บทที่ 2

วิธีการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

1. คอลัมน์ C18 ขนาด 8x125 mm	Gilson
2. คอลัมน์ C18 ขนาด 4.6x250 mm	Vydac
3. C 18 Sep pak cartridge	Waters
4. เครื่อง HPLC (High performane Liquid Chromatography)	Gilson
5. เครื่อง MALDI-TOF MS (Matrix assited laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry)	Bruker Bifex
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Sigma model Z-15
7. เครื่องระเหยแห้ง (Speed vaccum concentrat)	Savant
8. เครื่องดูดอากาศ (Suction pump) พร้อมอุปกรณ์	
9. เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator)	Crest
10. เครื่องอ่านถาด ELISA (Microplate reader)	BIO-TEX instrument EL 312e
11. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome)	
12. เครื่องเก็บแฟรคชัน (fraction collector)	
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Shimadzu UV-visible model UV-160A
14. ออโตปิเปตพร้อมทิป (autopipettte and tip)	
15. กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยา	
16 16. อ่างเลี้ยงกุ้งพร้อมอุปกรณ์การเลี้ยงกุ้ง	

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17. ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง
18. ตู้อบ (hot air oven) — Memmert
19. ปาสเตอร์ปิเปต
20. ถุงมือยาง
21. ถาด ELISA 96 หลุม (ELISA microtiter plate 96 well) — Nunc.442404
22. ครกหิน
23. กระดาษไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane) — Bio-rad
24. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 และ 30 มิลลิลิตร
25. ถุงไดอะไลซิส (Dialysis tube) — Sigma
26. ขวดรูปกรวยมีแขน (Suction flask)
27. สไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์
28. โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์
29. ขวดฝาเกลียว (vial tube)
30. ตะเกียงแอลกอฮอล์
31. แท่นอุ่นสไลด์
32. กล้องจุลทรรศน์
33. กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

สารเคมี

1. Fmoc-Gly-OH (MW. 297.3) — Novabiochem
2. Fmoc-Ala-OH (MW. 311.3) — Novabiochem
3. Fmoc-Val-OH (MW. 339.4) — Novabiochem
4. Fmoc-Thr(tBu)-OH (MW. 397.5) — Novabiochem
5. Fmoc-Gln(Trt)-OH (MW. 610.7) — Novabiochem
6. Fmoc-Asn(Trt)-OH (MW.596.7) — Novabiochem
7. Fmoc-Tyr(tBu)-OH (MW. 459.6) — Novabiochem
8. 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,13,3-tetramethyluronium hexaflurophosphate (HBTU) — Novabiochem
9. NovaSyn® TGR resin — Novabiochem

10. N,N-Dimethylformamide (DMF)	Fluka
11. N-Ethyldiisopropylamine (DIPEA)	Fluka
12. Ninhydrin	M&B
13. Potassium cyanide (KCN)	Fluka
14. α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA)	Sigma
15. Diethyl ether	Merck
16. Phenol	Merck
17. Complete Freund's adjuvant	Sigma
18. Incomplete Freund's adjuvant	Sigma
19. 25% glutaraldehyde	Sigma
20. นมพร่องมันเนย	Canation
21. 30% Hydrogen peroxide	Sigma
22. Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
23. Sodium chloride (NaCl)	Fluka
24. Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)	Fluka
25. Potassium chloride (KCl)	Fluka
26. Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	Fluka
27. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	Fluka
28. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Fluker
29. di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4)	Fluka
30. Sodium Citrate	Fluka
31. Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck
32. *o*-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)	Sigma
33. Goat antimouse IgG heavy and light chain - horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Sigma
34. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma
35. Cobalt (II) chloride	Sigma
36. Enzymatic Glucose Oxidase Colorimitric Determination	Procedue No.510 , Sigma Diognostic Kit

