บทที่ 2

การทดลอง (Materials & Method)

2.1 วัสดุ – อุปกรณ์

ตัวอย่างเลือด จากสถานฆ่าวัวเลขที่ 164/3 หมู่บ้านแหลมไพ ตำบลท่าช้าง อำเภอบางกล่ำ จังหวัดสงขลา

กระบอกกรองแยกอนุภาคของแข็งออกจากของเหลว ผ่านแผ่นกรองขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร (μm) เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม. ของ Sartorius, Germany

ขวดพลาสติกใส ขนาด 6 ลิตร สำหรับเก็บตัวอย่าง

หลอดพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (มล.) ของ Eppendoff

ถุงไดอะลัยซิส (Dialysis bag) ไม่ยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 8,000 ดาลตัน (dalton) ซึมผ่าน รุ่น T2 ของ Qllu Sep

กระบอกตวง ขนาด 100, 500, 1,000 และ 2,000 มล.

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น H10 ของ Mettler, Switzerland

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น p1210 ของ Mettler, Switzerland

เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น J 2 – 21 ของ Beck man

เครื่องหมุนเหวี่ยงและชุดหาปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น รุ่น MB ของ Damon/ IEC Division

เครื่องทำให้ methanol เย็น -23^{0}C รุ่น JUST – A – TIET ของ Shell ใช้สำหรับทำให้สารละลายโปรตีนเคลือบแข็งในขวดก้นกลมชนิดทนความดัน

เครื่องวัด พีเอส (pH meter) รุ่น 713 ของ Metrohm

เครื่องผสมสารละลาย (Magnetic stirrer)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ (Water bath) รุ่น TW 20 ของ Julabo

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV – Vis spkctrophotometor) รุ่น 160 A ของ Shimadzy

ชุดทำเจลอิเล็กโตรฟอรีซิส (Gel electrophoresis) ของ ATTO, Bapan

เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรง (DC – power supply) รุ่น PS 500 x T ของ Hoefer Scientific

เครื่องทำความเย็นรุ่น DW 6 – 85 ของ Heto lab equipment ต่อกับเครื่องดูดอากาศเวลช์ (Welch vacuum pump) รุ่น 8917 CE ของ Thomson ใช้สำหรับทำให้โปรตีนแห้งโดยการระเหิดน้ำ ตู้แช่แข็ง (-20^{0}C) Sanyo, Japan

2.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
Acrylamide	71.1	Merck
Ammonium persulfate $(NH_4)_2 S_2 O_8$	228.7	Merck
Ammonium sulfate $(NH_4)_2 SO_4$	132.14	BDH
Bovine serum albumin fraction V (BSAF V)	67,000	Sigma
Bromophenol blue	-	Sigma
Coomassie brilliant blue R250	-	Sigma
Copper sulphate pentahydrate $(CuSO_4)$ S H_2O	249.68	Sigma
Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)	292.2	Fluka
Folin phenol reagent	-	Sigma
Galactose	180.16	Difco
Glacial acetic acid	60.05	J.T Baker
Glucose	180.16	Univar
Hydrochloric acid (HCl)	36.46	Merck

2.3 วิธีทดลอง

2.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

ใช้สารละลาย 4.56% ไตรโซเดียมซิเตรท ไดไฮเดรท trisodiumcitrate dihydrate หรือ ($Na_3C_6H_5O_7$. $2H_2O$) โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลาย 1 ลิตรรองรับเลือดวัวจำนวน 9 ลิตร แล้วนำมาเก็บที่ 4 °C

