บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูพันธุ์วิสตาร์ (Wistar rats) เพศผู้อายุ 6 สัปดาห์ จากสถานสัตว์ทดลองภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน ในกล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อโซเลียส (soleus) และกล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์ดิจิทอรุมลองกัซ (extensor digitorum longus, EDL) และกล้ามเนื้อหัวใจของหนูอายุแรกเกิด, 3 เดือน (young), 6 เดือน (young adult) และ 12 เดือน (adult) แบ่งกลุ่มอายุโดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Narayanan (1987) กลุ่มอายุละ 10 ตัว สำหรับศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในแต่ละอายุ

1.2 สารเคมี

1.2.1 สำหรับเวสเทอร์นบล็อทติ้ง (Western blotting)

1. β-mercaptoethanol (BME)
2. ABC Kit
3. Acrylamide gel
4. Amonium persulfate
5. Anti-Mouse IgG, HRP-linked antibody
6. Anti-parvalbumin antibody
7. Aprotinin
8. Bovine serum albumin
9. Coomassie blue R-250

10. Distilled water
11. EGTA
12. ECL kit
13. Glycine
14. Leupeptin
15. Laemmli Sample Buffer
16. Methanol
17. Magnesium chloride
18. Phosphate buffer saline (PBS)
19. PMSF
20. Resolving gel buffer
21. Sodium deoxycholate
22. Sodium dodecyl sulfate(SDS)
23. Sodium fluoride
24. Sodium pyrophosphate
25. Sodium vanadate
26. Stack gel buffer
27. TEMED
28. Triton x-100

1.2.2 สำหรับอิมมูโนฮิสโตเคมิสทริ (Immunohistochemistry)

1. 50 % alcohol
2. 75 % alcohol
3. 80 % alcohol

4. 95 % alcohol
5. Absolute alcohol
6. Anti-parvalbumin antibdy
7. Biotinylated antibody
8. DAB Kit
9. Dry acetone
10. Distilled water
11. Harris's hematoxylin
12. HRP-conjugated anti-biotin antibody
13. Hydrogenperoxide
14. Methanol
15. Normal horse serum
16. Paraplast plus
17. Permount
18. Tap water
19. Tespa
20. Tris
21. Triton x-100
22. Xylene

1.3 เครื่องแก้ว

1. กรวยกรอง (Funnel)
2. กระบอกตวง (Cylinder)
3. ขวดเก็บตัวอย่าง (Specimen bottle)

4. ขวดเตรียมสาร
5. จานรอง (Petri dish)
6. บีกเกอร์ (Beaker)
7. ปิเปต (Pipette)
8. ภาชนะย้อมสี (Staining jar)

2. อุปกรณ์

2.1 สำหรับเวสเทอร์นบล็อทติ้ง

1. กล่องประกอบฟิล์มกับกระดาษไนโตรเซลลูโลส
2. กระดาษไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane)
3. เครื่องกวนสารเคมีอัตโนมัติ (Magnetic sterrer)
4. เครื่องมือผ่าตัด
5. เครื่องวัด pH (pH meter)
6. เครื่องช่วยเขย่า (Vortex)
7. เครื่องสำรองไฟฟ้า
8. เครื่องปั่นแยกสารด้วยอุณหภูมิ (Centrifuge and adjust temperature)
9. ชุดอิเล็กโตโฟรีซีสแบบ Mini protein 3 cell
10. ชุดบล็อทโปรตีน (Mini trans-blot cell)
11. ตู้ดูดควัน (Fume hood)
12. ตู้อบ (Oven)
13. แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
14. นาฬิกาจับเวลา
15. ปิเปต (Pipette)
16. ปิเปตทิป (Pipette tip)

17. ฟิล์มเอ็กซเรย์ (Hyper film)
18. ถาดหลุมขนาดเล็ก (Microwell plate)
19. อุปกรณ์บดเนื้อเยื่อ (Homogenizer)
20. อุปกรณ์ประกอบกระจก (Gel cassette preparation)
21. ไมโครปิเปต (Micropipet)

