีนมาตรฐาน,

$K_2Cr_2O_7$ (M_r 294) และบลูเด็กซ์แตรน (blue dextran, M_r 2,000,000) ด้วยคอลัมน์และสภาวะเดียวกับการแยกเลคติน วัดปริมาตรชะ (elution volume, V_e) ของแต่ละโปรตีนโดยนำสารละลายแต่ละหลอดไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) หาปริมาตรทั้งหมด (total volume, V_t) ของคอลัมน์ได้จากการคำนวณค่าปริมาตรชะของ $K_2Cr_2O_7$ ซึ่งได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร และหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจลหรือ void volume (V_o) ของคอลัมน์ได้จากการคำนวณค่าปริมาตรชะของบลูเด็กซ์แตรนที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาค่า K_{av} (distribution coefficient) ของโปรตีนแต่ละชนิดได้จากสมการ

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

จากการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ได้

โปรตีนมาตรฐาน 4 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (thyroglobulin, M_r 669,000), อัลโดเลส (aldolase, M_r 158,000), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (M_r 67,000) และโอวัลบูมิน (ovalbumin, M_r 43,000)

2.11.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเลคตินบริสุทธิ์ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ตามวิธีของ Laemlli (1970) โดยทำควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟอริเลสบี (phosphorylase b, M_r 94,000), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (M_r 67,000), โอวัลบูมิน (M_r 43,000), คาร์โบนิคแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase, M_r 30,000), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor, M_r 20,000) และ แอลฟา-แลคตัลบูมิน (α-lactalbumin, M_r 14,000) หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสและย้อมสีโปรตีนแล้ว วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐานและของแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุล กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแต่ละแถบโปรตีนในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินตัวอย่างได้

2.11.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเลคตินบริสุทธิ์ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ตามวิธีของ Sigma Tech. Bulletin No. MRK-137 (10-86) โดยทำควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด ได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (M_r 669,000), เฟอร์ริติน (ferritin, M_r 440,000), คาทาเลส (catalase, M_r 232,000), แลคเทท ดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase, M_r 140, 000), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (M_r 67,000) หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสและย้อมสีโปรตีนแล้ว วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐานและของแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารตัวอย่าง สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน

2.11.4 การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตของเลคตินบริสุทธิ์ตามวิธีฟีนอลกรดซัลฟุริค (phenol-sulphuric acid) ของ Dubois *et al.* (1956) โดยนำสารตัวอย่างไปเจือจางด้วย TBS ให้มีปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมกับสารละลาย 5% ฟีนอล 0.3 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟุริคเข้มข้น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 484 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสารตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานที่มีกลูโคสหรือแมนโนสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน

2.11.5 **ผลของเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล**

นำเลคตินบริสุทธิ์ที่เจือจางให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 32 หน่วย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 0 - 25 mM ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำสารผสมทั้งหมดไปผสมกับ 25 ไมโครลิตร ของ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เปรียบเทียบผลกับเลคตินที่ใช้ TBS แทนเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล

2.11.6 **ผลของเอสดีเอส**

นำเลคตินบริสุทธิ์ที่เจือจางให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 32 หน่วย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับเอสดีเอสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 0 - 25 mM ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำสารผสมทั้งหมดไปผสมกับ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เปรียบเทียบผลกับเลคตินที่ใช้ TBS แทนเอสดีเอส

2.12 **การศึกษาบทบาททางชีวภาพของเลคติน**

2.12.1 **การทำปฏิกิริยาของเลคตินบริสุทธิ์กับอิมมูโนโกลบูลิน**

ทดสอบปฏิกิริยาระหว่างเลคตินบริสุทธิ์กับอิมโมโนโกลบูลิน ซึ่งได้แก่ IgG หรือ IgA ด้วยวิธี Ouchterlony double diffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1956) ดังนี้ เท 0.3% อะกาโรส (agarose) ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนแผ่น สไลด์ (slide) ทิ้งให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบที่ 80 °ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเท 1.5% อะกาโรสในน้ำเกลือปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์แผ่นเดิม ทิ้งให้เย็น เจาะอะกาโรสให้เป็นหลุม เติมเลคตินบริสุทธิ์ในหลุมกลาง หลุมข้างรอบ ๆ เติม IgG หรือ IgA แล้วเก็บสไลด์ไว้ในตู้เย็นที่ 4 °ซ ค้างคืน ถ้ามีปฏิกิริยาระหว่างเลคตินกับ Ig เกิดขึ้นจะเห็นแถบการตกตะกอน (precipitin band) ของเลคตินและ Ig ระหว่างหลุมที่ใส่เลคตินบริสุทธิ์กับหลุมที่ใส่ Ig เพื่อให้เห็นแถบตกตะกอนนี้ชัดเจนแช่สไลด์ในน้ำเกลือ 48 ชั่วโมง โดยการเปลี่ยนน้ำเกลือบ่อย ๆ แล้ว