37.	น้ำกลั่นและน้ำกลั่น 3 ครั้ง	
38.	น้ำแข็งแห้ง (dry ice)	
39.	Methanol (analytical grade)	Merck
40.	Glacial acetic acid	Merck
41.	Trifluoroacetic acid (TFA , analytical grade)	Fluka
42.	Trifluoroacetic acid (TFA , HPLC grade)	Sigma
43.	Acetonitrile (ACN , HPLC grade)	Mallinckrodt
43.	Merthiolate	Sigma
44.	95% Ethanol	Merck
45.	Buthanol	Merck
46.	Gelatin	Difco
47.	พาราพลาสต์ (Paraplast)	Oxford Labware
48.	Formaldehyde	Merck
49.	Picric acid	Fluka
50.	Calf serum	Sigma
51.	Eosin Y	Harleco
52.	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน	Sigma
53.	*o*-Dianisidine	Sigma
54.	Triton X-100	
55.	Glycine	Biorad
56.	Sodium hydroxide (NaOH)	Merck
57.	Hydrochloric acid (HCl)	Merck

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

2.1. การสังเคราะห์เพปไทด์โดยวิธี Solid phase Peptide Synthesis

2.1.1 การสังเคราะห์เพปไทด์ YANAVQV-NH_2 (T-) , MW. 762.87 มีขั้นตอนดังนี้คือ

รอบที่ 1

ขั้นตอนที่ 1 การทำให้เรซินพองตัว (Swelling) แช่ Novasyn TGR resin (loading 0.2 มิลลิโมลต่อกรัม) 50 มิลลิกรัม (10 ไมโครโมล) ในN,N-Dimethyformamide (DMF) ในปาสเตอร์ปิเปตที่มีใยแก้วอุดอยู่ เป็นเวลา 1/2 -1 ชั่วโมง ดูด DMF ออกทางปลายด้านล่างของปิเปตโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ

ขั้นตอนที่ 2 การกระตุ้นและการคู่ควบ (Activating และCoupling) เตรียมสารละลายซึ่งประกอบด้วย Fmoc-Val-OH 13.6 มิลลิกรัม (4 eq. , 40 ไมโครโมล) , HBTU 15.2 มิลลิกรัม (4 eq. , 40 ไมโครโมล) และ DIPEA ปริมาตร 14 ไมโครลิตร (8 eq. , 80 ไมโครโมล) และ DMF ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะมิโนประมาณ 0.1 โมลาร์) จากนั้นแช่ Novasyn TGR resin ในสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 1 -2 ชั่วโมง โดยเขย่าเป็นครั้งคราว ล้าง Novasyn TGR resin ด้วย DMF ครั้งละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 3-4 ครั้ง

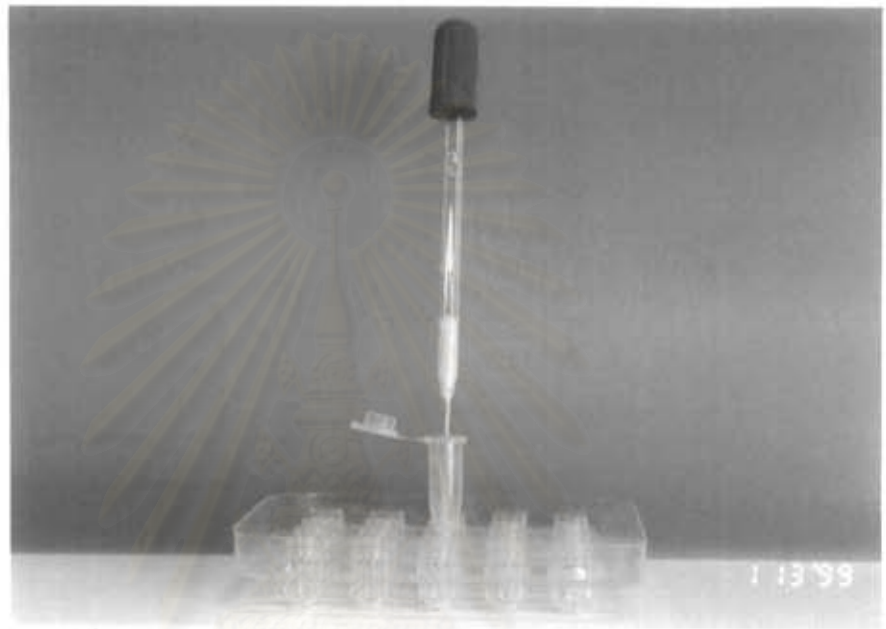
ขั้นตอนที่ 3 การกำจัดหมู่ปกป้องปลาย N (Deprotecting) แช่ Novasyn TGR resin ในสารละลาย 20 % piperidine ใน DMF ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว (เพื่อกำจัดหมู่ Fmoc ออก) เก็บสารละลายจากขั้นตอนนี้เจือจางด้วยเมทานอล นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร เพื่อหาประสิทธิภาพในการคู่ควบ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (วิธีการทดลองด้านล่าง) ล้าง Novasyn TGR resin ด้วย DMF ครั้งละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 3-4 ครั้ง เมื่อเสร็จจากขั้นตอนนี้จะได้ วาลีนเชื่อมต่อกับ Novasyn TGR resin (Val-Novasyn TGR resin)