2.2 สำหรับอิมมูโนฮิสโตเคมิสทริ

1. กระจกปิดสไลด์ (Cover slips)
2. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Filter paper)
3. กล่องเก็บ serial section
4. กล่องเก็บสไลด์
5. กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (Bright field microscope)
6. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (Digital camera)
7. เครื่องตัดชิ้นเนื้อชนิดล้อหมุน (Rotary microtome)
8. เครื่องฝังชิ้นเนื้อ (Tissue embedding center)
9. เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer)
10. เครื่องกวนสารเคมีอัตโนมัติ (Magnetic sterrer)
11. เครื่องให้ความร้อนเฉพาะ (Termostat)
12. เครื่องวัด pH (pH meter)
13. ช้อนตักสาร
14. คีมจับชิ้นเนื้อตัวอย่าง (Forceps)
15. ตู้หลอมพาราฟิน (Paraffin oven)
16. ตู้ดูดควัน (Fume hood)
17. ตู้อบ (Oven)

18. ตัวบล็อกชิ้นเนื้อ (Mold and Ring)
19. ถาดอลูมิเนียม
20. แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
21. ที่สำหรับใส่สไลด์ย้อมสี (Rack)
22. ที่จับ Rack (Holder)
23. นาฬิกาจับเวลา
24. ปิเปต (Pipette)
25. ปิเปตทิป (Pipette tip)
26. แผ่นสไลด์ (Slides)
27. แผ่นความร้อน (Hot plate)
28. ผ้าก็อซ
29. พู่กัน (Paint brush)
30. ไมโครปิเปต (Micropipet)

3. วิธีการศึกษา

3.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

3.1.1 ทำให้หนูสลบโดยฉีดยาสลบ pentobarbital (20 mg./kg.) เข้าช่องท้อง

3.1.2 ผ่าตัดนำหัวใจ กล้ามเนื้อเอ็กเท็นเซอร์ดิจิโทรุมลองกัส และกล้ามเนื้อโซเลียส ออกมา

3.1.3 ล้างด้วย PBS buffer

3.1.4 แบ่งหัวใจส่วนเวนตริเคิลเป็น 2 ส่วน (เฉพาะส่วนเวนตริเคิลเท่านั้นที่ใช้ศึกษา) แต่ละส่วนประกอบด้วยเวนตริเคิลทั้งซ้ายและขวาและแบ่งกล้ามเนื้อเอ็กเท็นเซอร์-ดิจิโทรุมลองกัส และกล้ามเนื้อโซเลียสเป็น 2 ส่วนเช่นเดียวกัน โดยที่ส่วนที่ 1 ใช้สำหรับการศึกษาโดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทริ และส่วนที่ 2 ใช้

สำหรับการศึกษาโดยใช้เทคนิคเวสเทอร์นบล็อทติ้ง

กล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์ดิจิทอรุมลองกัซและกล้ามเนื้อโซเลียสใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) เนื่องจากกล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์ดิจิทอรุมลองกัซเป็นกล้ามเนื้อที่จัดอยู่ในประเภทหดตัวเร็ว (fast twitch) และมีพาร์วัลบูมินในปริมาณมาก (Celio and Heizman, 1982) ส่วนกล้ามเนื้อโซเลียสเป็นกล้ามเนื้อที่จัดอยู่ในประเภทหดตัวช้า (slow twitch) (Celio and Heizman, 1982) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อประเภทเดียวกับกล้ามเนื้อหัวใจและพบพาร์วัลบูมินในปริมาณน้อย (Cai *et al*., 2001)

3.2 เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทริ

3.2.1 ขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (Tissue processing for wax embedding)

นำกล้ามเนื้อทั้งสามชนิดไปรักษาสภาพ ใน 10% ฟอร์มาลีน (formalin) 48 ช.ม. หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (tissue processing) ดังต่อไปนี้

1. ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยการแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50%, 75%, 95% และ 100% อย่างละ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาทีตามลำดับ และแช่ทิ้งไว้ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 100% ค้างคืน

2. ทำให้เซลล์ใส (clearing) โดยแช่ในไซลีน (xylene) นาน 2 ชั่วโมง และแช่ทิ้งไว้ในไซลีนค้างคืนอีกครั้ง

3. แช่เนื้อเยื่อในพาราพลาสเหลว (melted paraplast) 4 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พาราพลาสแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

4. ฝังเนื้อเยื่อ (embedding) ในพาราพลาสเหลว (melted paraplast) และทิ้งให้พาราพลาสแข็งตัว

5. ตัดเนื้อเยื่อ (sectioning) ด้วยเครื่องไมโครโตม (microtome) ความหนา 5 ไมครอน และวางเนื้อเยื่อบน Tespa-coated slide

3.2.2 ขั้นตอนการย้อมเนื้อเยื่อทางอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรี

1. ละลายพาราพลาส (deparaffinization) ในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2. ดึงน้ำเข้ามาในเนื้อเยื่อ (rehydration) โดยการแช่ในแอลกอฮอล์ 100%, 95%, 75% และ 50% ตามลำดับ แล้วจึงแช่ในน้ำประปา 5 นาที

3. แช่เนื้อเยื่อใน 0.3% Triton X-100 ใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer นาน 30 นาที

4. แช่เนื้อเยื่อใน 0.3% H_2O_2 ในเมททานอล นาน 1 ชั่วโมง

5. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M. Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6. แช่เนื้อเยื่อในบล็อคกิ้งซีรัม (blocking serum, horse serum dilution 1: 200) อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที

7. แช่เนื้อเยื่อในพาร์วัลบูมินแอนติบอดี อัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

8. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M. Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

9. แช่เนื้อเยื่อในไบโอทินเลทแอนติบอดี (biotinylated antibody) อัตราส่วน1:200 อุณหภูมิห้อง นาน 120 นาที

10. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M. Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

11. แช่เนื้อเยื่อในอวิดินไบโอตินเอนไซม์คอมเพล็ก (avidin biotinylated enzyme complex) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 120 นาที

12. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M. Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

13. แช่เนื้อเยื่อใน 3,3'-diaminobenzidine (DAB) นาน 10 นาที

14. ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำประปา นาน 10 นาที

15. ย้อมด้วยฮีมาทอกซีลิน (hematoxylin) นาน 5 นาที

16. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา นาน 10 นาที

17. ดึงน้ำออก (dehydration) ด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 50%, 75%, 95% และ100% อย่างละ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

18. แช่เนื้อเยื่อในไซลีน 5 นาที 2 ครั้ง

19. หยดเปอร์เมาท์ (permount) และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

20. ศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล (DP 11, Olympus)

3.3 Western blotting

3.3.1 การเตรียมโปรตีน

1. นำกล้ามเนื้อหัวใจส่วนเวนตริเคิลบดให้ละเอียดภายใต้อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง

2. นำกล้ามเนื้อที่ละเอียดเป็นผงแล้วไปเตรียมในน้ำยาย่อยสลาย และทำให้เย็นจนแข็งในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) และทิ้งไว้ละลายจนเป็นของเหลว (thawed)

3. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ตั้งอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

4. นำส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีของ Lowry (BIO-RAD) โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (BSA) และใช้เครื่อง microplate reader วัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 750 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาสมการมาตรฐานและนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่จะใช้ในการเตรียมสารละลายโปรตีน

6. นำสารละลายโปรตีนไปเตรียมในแซมเปิลบัฟเฟอร์ (sample buffer; Laemmli Sample Buffer) อัตราส่วน 1:2 และนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

7. ทำขั้นตอนเช่นเดียวกันในข้อ 1-6 กับกล้ามเนื้อโซเลียสและกล้ามเนื้อเอกเทน-เซอร์ดิจิทอรุมลองกัซ

