# 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

## วัสดุ

ถั่วฝักยาว

ถั่วฝักยาวสดที่ใช้ศึกษาครั้งนี้เป็นพันธุ์ถั่วเนื้อที่ไม่อ่อนหรือไม่แก่จนเกินไปโดยซื้อจากตลาดสด

กระต่าย

กระต่ายที่เจาะเลือด น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน ซึ่งเลี้ยงไว้ในหน่วยสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และให้อาหารปกติ

### สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

| สารเคมีที่ใช้ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| Acetic acid | J.T. Baker |
| Acrylamide | Merck |
| Acetone | LAB-SCAN |
| 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 |
| chloroform | BDH |
| Chitin | ได้จากโครงการวิจัยต่อเนื่องของ รศ. ดร. รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล |
| Coomassie brilliant blue G-250 | Sigma Chemical Co. |
| Coomassie brilliant blue R-250 | Sigma Chemical Co. |

| **สารเคมีที่ใช้** | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| C-serum *Hevea* latex lectin binding Protein (CS-HLLBP) | ได้จากโครงการวิจัยต่อเนื่องของ รศ. ดร. รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล |
| Ethanol | Merck |
| Ethylenediaminetetraacetic acid | Fluka Chemika-Biochemika |
| Fuchsin | Fluka Chemika-Biochemika |
| Glucose monohydrate | Seelze-Hannover |
| Glycerol | Sigma Chemical Co. |
| Glycine | UniVar |
| High molecular weight gel filtration calibration kit | Pharmacia |
| *Hevea* latex lectin (HLL) | ได้จากโครงการวิจัยต่อเนื่องของ รศ. ดร. พรีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล |
| Hydrochloric acid | Merck |
| Low molecular weight gel filtration calibration kit | Pharmacia |
| Magnesium chloride | Carlo Erba |
| Manganese chloride | Fluka |
| Methanol | Merck |
| Periodic acid | Sigma |
| Sephadex G-100 | Pharmacia |
| Sephadex G-200 | Pharmacia |
| SMII | Bio-Rad |
| Sodium carbonate anhydrous | Carlo Erba |
| Sodium chloride | Merck |
| Sodium dodecyl sulphate | Riedel-de Haen |
| Sulphuric acid | Lab-Scan |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) | Fluka Chemika-Biochemika |
| Trichloroacetic acid | Carlo Erba |

| **สารเคมีที่ใช้** | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| Tris Base | Promega |
| Triton X-100 | Sigma |
| Universal buffer | Fisher Scientific |

## อุปกรณ์

| อุปกรณ์ที่ใช้ | รุ่น | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|---|
| เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง | PJ300 | Mettler |
| เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง | GT410 | Ohaus |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง | AB204-5 | Mettler |
| Centrifuge | TJ-6 | Becman |
| Micro hematocrit centifuge | | ICM MB Centifuge |
| Micro hematocrit tube | | modulohm |
| Micropipette | - | Gilson |
| Microtube pump MP-3 | MP-3N | Eyela |
| 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 | DU650I | Beckman |
| Vortex | G-560E | Scientific Industries |