ในทำนองเดียวกัน **รอบที่ 2 , 3 , 4 , 5 , 6 และ 7** ใช้ Fmoc-กรดอะมิโน ปริมาณ 40 ไมโครโมล (4 eq.) เท่ากัน นั่นคือใช้ Fmoc-Gln(Trt)-OH 24.4 มิลลิกรัม Fmoc-Val-OH 13.6 มิลลิกรัม) Fmoc-Ala-OH 12.5 มิลลิกรัม Fmoc-Asn(Trt)-OH 23.8 มิลลิกรัม Fmoc-Ala-OH 12.5 มิลลิกรัม และ Fmoc-Tyr(tBu)-OH 18.4 มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยทำซ้ำในขั้นตอนการคู่ควบและการกำจัดหมู่ Fmoc ซึ่งจะได้กรดอะมิโนเรียงต่อกันตามลำดับเป็นสายเพปไทด์ตามต้องการบน Novasyn TGR resin

ขั้นตอนที่ 4 การกำจัดหมู่ปกป้องครั้งสุดท้ายและการแยกผลิตภัณฑ์จากเรซิน (Cleavage) เป็นการแยกสายเพปไทด์ออกจาก Novasyn TGR resin

โดยแช่ YANAVQV-Novasyn TGR resin ใน 95% TFA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายมาระเหย TFA ออก โดยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนในตู้ควัน เติมไดเอทิลอีเทอร์ให้มี

ปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตะกอนของ crude เพปไทด์โดยปั่นที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์ 2 ครั้ง นำตะกอนของ crude เพปไทด์ไปแยกให้บริสุทธิ์โดย RP-HPLC และตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุล โดย MALDI-TOF MS ต่อไป



รูปที่ 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์โดยวิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง

<u>การตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาโดยวิธีนินไฮดริน (ninhydrin test or Kaiser test)</u>

เตรียมสารละลายต่างๆดังนี้

สารละลาย A : ละลายนินไฮดริน 1.25 กรัม ในเอทานอล 95% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

สารละลาย B : ละลายฟีนอล 40 กรัม ในเอทานอล 95 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

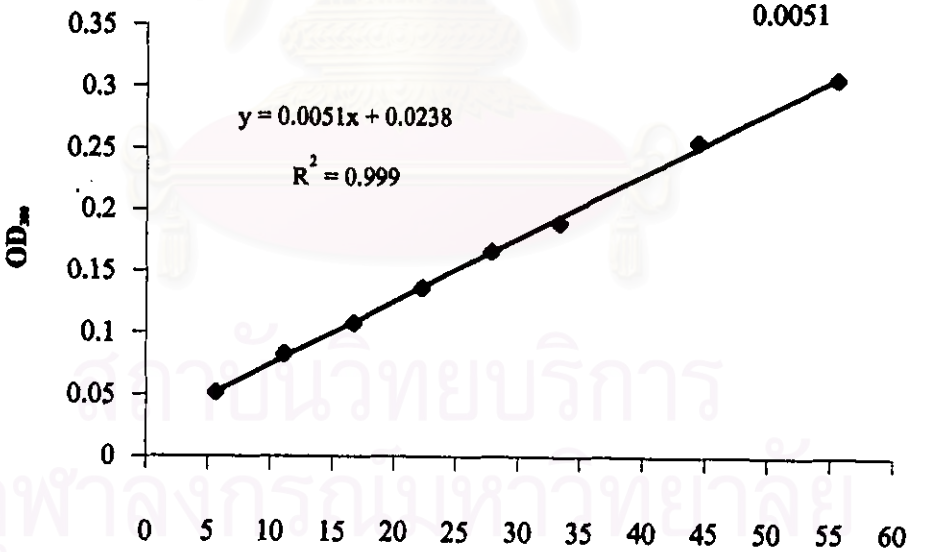
สารละลาย C : ผสมสารละลาย NaCN ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (NaCN 5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ในพิริดีน 24.5 มิลลิลิตร