ย้อมสไลด์ด้วยสีคูมาซีบลู (0.02%คูมาซี บลู-50% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม) นาน 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 5% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม

2.12.2 **การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย**

2.12.2.1 **การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย**

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบการเกาะกลุ่มประกอบด้วยแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้ง 3 ชนิด ได้แก่ *V. vulnificus*, *V. parahemolyticus* และ *V. harveyi* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร tryptric soy agar ที่มี 2% NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ค้างคืน ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อโดยการนำไปเลี้ยงใน tryptric soy broth จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียใน TBS โดยการเซนตริฟิวจ์ ล้างตกตะกอน และเตรียมแบคทีเรียในบัฟเฟอร์ดังกล่าวให้มีความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.1 หน่วย จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

สำหรับเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ที่ใช้ศึกษา ได้แก่ *Vibrio cholerae*, *E. coli* และ *Samonella typhi* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ควบคุมตรวจสอบสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ จังหวัดสงขลา กรมประมง เชื้อ *V. cholerae* เลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani ที่มี 2% NaCl สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *S. typhi* เลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ค้างคืน เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ แล้วดำเนินการต่อตามวิธีการข้างบน

2.12.2.2 **การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย**

เจือจางเลคตินบริสุทธิ์แบบ 1:2 ตามลำดับ ด้วย TBS นำเลคตินแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรีย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันดี วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที แล้วนำมาเขย่าที่ความเร็วสูงด้วยเครื่อง Vortex-Genie 2 ครั้ง ๆ ละ 20 วินาที และหยดสารผสมลงบนแผ่นสไลด์ สังเกตุการเกาะกลุ่มของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบพื้นดำ (dark field) หาค่าไตเตอร์หรือค่าการเจือจางของเลคตินสูงสุดที่ยังให้ผลการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียสมบูรณ์

2.12.3 **การวัดระดับของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อ** *V. harveyi*

เลี้ยงกุ้งเพศผู้ในบ่อซีเมนต์กลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เมตร โดยเตรียมบ่อก่อนเลี้ยงกุ้งดังนี้ ล้างบ่อ ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 2 วัน จากนั้นใส่น้ำทะเลที่ผ่านถุงกรองขนาด 5 ไมครอน (micron) ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร ลงในบ่อ ให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 6–10 ชั่วโมง แล้วนำกุ้งเพศผู้ที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งมีน้ำหนักประมาณตัวละ 25 กรัม ลงเลี้ยงในบ่อโดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทุก 4 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในบ่อ นาน 20 ชั่วโมง โดยสังเกตพบว่ากุ้งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ จากนั้นนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงไว้ใน tryptric soy broth (จากข้อ 2.12.2.1) ไปเซนตริฟิวจ์ ล้างตกตะกอนด้วยน้ำเกลือ และเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำเชื้อนี้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง สำหรับกุ้งที่เป็นชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตรเท่ากัน จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ หลังการฉีดสังเกตุอาการกุ้งเป็นระยะ ๆ แล้วเจาะฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อหรือกลุ่มควบคุม ปล่อยให้ฮีโมลิมฟ์แข็งตัว (ตามวิธีข้อ 2.1) จากนั้นทำการวัดแอคทิวิทีของเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของกุ้งเหล่านี้ตามวิธีการในข้อ 2.2 เปรียบเทียบระดับแอคทิวิทีของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม สำหรับตัวกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม นำไปทดสอบการติดเชื้อด้วยวิธีตรวจสอบการเรืองแสงของเชื้อในที่มืดโดยดัดแปลงวิธีของ Jiravanichpaisal *et al.* (1994) ซึ่งทำโดยชั่งน้ำหนัก hepatopancreas 0.1 กรัม นำไปบดและเจือจางในสารละลาย 1.5% NaCl ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อซนิดแข็ง TCBS (thiosulphate citrate bile salt) ที่มี 1.5% NaCl แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นดูการเรืองแสงสีเขียวของเชื้อในที่มืด

2.12.4 **การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของเลคตินในซีรัมกับเพศของกุ้ง**

เจาะฮีโมลิมฟ์ของกุ้งเพศผู้และเพศเมียที่มีอายุและขนาดใกล้เคียงกันในช่วงเวลาเดียวกัน อย่างละ 26 ตัว ปล่อยให้ฮีโมลิมฟ์แข็งตัว (ตามวิธีข้อ 2.1) จากนั้นทำการวัดแอคทิวิทีของเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของกุ้งเหล่านี้ตามวิธีการในข้อ 2.2 เปรียบเทียบระดับแอคทิวิทีของเลคตินในซีรัมของกุ้งทั้ง 2 เพศ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในข้อ 2.12.3 และ 2.12.4 โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (one way analysis of variance, ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์ความสัมพันธ์ SPSS (statistical package for the social science)