3.3.2 การเตรียมเจล (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

1. ประกอบกระจกสำหรับเตรียมเจล

2. เตรียม 10 % Polyacrylamide resolving gel และทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้เกิดการพอลิเมอร์ไรด์เซชั่น

3. เตรียม 10 % Polyacrylamide stacking gel และทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้เกิดการพอลิเมอร์ไรด์เซชั่น

4. นำสารละลายโปรตีนมาแยกด้วยชุดอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis apparatus) โดยการหยอดสารละลายโปรตีน 10 µg ลงในหลุม

5. เติม SDS-electrophoresis buffer ลงในแชมเบอร์

6. ปล่อยกระแสไฟฟ้า 15 mA/gel จนกระทั่งโปรตีนถูกแยกจนถึงขอบล่างของเจล

3.3.4 การย้อมเจล

ย้อมเจลด้วย Coomissie Brilliant Blue R 250 นาน 20 นาที แล้วจึงล้างส่วนเกินออกด้วยสารละลายดีสเตนนิ่ง (destaining solution) เพื่อตรวจสอบปริมาณการหยอดและการแยกของโปรตีนตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล

3.3.5 การย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมแบรน (Blotting)

1. ประกอบเจลและเมมเบรนลงใน Mini Trans-Blot และเติมทรานซเฟอร์บัฟเฟอร์ (Transfer buffer) ลงไปในแชมเบอร์พร้อมใส่น้ำแข็ง

2. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงบนเมมเบรน ด้วยกระแสไฟฟ้า 350 mA. นาน 1 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบการย้ายโปรตีนด้วยการนำเมมเบรนไปแช่ใน 0.1 % Ponceau S (w/v) in 5% acetic acid (v/v) นาน 5 นาที

4. ล้าง Ponceau S solution ด้วย 0.1 M NaOH

5. ล้างเมมเบรน ด้วยน้ำกลั่น

6. นำเมมเบรนแช่ 5% non fat dried milk ใน Tris buffer saline (TBS) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อบล็อคโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องนาน 12 ชั่วโมง

7. ล้างเมมเบรนด้วย Tris buffer saline with tween 20 (TST) 200 ml. ประมาณ 5 วินาที

8. แช่เมมเบรนในแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (anti-parvalbumin) in 3% non fat dried milk ใน TST อัตราส่วน 1:1,000 นาน 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง

9. ล้างเมมเบรนด้วย TST 200 ml. 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บนเครื่องเขย่า

10. แช่เมมเบรน ในแอนติบอดีตัวที่สอง (Anti-Mouse IgG HRP- linked Antibody, HRP-conjugated Anti-biotin Antibody) in 3% non fat dried milk ใน TST อัตราส่วน 1:5,000 นาน 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง

11. ล้างเมมเบรน ด้วย TST 200 ml 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

12. ล้างเมมเบรน ด้วย TBS 200 ml 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 1 นาที

13. แช่เมมเบรน ด้วย chemiluminescence reagents นาน 5 นาที

14. exposed membrane ด้วย hyperfilm นาน 4 ชั่วโมง

15. นำฟิล์มไปทำให้เกิดภาพในน้ำยาดิวิลอบเพอร์ (developer) นาน 45 วินาที และหยุดปฏิกิริยาการเกิดภาพในน้ำยาฟิกเซอร์ (fixer) 20 วินาที

16. วัดขนาดของแถบโปรตีนโดยนำแผ่นฟิล์มไปสแกนด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer) รุ่นจี 700 (G 700) ของ BIO-RAD ด้วยโปรแกรมโมเลกุลาร์อนาไลซีสวอลุม 1.4 (Molecular Analysis V. 1.4) และวิเคราะห์รูปด้วยโปรแกรมวอลุมอนาไลซีส (Volume Analysis)

3.4 การวิเคราะห์สถิติ

วิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแถบโปรตีนในแต่ละอายุ โดยใช้ one–way ANOVA และ post-hoc analysis โดยใช้ least significant difference โดยโปรแกรม SPSS version 11.0