หลังจากขั้นตอนการกระตุ้นและการคู่ควบ แบ่งเม็ดเรซินปริมาณเล็กน้อยใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก หยดสารละลาย A B และ C อย่างละ 1 หยด ลงไป จากนั้นให้ความร้อนโดยใช้เครื่องเป่าผมเป็นเวลา 4-6 นาที สังเกตการเปลี่ยนสีของเม็ดเรซิน ถ้าเม็ดเรซินเปลี่ยนเป็นสีม่วงน้ำเงิน (positive test) แสดงว่าการคู่ควบของกรดอะมิโนไม่สมบูรณ์ต้องทำการคู่ควบซ้ำ ถ้าเม็ดเรซินไม่เปลี่ยนสี (negative test) แสดงว่าการคู่ควบของกรดอะมิโนสมบูรณ์

<u>การหาประสิทธิภาพของการ coupling (Coupling Efficiency) ของกรดอะมิโนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ dibenzofulvene-piperidine adduct</u>

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Fmoc-Gly-OH ที่ผ่านการกำจัดหมู่ปกป้องด้วย 20% piperidine ใน DMF โดยการละลาย Fmoc-Gly-OH 12.8 มิลลิกรัมในสารละลาย piperridine 20 %ใน DMF ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้นของหมู่ Fmoc เท่ากับ 1.72 มิลลิโมลาร์) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวปริมาตรตั้งแต่ 5-100 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยเมทานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปรับให้แต่ละตัวอย่างมีปริมาตรเท่ากับ 3.1 มิลลิลิตร โดยการเติมสารละลาย piperidine 20%ใน DMF ด้วยปริมาตรที่เหมาะสม วัดค่าดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร (โดยใช้เมทานอลเป็น blank) นำผลที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของหมู่ NH_2 อิสระ พบว่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 5-50 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร (รูปที่ 2.2) ซึ่งสามารถอธิบายได้โดยสมการ

$$\text{ความเข้มข้นของหมู่ } NH_2 \text{ อิสระ (ไมโครโมลต่อลิตร)} = \frac{OD_{300} - 0.0238}{0.0051}$$



รูปที่ 2.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของ dibenzofulvene-piperidine หลังจากผ่านการ deprotect Fmoc-glycine ด้วยสารละลาย 20% piperidineใน DMF

จากสารละลาย Fmoc-piperidine 0.5 มิลลิลิตร ที่ได้จากขั้นตอนการกำจัดหมู่ Fmocในการสังเคราะห์เพปไทด์ นำมาเจือจางด้วยเมทานอลในปริมาตรที่เหมาะสม และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 300 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของหมู่อะมิโนในสารละลายจากปริมาตรของสารละลาย piperidine 20% ที่ใช้ในขั้นตอนการกำจัดหมู่ Fmoc จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพการคู่ควบ ของกรดอะมิโนได้จากสมการ

2.1.2 การสังเคราะห์ YANAVQTV-NH_2 (T+) , MW. 863.98

ขั้นตอนการทดลองทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ T- ในข้อ 2.1.1 ต่างกันที่การสังเคราะห์เพปไทด์ T+ จะเพิ่มทรีโอนีนในลำดับที่ 2 จากปลาย C นั่นคือในการสังเคราะห์รอบที่ 1 -8 ใช้ Fmoc-Val-OH , Fmoc-Thr(tBu)-OH , Fmoc-Gln(Trt)-OH , Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn (Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH และ Fmoc-Tyr(tBu)-OH ในปริมาณ 40 ไมโครโมลเช่นกัน

2.1.3 การแยก crude เพปไทด์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ RP-HPLC

จาก crude เพปไทด์ T- และ T+ ที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 2.1.1 หรือ 2.1.2 นำมาละลายด้วย 10% acetonitrile ใน 0.1 % TFA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นแยกตะกอนที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ ล้างตะกอนอีก 2 ครั้ง รวมส่วนใสที่ได้เข้าด้วยกัน จากนั้นนำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC ผ่านคอลัมน์ C18 ขนาด 125x80 มิลลิเมตร ชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ (concentration gradient) จาก 0.8 % -56 % acetonitrile ใน 0.1% TFA อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ในเวลา 50 นาที ตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร รวบรวมสารที่ออกจากคอลัมน์โดยเครื่องแฟรคชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุกๆ 1 นาที นำแฟรคชันที่แยกได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vac) และนำไปตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลในแต่ละแฟรคชันต่อไป