# 2. วิธีการ

## 2.1 การเตรียมสารสกัดโปรตีโอลิปิดเลคตินจากถั่วฝักยาว

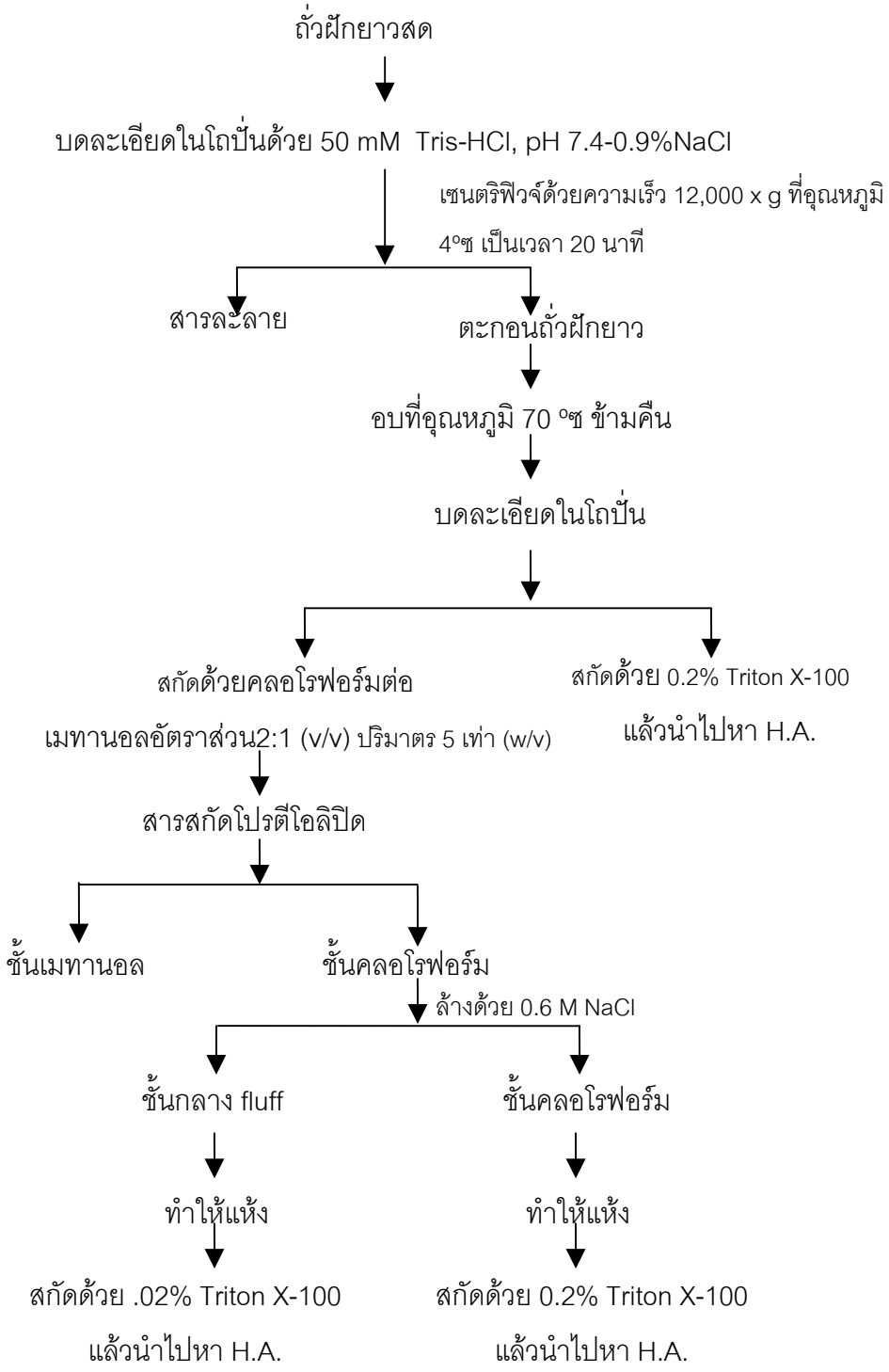
เนื่องจากได้มีการพบว่ามีเลคตินจากพืชหลายชนิดรวมทั้งยางพาราที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายไขมัน เกศจี เม่งอำพัน และคณะ (2544) ดังนั้นจึงได้นำตัวทำละลายไขมันมาใช้ในการสกัดเลคตินชนิดไม่ละลายน้ำจากถั่วฝักยาว