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาตรเม็ดเลือดอัดแน่น

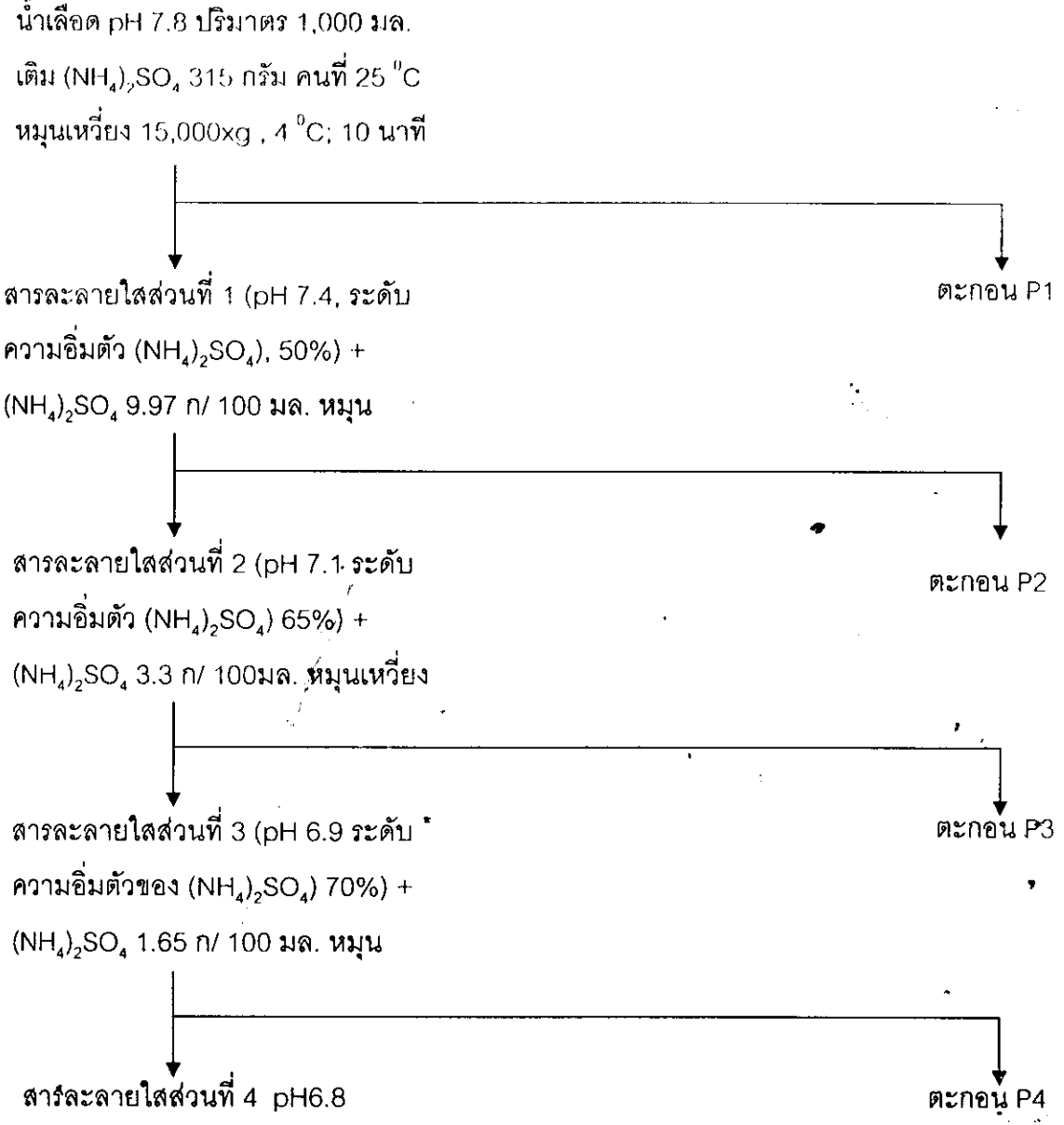
โดยการหมุนเหวี่ยงเลือดในหลอดขนาดเล็กที่ 3,000 รอบ/ นาที

2.3.3 การเตรียมน้ำเลือด

หมุนเหวี่ยงสารละลายในข้อ (1) 1,200 มล. ด้วยพร้อมหมุนเหวี่ยง JA14 ความเร็ว 8600xg 4°C 10 นาที

2.3.4 การแยกอัลบูมินออกจากน้ำเลือด

<u>วิธีที่ 1</u> ทำโดยการเติมผง $(NH_4)_2So_4$ 315 กรัม ลงในน้ำเลือด pH7.8 1,000 มล. พร้อมทั้งคนที่ 25°C จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 15,000xg, 4°C 10 นาที แยกตะกอน P_1 ออกจากสารละลายใสส่วนที่ 1 (pH7.4 ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 50%) ปริมาตร 980 มล. แล้วค่อยเติมผง $(NH_4)_2SO_4$ ในอัตรา 9.97 กรัม ต่อสารละลายใสส่วนที่ 1 ปริมาตร 100 มล. พร้อมทั้งคนที่ 25°C จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 20,000xg , 4°C 10 นาที แล้วแยกตะกอน P_2 ออกจากสารละลายใสส่วนที่ 2 (pH7.1 ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 65%) จากนั้นเติมผง $(NH_4)_2SO_4$ ในอัตรา 3.3 กรัม ต่อสารละลายใสส่วนที่ 2 ปริมาตร 100 มล. พร้อมทั้งคนที่ 25°C แล้วหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน P_3 ออกจากสารละลายใสส่วนที่ 3 (pH6.9 ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 70%) จากนั้นเติมผง $(NH_4)_2SO_4$ ในอัตรา 1.65 กรัม ต่อสารละลายใสส่วนที่ 3 100 มล. พร้อมทั้งคนที่ 25°C แล้วหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน P_4 ออกจากสารละลาย