2.1.4 การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ T- (MW.762.87) และ T+ (MW. 863.98) โดย MALDI -TOF MS

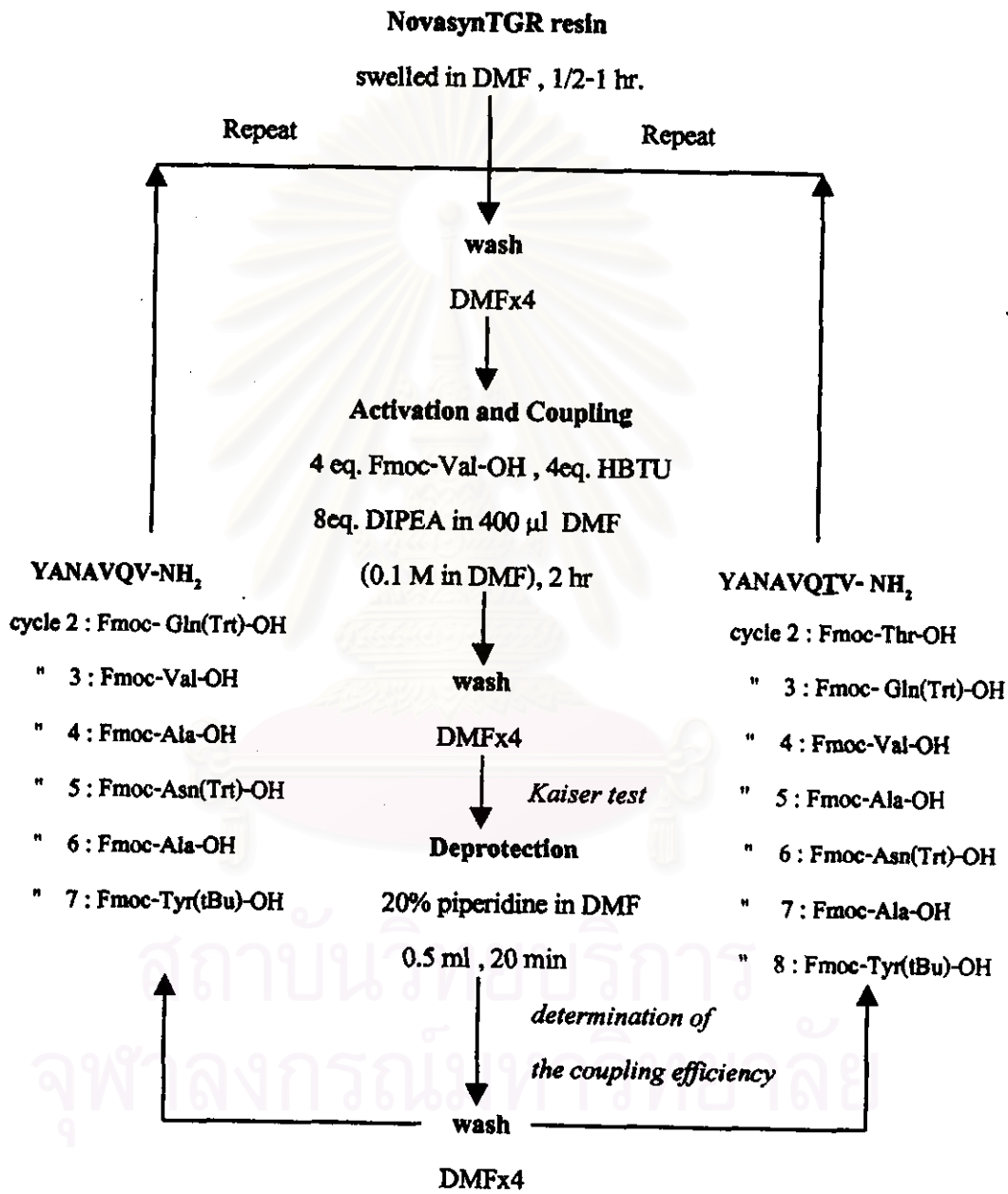
เตรียมสารละลายอิ่มตัวของ CCA (α-cyano-4 hydroxycinanamic acid)ในอะซีโตน หยดลงบนแผ่นโลหะ (target) ในช่องสำหรับใส่ตัวอย่างช่องละ 1 ไมโครลิตร (รูปที่ 2.3) ทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายเพปไทด์ในแฟรคชันต่างๆ ด้วยสารละลาย acetonitrile 33 % ใน 0.1 % TFA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และหยดทับบน CCA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง นำแผ่นโลหะเข้าเครื่อง MALDI-TOF MS เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ที่ต้องการ