### 2.1.1 การเตรียมโปรตีโอลิปิดเลคตินถั่วฝักยาวอบแห้งจากชั้นคลอโรฟอร์ม

นำถั่วฝักยาวมาล้างให้สะอาดแล้วพักไว้ให้แห้ง จากนั้นหั่นเป็นท่อนเล็ก ๆ แล้วบดให้ละเอียดในโถปั่น (blender) ด้วยบัฟเฟอร์ TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4-0.9%NaCl) จากนั้นทำการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4ºซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วแยกเก็บส่วนสารละลายไว้ใช้ในการเตรียมตัวยับยั้งการทำงานของเลคติน และนำตะกอนไปสกัดสารโปรตีโอลิปิด โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 70°ซ ข้ามคืน จากนั้นทำการบดให้ละเอียดในโถปั่น นำผงถั่วส่วนหนึ่งไปทำการสกัดด้วย 0.2% Triton X-100 (crude dry powder) แล้วนำอีกส่วนหนึ่งไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลอัตราส่วน 2:1 (v/v) ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนัก (ดัดแปลงจากวิธีสกัดสารโปรตีโอลิปิดของ Folch และ Lees (1951) คนเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการกรองสารละลายโปรตีโอลิปิดผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกกากออก แล้วล้างสารสกัดด้วยสารละลาย 0.6% NaCl โดยทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วแยกเก็บเฉพาะชั้นคลอโรฟอร์มไปทำการระเหยให้แห้ง นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย non-ionic detergent ที่ประกอบด้วย 0.2% Triton X-100 ข้ามคืน จากนั้นใช้ SMII ดูดซับ Triton X-100 ออกให้หมดก่อนแล้วนำสารละลายที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่าย ดังรูปที่ 1

**การเตรียมโปรตีโอลิปิดเลคตินถั่วฝักยาวอบแห้งจากชั้น fluff**

เก็บเฉพาะชั้นโปรตีโอลิปิดแล้วนำไปทำการระเหยให้แห้ง จากนั้นละลายชั้นโปรตีโอลิปิดด้วย non-ionic detergent ประกอบด้วย 0.2% Triton X ข้ามคืน จากนั้นใช้ SMII ดูดซับ Triton X-100 ออกให้หมดก่อนแล้วนำสารละลายที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่าย ดังรูปที่ 1




รูปที่ 1 แผนผังการสกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีโอลิปิดเลคติน

**การเตรียมโปรตีโอลิปิดเลคตินถั่วฝักยาวสดจากชั้น fluff ของฝักถั่วสด**

นำถั่วฝักยาวมาล้างให้สะอาดแล้วพักไว้ให้แห้ง จากนั้นหั่นเป็นท่อนเล็ก ๆ แล้วบดให้ละเอียดในโถปั่นด้วยบัฟเฟอร์ TBS จากนั้นทำการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4ºซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วแยกเก็บส่วนสารละลายไว้ใช้ในการเตรียมตัวยับยั้งการทำงานของเลคติน และนำตะกอนไปสกัดสารโปรตีโอลิปิดด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนัก (ดัดแปลงจากวิธีสกัดสารโปรตีโอลิปิดของ Folch และ Lees (1951) คนเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการกรองสารละลาย โปรตีโอลิปิดผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกกากออก เก็บชั้นเมทานอลไว้แล้วล้างสารสกัดด้วยสารละลาย 0.6% NaCl โดยทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วแยกเก็บเฉพาะชั้นโปรตีโอลิปิดแล้วนำไปทำการระเหยให้แห้งจากนั้นละลายชั้นโปรตีโอลิปิดด้วย non-ionic detergent ที่ประกอบ ด้วย 0.2% Triton X-100 ข้ามคืน จากนั้นใช้ SMII ดูดซับ Triton X-100 ออกให้หมดก่อนแล้วนำสารละลายที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่าย

**2.1.2 การนำโปรตีโอลิปิดเลคตินไปสกัดเลคตินบริสุทธิ์**

หลังจากละลายโปรตีโอลิปิดจากชั้นคลอโรฟอร์ม ด้วย non-ionic detergent ที่ประกอบด้วย 0.2% Triton X-100 ข้ามคืนแล้ว นำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ช่วงความอิ่มตัวต่าง ๆ จากนั้นระเหยอะซิโตนออกจนหมด แล้วนำไปหาแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคติน และวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE

**2.1.3 การหาแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคติน**

**การเตรียมเม็ดเลือดแดง**

นำเลือดกระต่ายที่เจาะไปผสมกับ ACD (Acid Citrate Dextrose) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5,000 x g นาน 5 นาที แล้วล้างเม็ดเลือดแดงด้วยบัฟเฟอร์ TBS โดยเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิม 3 ครั้ง ทำการเจือจางเม็ดเลือดแดงด้วย TBS ให้ได้ความเข้มข้นของการแขวนลอยเม็ดเลือดเป็น 2% เพื่อเก็บไว้ทดสอบการเกาะกลุ่ม

**การทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง**

**การนำเม็ดเลือดแดงไปผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน**

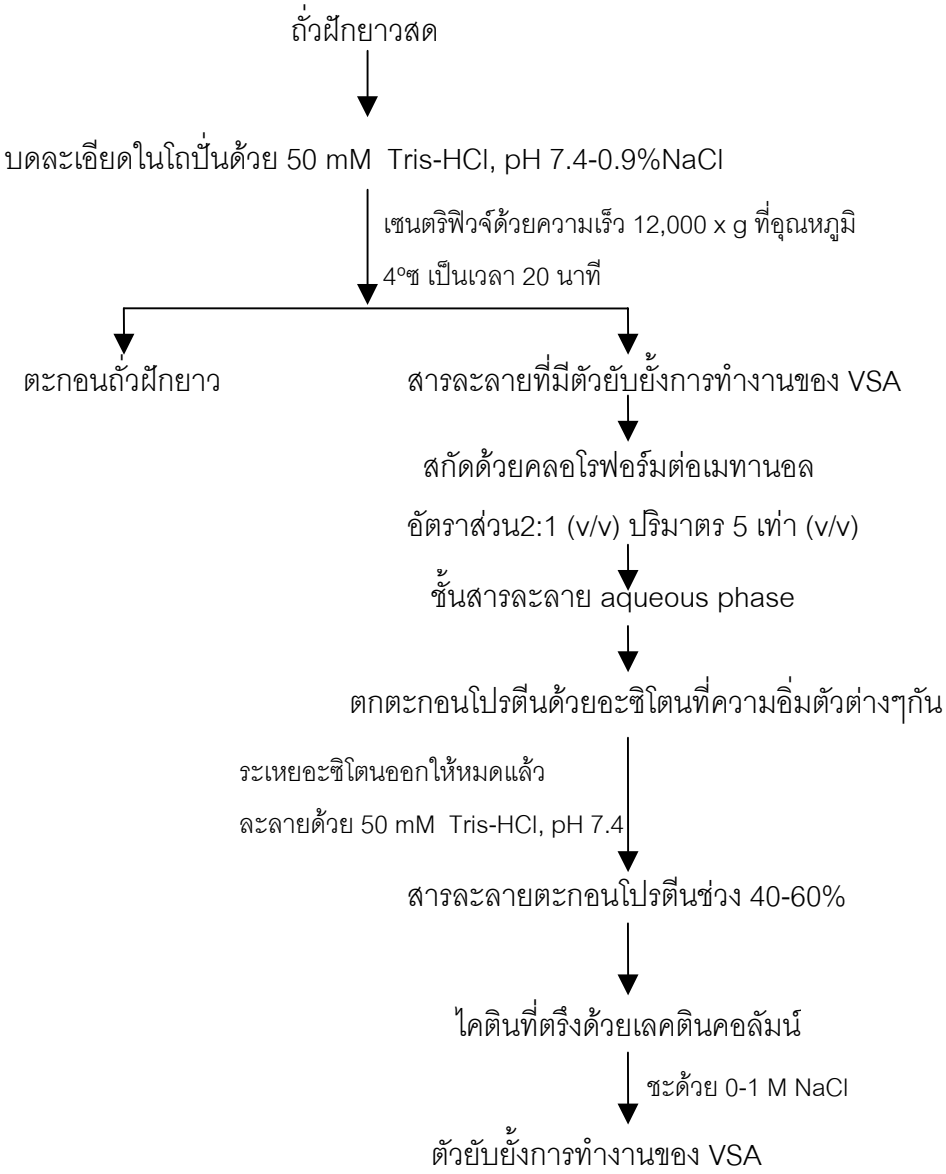
นำเม็ดเลือดแดงกระต่ายเข้มข้น 4% ผสมกับเอนไซม์ทริปซิน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 10:1 นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6000 x g นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเม็ดเลือดแดงด้วยบัฟเฟอร์ TBS 5 ครั้ง โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6000 x g ปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้เป็น