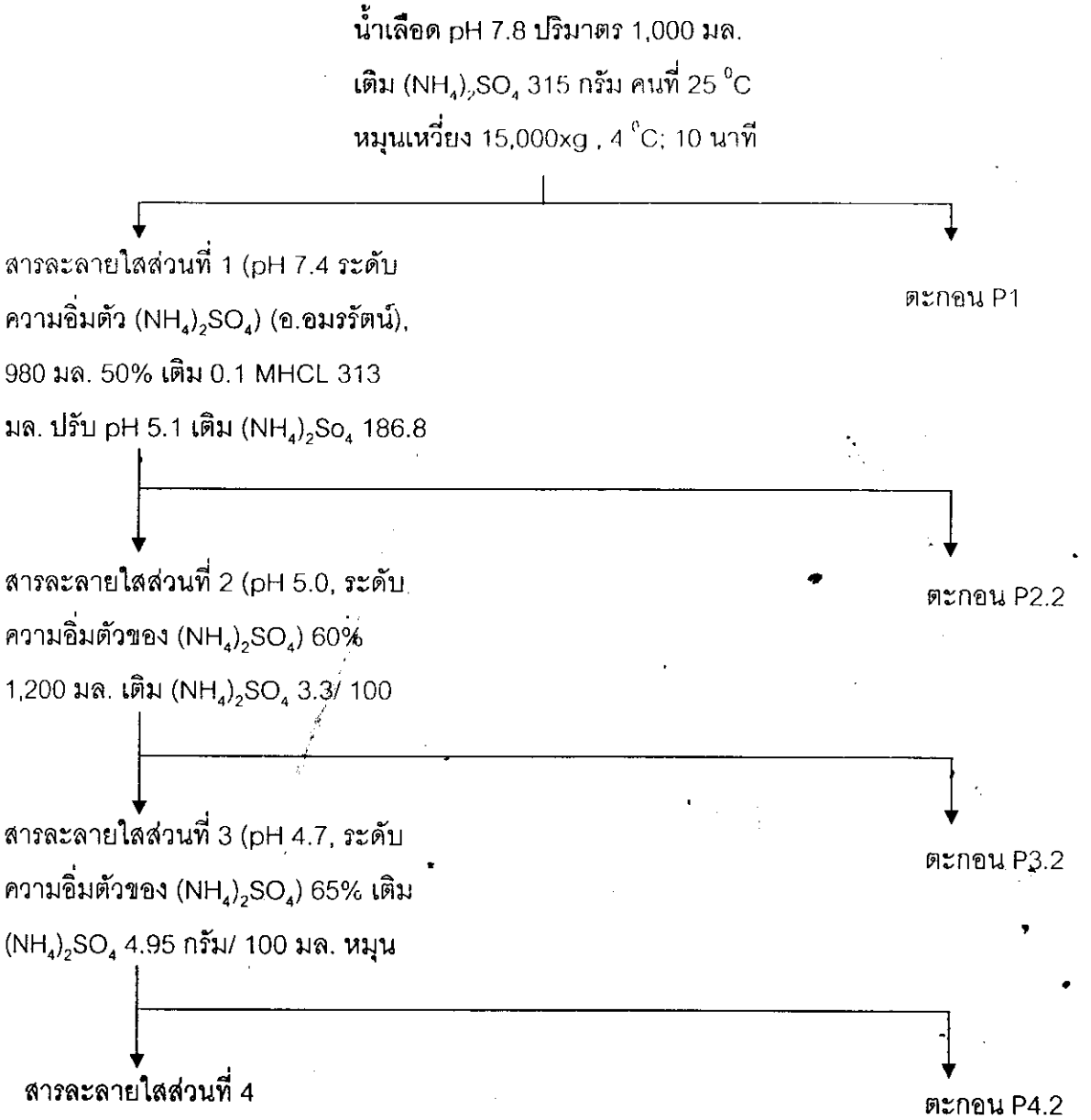


รูปที่ 2 แผนภูมิ วิธีที่ 1 ของการแยกโปรตีนในน้ำเลือดออกเป็นส่วน ๆ

น้ำเลือด หมายถึง น้ำเลือดที่ประกอบด้วย 4.56% ไตรโซเดียมซิเตรท ไดไฮเดรท 10%

การทำให้ตะกอน P_2 มีระดับความบริสุทธิ์ของ อัลบูมินเพิ่มขึ้น โดยการนำตะกอน P_2 (จากน้ำเลือด 1,000 มล.) มาละลายน้ำกลั่น 250 มล. แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในอัตรา 31.5 กรัม ต่อสารละลาย P_2, 100 มล. หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากสารละลาย ปรับ pH ให้เป็น 5.1 แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ พร้อมทั้งคนที่ 25°C จนกระทั่งเริ่มเกิดตะกอนแล้วเติม ต่ออีกจนมี หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากสารละลาย นำตะกอนที่ได้มาละลายน้ำกลั่น 125 มล. แล้วทำให้ตกตะกอนซ้ำในช่วง pH5.1 – 4.8 ระดับความอิ่มตัว $(NH_4)_2SO_4$ 60% แยกตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์