รูปที่ 2.3 แผ่นโลหะสำหรับใส่ตัวอย่างในเครื่อง MALDI-TOF MS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Solid support NovasynTGR resin (loading 0.2 mmol/g) 50 mg

Cycle 1 : Fmoc-Val-OH



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการสังเคราะห์เพปไทด์ YANAVQV-NH_2 (T-) และ YANAVQTV-NH_2 (T+)

2.2. การผลิตแอนติบอดีต่อเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น

2.2.1 การเชื่อมเพปไทด์ T- เพปไทด์ T+ และไกลซีนกับโปรตีน BSA ด้วยกลูตาราลดีไฮด์ (BSA-T- , BSA- T+ and BSA-Gly)

เตรียมโปรตีน bovine serum albumin (BSA) เชื่อมกับเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ (BSA-T- และ BSA-T+) โดยผสมโปรตีน BSA 10 มิลลิกรัม กับเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ 0.5 มิลลิกรัม ใน PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ 25% ปริมาตร 15 ไมโครลิตร (ดัดแปลงจาก Sithigorngul, Cowden and Stretton. 1996) ทิ้งไว้เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อกำจัดกลูตาราลดีไฮด์ วัดปริมาตรสารละลายหลังผสมทำไดอะไลซิส และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนรวมในสารละลายโดยประมาณจากโปรตีนเริ่มต้น

เตรียม BSA เชื่อมกับไกลซีน (BSA-Gly) โดยผสม BSA 80 มิลลิกรัม กับไกลซีน 80 มิลลิกรัม ใน PBS ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เติมสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ 25 % ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้นทำเช่นเดียวกับการเตรียม BSA เชื่อมกับเพปไทด์

2.2.2 การกระตุ้นให้หนูขาวสร้างแอนติบอดีต่อเพปไทด์ (immunization)

นำสารละลายเพปไทด์ T- หรือ T+ ที่เชื่อมกับ BSA แล้ว (BSA-T- หรือ BSA-T+) 2 มิลลิกรัม (300 ไมโครลิตร) ผสมกับ Complete Freund' s adjuvant 300 ไมโครลิตรในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตรต่อปริมาตร แล้วฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาวจำนวน 4 ตัวๆละ 150 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัว (0.5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อตัว) หลังจากนั้นฉีดซ้ำอีก 3 ครั้งทุก 2 สัปดาห์ โดยผสมกับ Incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ในปริมาณเท่าเดิมกับการฉีดครั้งแรก เมื่อครบ 1 สัปดาห์ หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เก็บเลือดหนูจากทางเบ้าตา ทิ้งให้แข็งตัว จากนั้นนำเลือดที่ได้ไปปั่นที่ 5000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสที่เป็นซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

2.3. การดูดซับแอนติบอดีต่อโปรตีน BSA ออกด้วย BSA-Gly

นำซีรัมที่ได้จากหนูแต่ละตัวผสมกับสารละลาย BSA-Gly ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในอัตราส่วน 1 : 1000 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-12

ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสสำหรับการทดลองต่อไป (ดัดแปลงจาก Sithigorngul *et al.*, 1996)

2.4. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ที่สังเคราะห์

2.4.1 การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ ที่สังเคราะห์โดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA

นำสารละลาย BSA-T- หรือ BSA-T+ หรือ BSA-Gly ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลุม microtiter plate (ปริมาณโปรตีน 1 ไมโครกรัม/หลุม) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 150 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆละ15 นาที ล้างอีกครั้งด้วย 0.5 % blotto เป็นเวลา 30 นาที เติม 5 % blotto ที่มี BSA-Gly เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายอยู่ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทุกหลุม จากนั้นเติมซีรัมที่ได้จากหนูแต่ละตัวหลังจากดูดซับด้วย BSA-Gly ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วทำการเจือจางครั้งละ 2 เท่า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % blotto จำนวน 4 ครั้งๆละ 15 นาที เติม Goat antimouse IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่ เจือจาง 1:1000 ใน 5 % blotto และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto จำนวน 4 ครั้งๆละ 15 นาที และล้างอีกครั้งด้วย PBS จากนั้นเติมสารละลาย ซับสเตรตซึ่งประกอบด้วย สารละลาย *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มี 0.006 % hydrogenperoxide ในซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์, pH 4.5 ผสมอยู่ ลงในหลุมๆละ 70 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และเติมกรดซัลฟูริก 1 N ทันทีลงในหลุมๆละ 70 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์โดยดูจากค่าการเจือจางสุดท้ายที่ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 หน่วย

2.4.2. การทดสอบความความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ ในการจับกับเพปไทด์ T- หรือเพปไทด์ T+ ที่สังเคราะห์ขึ้น และตรวจปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีโดยวิธี dot-ELISA

เจือจางสารละลายเพปไทด์ T- และ T+ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน จากความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากความเข้มข้นมากไปหาน้อย นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอบต่อในไอของกลูตาราลดีไฮด์ ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสในสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ 0.2% ต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆละ 15 นาที นำไปแช่ใน 5 % blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปบ่มในสารละลายแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- หรือเพปไทด์ T+ ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 40,000 ใน 5 % blotto ที่มี BSA-Gly 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายอยู่ ตามลำดับ (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 %blotto 4 ครั้ง ๆละ 15 นาที บ่มต่อใน GAM-HRP ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,000 ใน 5 % blotto เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 %blotto 4 ครั้ง ๆละ 15 นาที และล้างต่ออีกครั้งด้วย PBS เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.006% hydrogenperoxide (H_2O_2) และ 0.05% cobalt (II) chloride ($CoCl_2$) ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง

2.5. การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในการจับเพปไทด์สภาพธรรมชาติ (Natural Peptide)

2.5.1 การตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกราม โดยวิธี dot-ELISA

2.5.1.1 การเก็บรวบรวมตากุ้งก้ามกราม

รวบรวมตากุ้งโดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนตากุ้งขณะยังมีชีวิตอยู่ แช่ในน้ำแข็งแห้งทันที และเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

2.5.1.2 การเตรียมสารสกัดจากก้านตาในสารละลายเมทานอล กรดแอซิติกและน้ำ

นำตากุ้งจำนวน 200 ก้านตามาบดละเอียดพร้อมน้ำแข็งแห้งในครกหินที่แช่ให้เย็นจัด เทผงก้านตาลงในสารละลายเมทานอล แอซิติกและน้ำ (90:1:9) 100 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิลิตร/ก้านตา) คนให้ทั่ว บดอีกครั้งด้วยเครื่องบด (homogenizer) และทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 -6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใสเก็บไว้ ล้างตะกอนและสกัดซ้ำด้วยสารละลายและวิธีการเดิมอีกครั้ง รวมสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน ระเหยเอาเมทานอลและกรดแอซิติกออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator) จากนั้นเติม 1% trifluoroacetic acid (TFA) ให้ในสารสกัดมีความเข้มข้นของ TFA เท่ากับ 0.1 % ปั่นแยกตะกอนอีกครั้งที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสของสารสกัดไปดูดซับบน C18 Sep-Pak cartridge ชะสารสกัดออกด้วย 50 % acetonitrile ใน 0.1%TFA แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก และเก็บสารสกัดไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.5.1.3 การแยกสารสกัดจากก้านตาโดย RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาที่แยกได้จากข้อ 3.2 มาละลายด้วย 15 % acetonitrile ใน 0.1%TFA ปั่นแยกตะกอนที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสและนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ผ่านคอลัมน์ C18 จากนั้นชะสารสกัดด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ (concentration gradient) จาก 12- 64% acetonitrile ใน 0.1 %TFA อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 0.8 % ต่อนาที ตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร รวบรวมสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์โดยเครื่องแฟรคชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุกๆ 1 นาที