2% แล้วนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้ผ่านการย่อยมาก่อน

ทำการทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงสด หรือผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน ตามวิธีของ Kilpatrick และ Yeoman (1978) โดยทำการผสมสารละลายโปรตีโอลิปิดเลคตินที่ได้หลังจากการทำโปรตีโอลิปิดให้เจือจางแบบ 1:2 ตามลำดับ (1:2 serial dilution) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเข้ากับสารละลายแขวนลอยเม็ดเลือดแดงของกระต่าย 2% (v/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในแผ่นไมโครไตเตอร์ (U shape) แล้วปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ก่อนวิเคราะห์ดูการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ซึ่งหากมีผลเป็นบวกจะมีลักษณะเป็นแพและหากมีผลเป็นลบเม็ดเลือดแดงจะตกตะกอนไปอยู่ที่ก้นหลุมเห็นเป็นลักษณะของจุดกระดุมในชุดควบคุมที่ใช้บัฟเฟอร์ TBS แทนสารละลายเลคติน และแอคติวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่าย (hemagglutinating activity, H.A.) จะนับค่าที่เป็นค่าการเจือจางสูงสุดของสารละลาย เลคตินที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้อย่างสมบูรณ์

**2.2 การเตรียมตัวยับยั้งการทำงานของ VSA**

นำส่วนของสารละลายจากถั่วฝักยาวที่ได้จากข้อ 2.1.1 ไปทำการสกัดสารโปรตีโอลิปิดด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร (ดัดแปลงจากวิธีสกัดสารโปรตีโอลิปิดของ Folch และ Lees (1951) คนเป็นเวลา 30 นาที แล้วแยกเก็บเฉพาะชั้นสารละลาย (aqueous phase) ไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ช่วงความอิ่มตัวต่าง ๆ กัน จากนั้นระเหยอะซิโตนออกจนหมด แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TBS จากนั้นนำสารละลายตะกอนที่ได้แต่ละช่วงไปทำการทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดงแดง เพื่อหาช่วงการยับยั้งที่ดีที่สุดเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไป ดังรูปที่ 2




รูปที่ 2 แผนผังการสกัดและทำบริสุทธิ์ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

### 2.2.1 การทดสอบการยับยั้งแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคตินด้วยน้ำตาล

เจือจางน้ำตาลที่ต้องการความเข้มข้นต่าง ๆ กันในช่วง 0-200 mM แบบ 1:2 serial dilution ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแผ่นไมโครไตเตอร์แล้วเติมสารละลายโปรตีโอลิปิดเลคตินที่มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 80 ไตเตอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายแขวนลอยเม็ดเลือดแดงของกระต่าย 2% (v/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้บัฟเฟอร์ TBS แทนสารละลายน้ำตาล การวิเคราะห์แอคติวิตีของการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (hemagglutination inhibition, H.I.) จะหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงได้ 100%

### 2.2.2 การทดสอบการยับยั้งแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคตินด้วยไกลโคโปรตีน

เจือจางสารละลายไกลโคโปรตีนที่ต้องการทดสอบแบบ 1:2 serial dilution ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแผ่นไมโครไตเตอร์แล้วเติมสารละลายโปรตีโอลิปิดเลคตินที่มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 80 titer/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายแขวนลอยเม็ดเลือดแดงของกระต่าย 2% (v/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง สำหรับชุดการทดลองควบคุมจะใช้ บัฟเฟอร์ TBS แทนสารละลายไกลโคโปรตีน การวิเคราะห์แอคติวิตีของการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง จะหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงได้ 100%

## 2.3 การทำตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีโอลิปิดเลคตินให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไคตินที่ตรึงด้วยโปรตีโอลิปิดเลคตินจากถั่วฝักยาว

เตรียมคอลัมน์แบบจำเพาะโดยนำไคตินที่ล้างสะอาดแล้วมาปรับให้สมดุลด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 แล้วนำสารสกัดโปรตีโอลิปิดเลคตินจากชั้นคลอโรฟอร์มจากข้อ 2.1.1 ผ่านลงในคอลัมน์ให้มากเกินพอบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันให้มีอัตราการไหลออกประมาณ 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ในปริมาตร 3-4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ แล้วล้างคอลัมน์ต่อด้วย1 M NaCl-50 mM Tris-HCl, pH 7.4 จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm จนมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นล้างคอลัมน์อีกครั้งด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 โดยใช้ปริมาตร 3-4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จากนั้น Load สารละลายตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีโอลิปิดเลคตินลงในคอลัมน์แล้วบ่มคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย บัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันโดยมีอัตราการไหลออกประมาณ 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสาร

ละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm จนค่าที่ได้เข้าใกล้ศูนย์แล้วชะคอลัมน์ด้วยเกลือ NaCl ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นแบบต่อเนื่องจาก 0-1 M ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันด้วยอัตราไหลเดิมและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคติน นำหลอดสารละลายที่มีความสามารถในการยับยั้งแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคตินสูงที่สุดไปไดอะไลซ์ แล้วทำสารละลายให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี Freeze-drying แล้วนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของตัวยับยั้งแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคตินด้วยวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) แบบ SDS-PAGE

## 2.4 ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีที่มีอิทธิพลต่อแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคตินจากถั่วฝักยาว

### 2.4.1 อิทธิพลของอุณหภูมิ

ทำการทดสอบความเสถียรของเลคตินต่ออุณหภูมิโดยอุ่นสารละลายโปรตีโอลิปิดเลคติน (ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (dry bath incubator) ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 °ซ นาน 30 นาที หลังจากครบเวลาแล้วทำสารละลายโปรตีโอลิปิดเลคตินให้เย็นโดยเร็วด้วยการแช่ในน้ำเย็น 4 °ซ นาน 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเทียบกับเลคตินที่เก็บไว้ที่ 4 °ซ

### 2.4.2 อิทธิพลของ pH

นำสารละลายโปรตีโอลิปิดเลคติน (ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มาปรับให้มี pH อยู่ในช่วง 4-11 โดยใช้บัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ 50 mM Sodium acetate buffer (pH 4-5), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6-7) และ 50 mM Glycine-NaOH buffer (pH 9-10) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเลคติน 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH ของโปรตีโอลิปิดเลคตินทุก pH กลับเป็น 7.4 นำเลคตินที่ปรับ pH แล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้เจือจางแบบ 1:2 serial dilution ผสมเข้ากับสารละลายแขวนลอยเม็ดเลือดแดงของกระต่าย 2% (v/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในแผ่นไมโครไตเตอร์ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ดูการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบ

### 2.4.3 อิทธิพลของเอนไซม์ที่นำมาย่อยโปรตีโอลิปิดเลคติน

ผสมสารละลายโปรตีโอลิปิดเลคติน (ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับเอนไซม์ ทริปซิน และเอนไซม์โปรเนส ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 และ 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอมไซม์โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลานาน 10 นาที แล้วนำไปหาค่าแอคติวิตีของเลคติน โดยผสมสารละลายเลคตินที่เจือ

จางแบบ 1:2 serial dilution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เข้ากับสารละลายแขวนลอยเม็ดเลือดแดง 2% (v/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในแผ่นไมโครเตอร์แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเปรียบเทียบกับแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคตินที่ไม่ได้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในชุดควบคุม

**2.4.4 อิทธิพลของไดวาเลนท์แคทไอออน ($Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ และ $Mn^{2+}$) และ EDTA ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย**

ทำการเจือจางไดวาเลนท์แคทไอออน ($Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ และ $Mn^{2+}$) และ EDTA ให้มีความเข้มข้น 0-200 mM แบบ 1:2 serial dilution ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแผ่นไมโครไตเตอร์ แล้วเติมสารละลายโปรตีโอลิปิดเลคตินที่มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มที่มี แอคติวิตี 80 titer/มิลลิลิตร ปริมาตร 25ไมโครลิตร ลงไปแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงของกระต่าย 2% (v/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

## 2.5 การเก็บน้ำยาง

### 2.5.1 จากยางพารา

นำน้ำยางสดมากรองด้วยผ้าก๊อซจากนั้นนำน้ำยางสดไปเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่อง ultracentifuge (UC) ที่ความเร็ว 59,000 x g อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 45 นาที หลังจากเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่อง UC แล้วน้ำยางจะแบ่งเป็นส่วนใหญ่ ๆ 3 ส่วนคือ ส่วนของ rubber particle (RP), C-serum และ bottom fraction ทำการเก็บเฉพาะส่วนของ rubber particle แล้วล้าง rubber particle ด้วยบัฟเฟอร์ TBS โดยนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม 3 ครั้ง จากนั้นทำการเจือจาง rubber particle ด้วยบัฟเฟอร์ TBS โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้มีค่าเท่ากับ 0.3-0.4 เก็บไว้ที่ 4 °ซ เพื่อใช้ศึกษาความสามารถของโปรตีโอลิปิดเลคตินในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง

### 2.5.2 จากยางอื่น ๆ

ทำการเก็บน้ำยางจากต้น รัก, ลีลาวดี, ยางอินเดีย และ โป๊ยเซียน โดยใช้มีดกรีดที่ผิวของลำต้นจากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดน้ำยางผสมลงในบัฟเฟอร์ TBS ที่แช่เย็นจากนั้นทำการเจือจาง rubber particle ด้วยบัฟเฟอร์ TBS โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้มีค่าเท่ากับ 0.3-0.4 เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อใช้ศึกษาความสามารถของโปรตีโอลิปิดเลคตินในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง

## 2.6 การทดสอบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางกับโปรตีโอลิปิดเลคติน

ปิเปตสารละลายน้ำยางที่เจือจางปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโปรตีโอลิปิดเลค ติน (ปริมาตร 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นผสมสีย้อมฟุชซิน (fuchsin) (2.5%w/v) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายผสมบรรจุในหลอด microhematocrit แล้วอุดปลายหลอดด้วยดินน้ำมัน จากนั้นนำหลอดดังกล่าวไปเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่อง microhematocrit centifuge ที่ความเร็ว 5000 x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เกิดขึ้นบริเวณด้านบนหลอด microhematocrit ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่า

## 2.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

### 2.7.1 น้ำหนักโมเลกุลของเลคติน

หาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินทำโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-200 ขนาด 1.2 x 100 เซนติเมตร ปริมาตรเรซิน 85 มิลลิลิตร ปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4-0.2% Triton X-100 แล้ว load คอลัมน์ด้วยสารละลายโปรตีโอลิปิดเลคตินเข้มข้น (700 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราไหลออกประมาณ 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm แล้วนำหลอดที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดไปหาแอคติวิตีของเลคติน จากนั้น load คอลัมน์ด้วยสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ที่มีความเข้มข้น 4.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้แก่ catalase ($M_r$ 232,000) aldolase ($M_r$ 158,000) BSA ($M_r$ 67,000) ovalbumin ($M_r$ 43,000) แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมที่มีอัตราการไหลออกประมาณ 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm แล้ว load คอลัมน์ด้วยสารละลาย blue dextran เพื่อหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจล (void volume, $V_o$) จากค่าปริมาตรชะของ blue dextran ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm และ load คอลัมน์ด้วยสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ เพื่อหาปริมาตรทั้งหมด (total volume, $V_t$) ของคอลัมน์จากค่าปริมาตรชะของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 nm

### 2.7.2 น้ำหนักโมเลกุลของตัวยับยั้งการทำงานของเลคติน

หาน้ำหนักโมเลกุลของตัวยับยั้งการทำงานโปรตีโอลิปิดเลคตินทำโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 ขนาด 1.2 x 100 เซนติเมตร ปริมาตรเรซิน 85 มิลลิลิตร ปรับคอลัมน์ให้สม

ดุลก่อนด้วยบัฟเฟอร์ 50 Mm Tris-HCl, pH 7.4 แล้ว load คอลัมน์ด้วยสารละลายยับยั้งการทำงานของเลคตินเข้มข้น (407 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราไหลออกประมาณ 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm แล้วนำหลอดที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดไปหาค่าการยับยั้งแอคติวิตีของโปรตีโอลิปิดเลคติน จากนั้น load คอลัมน์ด้วยโปรตีนมาตรฐาน (ที่มีความเข้มข้น 4.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้แก่ aldolase ($M_r$ 158,000) BSA ($M_r$ 67,000) ovalbumin ($M_r$ 43,000) และ chymotrypsin ($M_r$ 25 kD) ลงในคอลัมน์แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมที่มีอัตราการไหลออกประมาณ 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm จากนั้น load คอลัมน์ด้วยสารละลาย blue dextran เพื่อหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจลจากค่าปริมาตรชะของ blue dextran ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm และ load คอลัมน์ด้วยสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ เพื่อหาปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์จากค่าปริมาตรชะของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 nm