<u>วิธีที่ 2</u> ทำในทำนองเดียวกับวิธีที่ 1 แต่ภายหลังจากการแยกตะกอนที่ตกในระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 50% ออกแล้วค่อยเติม 0.1 MHCl ปริมาตร 313 มล. ปรับ pH ให้เป็น 5.1 แล้วค่อยเติมผง $(NH_4)_2SO_4$ 186.8 กรัม ลงในสารละลายที่มีระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2So_4$ 37.9% ปริมาตร 1,293 มล. พร้อมทั้งคนที่ 25°C จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 15,000xg , 4°C, 10 นาที แยกตะกอน $P_{2.2}$ ออกจากสารละลายใส ส่วนที่ 2 (pH5.0 ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 60%) ปริมาตร 1,200 มล. แล้วเติมผง $(NH_4)_2SO_4$ ในอัตรา 3.3 กรัม ต่อสารละลายใสส่วนที่ 2 ปริมาตร 100 มล. พร้อมทั้งคนที่ 25°C แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 15,000xg ที่ 4°C 10 นาที แยกตะกอน $P_{3.2}$ ออกจากสารละลายใสส่วนที่ 3 (pH4.7 ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 65%) ปริมาตร 1,150 มล. แล้วเติมผง $(NH_4)_2SO_4$ ลงในอัตรา 4.95 กรัม ต่อสารละลายใสส่วนที่ 3 100 มล. พร้อมทั้งคนที่ 25°C แล้วหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน $P_{4.2}$ ออกจากสารละลายใสส่วนที่ 4 pH4.5



รูปที่ 3 แผนภูมิวิธีที่ 2 ของการแยกโปรตีนในน้ำเลือดออกเป็นส่วน ๆ

น้ำเลือด หมายถึง น้ำเลือดที่ประกอบด้วย ไตรโซเดียมซิเตรท ไดไฮเดรท 10% โดยปริมาตร

การทำให้ตะกอน $P_{2,2}$ กับ $P_{2,3}$ มีระดับความบริสุทธิ์ของ อัลบูมินเพิ่มขึ้น โดยการนำตะกอน $P_{2,2}$ กับ $P_{2,3}$ (จากน้ำเลือด 1,000 มล.) มาละลายน้ำกลั่น 300 มล. แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในอัตรา 31.5 กรัม ต่อสารละลาย 100 มล. หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากสารละลาย ปรับ pH ให้เป็น 5.1 แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ พร้อมทั้งคนที่ 25°C จนกระทั่งเริ่มเกิดตะกอนแล้วเติมต่ออีกจนมีระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 60% หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากสารละลาย นำตะกอนที่ได้มาละลายน้ำกลั่น 100 มล. แล้วทำให้ตกตะกอนซ้ำในช่วง pH5.1 – 4.8 ระดับความอิ่มตัว $(NH_4)_2SO_4$ 60% แยกตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์

2.3.5 **การกำจัด $(NH_4)_2SO_4$**

การกำจัด $(NH_4)_2SO_4$ และโมเลกุลขนาดเล็กกว่า 8,000 ดาลตัน ออกจากสารละลายโปรตีนมำโดยวิธีไดอะลัยซิส ดังรูปที่ 7 คือบรรจุสารละลายลงในถุงปิดหัวท้ายด้วย parafilm ใส่ลงในบีคเกอร์ที่บรรจุน้ำกลั่น พร้อมทั้งคนด้วยแท่งแม่เหล็กที่ 4°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปลี่ยนถ่ายน้ำกลั่นใหม่ลงไปทุก 6 ชั่วโมงอีก 2 ครั้ง จากนั้นตัดปากถุง ฉีดล้างถุงด้วยน้ำกลั่น แยกสารละลายโปรตีนออกจากตะกอนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000xg 10 นาที

2.3.6 **การทำให้โปรตีน (กลัยโคโปรตีน) ในสารละลายแห้งโดยวิธี** Freeze dry

เริ่มต้นทำโดนการนำสารละลายโปรตีนในขวดแก้วตันกลมที่ทนความดันสูงไปกลิ้งในอ่าง ethanol ที่มีอุณหภูมิ เช่น ที่ -30°C ถึง -70°C ภายใต้สุญญากาศ (ดังรูปที่ 5) จนกระทั่งได้โปรตีน (กลัยโคโปรตีน) ที่แห้ง

2.3.7 **การหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ** Lowry **และคณะ** (1951)

ทำโดยเจือจางสารละลายโปรตีนจน 0.1 มล. มีโปรตีน 10 – 100 ไมโครกรัม (µg) ผสม 0.1 มล. กับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH : 1% potassium sodium tartate : 0.5% $CuSO_4$ อัตรา 100 : 1 : 1) ปริมาตร 3 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จึงเติมสารละลายฟอลิน – ฟีนอล (Folin – phenol reagent : น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.3 มล. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 650 nm เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 650 nm ของ BSA fractionV ที่ 0.1 มล. มีโปรตีน 12.5 , 25 , 50 และ 100 ไมโครกรัม (µg) ในกรณีโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำเจือจางด้วย 0.9% NaCl

สำหรับการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในผลได้กับ BSA fractionV ปริมาณ 50 µg เท่ากันทำโดยชั่งผลได้ BSA fractionV ที่แห้งละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 0.5 มก./ มล. แล้วนำ 0.1 มล.ไปวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้น

2.3.8 **การวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตในกลัยโคโปรตีนโดยวิธี** phenol – H_2SO_4

ทำโดยการเติม 5% phenol 1 มล. ลงในสารละลายกลัยโคโปรตีนที่ได้จากการแยกและ BSA ractionV เข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มล. แล้วเติม conc H_2SO_4 5 มล. ผสมให้เข้ากัน วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในตู้ควัน 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร (nm) เทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ทั้ง galactose 0.2 มล. และ glucose 0.2 มล. ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลในช่วง 10 – 100 ไมโครกรัม (µg) เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ

2.3.10 **การทำโพลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี** SDS **แปลงสภาพในเจล** (Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis **หรือ** SDS - PAGE) **ตามวิธี** Laemmli (1970)

ใช้โพลิอะคริลาไมด์ เจลเข้มข้น 4% ใน 0.125 M Tris – HCl pH6.8 เป็นเจลชั้นบน (stacking gel), และโพลิอะคริลาไมด์ เจลเข้มข้น 10% .o 0.375 M Tris – HCl pH8.8 เป็นเจลชั้นล่าง (separating gel) มีรายละเอียดของการเตรียมดังตารางที่ 1 ภาคผนวก

สำหรับการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (standard Low molecular weight protein หรือ STDLMW ประกอบด้วย phosphorylaso MW 97 kDa, albumin MW 66 kDa, cvalbumin MW 45 kDa, carbonic anhydrase 30 kDa, trysin inhibitor MW 20.1 kDa, lactalbumin MW 14.4 kDa) และการเตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่าง ทำโดยการผสมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน หรือสารโปรตีน 3 ส่วน กับ บัฟเฟอร์สำหรับ SDS – PAGE 1 ส่วน (บัฟเฟอร์นี้ประกอบด้วย 0.2 M Tris – HCl pH6.8, 8 mMEDTA, 40% glycerol, 4% SDS, 4% ß – mercaptoethanol และ 0.4% bromophenol blue) แช่ในน้ำเดือด 5 นาที หลังจากนั้นใส่ STDLMW ให้มี albumin 2 µg/ ช่อง และสารละลายโปรตีนให้มีโปรตีน 8 µg/ ช่อง แล้วทำอิเล็คโทรฟอรีซิสใน 0.025 M Tris, 0.2 M glycine, 1% SDS pH8.3 ใช้กระแสไฟฟ้า 20 mA ต่อเจล 1 แผ่น เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที หรือจนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนเกือบสุดของล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟฟ้าแล้วนำเจลไปย้อมด้วย 0.02% Cocmassie brilliant blue (R-250) ใน 50% methanol, 7.5% glacial acetic acid นาน 12 ชั่วโมง และนำเจลไปล้างที่ไม่ต้องการออกด้วยการแช่แผ่นเจลในสารละลายผสมของ 50% methanol กับ 7.5% glacial acetic acid ตามด้วยการล้างแผ่นเจลด้วยสารละลายผสมของ 5% methanol กับ 7.5% glacial acetic acid จนกว่าจะเห็นแถบของโปรตีนชัดเจนและส่วนที่ไม่มีโปรตีนจะใสไม่มีสี