2.7.3 **การคำนวณหาค่า** distribution coefficient ($K_{av}$)

ทำการคำนวณหาค่า $K_{av}$ จากสมการโดยนำค่าที่ได้เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log MW กับค่า $K_{av}$ ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละตัว แล้วคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีโอลิปิดเลคติน

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

## 2.8 **การหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยโดยวิธี** SDS-PAGE

การหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยใช้วิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) หลังจากการทำอิเล็กโทรฟอรีซีสและย้อมสีโปรตีน โดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐานโปรตีนในสารตัวอย่างและแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobily, $R_f$) ของแถบโปรตีนมาตรฐาน และ โปรตีนในสารตัวอย่างจากความสัมพันธ์ดังนี้

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

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log MW กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานจากนั้นหาน้ำ

หนักโมเลกุลของโปรตีนสารตัวอย่างจากกราฟซึ่งจะใช้โปรตีนมาตรฐาน ดังนี้ phosphorylase b ($M_r$ 94,000) BSA ($M_r$ 67,000) Ovalbumin ($M_r$ 43,000) carbonic anhydrase ($M_r$ 30,000) soybean trypsin inhibitor ($M_r$ 20,000) และ $\alpha$-lactalbumin ($M_r$ 14,000)

## 2.9 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง โดยทำควบคู่กับ BSA ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน เจือจาง BSA มาตรฐานให้มีปริมาณโปรตีน 0 -100 ไมโครกรัม ผสมกับสารละลาย Bradford (0.01% Coomassie brilliant blue G-250 – 4.7% ethanol – 8.5% phosphoric acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

## 2.10 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

### SDS-PAGE

การทำ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล (7-15%) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลแสดงในตาราง

| Composition | Stacking gel | Separating gel | |
|---|---|---|---|
| | 3% (5 ml) | 7% (3 ml) | 15% (3 ml) |
| 30%Acrylamide-0.8% bisacrylamide | 0.30 ml | 0.70 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 | 20 µl | - | - |
| 10 % SDS | 30 µl | 30 µl | 30µl |
| 10% Ammonium persulphate | 150 µl | 75 µl | 75 µl |
| TEMED | 5 µl | 5 µl | 5 µl |
| Distilled water | 1.775 ml | 1.44 ml | 0.64 ml |

**การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน**

ใช้ปริมาตรสารละลายโปรตีนตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 3 ส่วนผสมกับบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายตัวอย่าง 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 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

**การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส**

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องของเจลส่วนบนแยกกัน โดยใช้ 0.025 M Tris – 0.192 M glycine - 1% SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรฟอรีซิส เปิดกระแสไฟคงที่ 20 mA นาน 1 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

**การย้อมสีโปรตีน**

ย้อมสีโปรตีนในเจลด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 โดยแช่เจลในสารละลาย 0.08% Coomassie brilliant blue R-250 - 50% methanol- 7.5% acetic acid นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 5% methanol - 7.5% acetic acid จนแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

**การย้อมไกลโคโปรตีน**

หลังจากการทำ SDS-PAGE แล้วนำเจลใส่ลงในสารละลาย 12.5% Trichloroacetic acid เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลานาน 1 นาที นำเจลใส่ในสารละลาย 1% periodic acid ที่เตรียมในสารละลาย 3% acetic acid เป็นเวลานาน 50 นาที จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัด periodic acid ตรวจสอบโดยหยดน้ำล้างเจลลงใน 1 N $AgNO_3$ ดูการเปลี่ยนสีจากใสเป็นสีน้ำตาล ล้างเจลจนกระทั่งหยดน้ำล้างเจลใน 1N $AgNO_3$ ไม่มีการเปลี่ยนสี จากนั้นใส่เจลลงใน Schiff's reagent เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลานาน 50 นาที ล้างสีที่เกินออกด้วยสารละลาย 0.5% metabisulfite 3 ครั้งครั้งละ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งเจลใส เก็บเจลใน 7% acetic acid (Zacharius, 1969)