2.5.1.4 การตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์ T-และ เพปไทด์ T+ ในก้านตาโดย วิธี dot - ELISA

นำแฟรคชันที่ 11-59 หลังผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC (ข้อ 2.5.1.3) ระเหยตัวทำละลายออก เติม BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสแฟรคชันละ 1 ไมโครลิตรต่อจุด (ประมาณ 40 ก้านตาต่อจุด) เรียงตามลำดับแฟรคชันที่แยก

ได้จาก RP-HPLC นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.5.1.5. การตรวจหาฮอร์โมน CHH โดยวิธีการ biological activity test

2.5.1.5.1 การเตรียมเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งก้ามกราม

นำกุ้งก้ามกรามเพศเมียมาตัดตาทั้ง 2 ข้าง นำไปเลี้ยงและให้อาหารตามปกติ 1-2 วัน แล้วงดให้อาหารกุ้ง 12-15 ชั่วโมง เก็บเลือดกุ้งจากขาเดินคู่ที่ 4 ประมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นฉีดสารสกัดจากแฟรคชันต่างๆที่แยกโดย RP-HPLC ซึ่งละลายในน้ำเกลือ (*Macrobrachium resenbergii* isotonic physiological saline , pH 7.6) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.5- 2 ก้านตาต่อตัว) ที่ขาเดินคู่ที่ 2 โดยใช้กุ้ง 2-3 ตัวต่อแฟรคชัน หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง เก็บเลือดอีกครั้ง นำเลือดก่อนและหลังฉีดไปหาปริมาณน้ำตาลในเลือด โดยวิธี glucose oxidase method

2.5.1.5.2 การหาปริมาณน้ำตาลในเลือดโดยวิธี glucoseoxidase

นำตัวอย่างเลือดมาทิ้งให้แข็งตัว ปั่นแยกเก็บเฉพาะส่วนใสของเลือด 5 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมของ microtiter plate จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์และสี (glucose oxidase , peroxidase , *o*-Dianisidine-PGO) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (ดัดแปลงจาก Sigma Diagnostic glucose, No. 510) ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณกลูโคสในเลือดโดยเทียบกับปริมาณกลูโคสมาตรฐาน และกำหนดให้ปริมาณ CHH ที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น 25 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตรเท่ากับ 1 หน่วยการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน

2.5.2 การตรวจหาแหล่งที่พบ CHH โดยวิธี immunocytochemistry ในก้านตากุ้งก้ามกราม

2.5.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อในพาราฟิน (Paraffin section)

ตัดก้านตาจากกุ้งก้ามกรามที่ยังมีชีวิตอยู่ ผ่าตัดและลอกเปลือกแข็งออก นำก้านตาที่ได้ไปทำให้คงรูปใน Bouin's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างน้ำประปาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำก้านตาแช่ในตัวทำละลาย เพื่อดึงน้ำออกจากก้านตา ตามลำดับดังนี้คือ แช่ในเอทานอล 70% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในเอทานอล 90% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในเอทานอล 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เปลี่ยน 2 ครั้ง) ในบิวทานอล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตัวทำละลายผสมระหว่างบิวทานอลกับไซลีน ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในไซลีน 2 ครั้งๆละ 1 ชั่วโมง ในตัวทำละลายผสมระหว่างไซลีนกับพาราพลาสต์ ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ในพาราพลาสต์ 3 ครั้งๆละ 1/2 - 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปฝังในพาราพลาสต์ ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นตัดก้านตาให้มีความหนา 50 ไมโครเมตร เรียงเป็นลำดับ (serial section) และ ติดเนื้อเยื่อก้านตาแต่ละชิ้นเรียงตามลำดับบนสไลด์ และนำไปอบให้แห้ง

2.5.2.2 กระบวนการทาง immunocytochemistry โดยวิธี indirect immuno-peroxidase method

นำสไลด์เนื้อเยื่อก้านตามาละลายเอาพาราพลาสต์ออก และเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อ โดยแช่ในตัวทำละลายต่างๆครั้งละ 5 นาที ตามลำดับดังนี้ แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ในตัวทำละลายผสมระหว่าง ไซลีนกับบิวทานอล ในอัตราส่วน 1:1 ในบิวทานอล ในเอทานอล 95 % 90% และ 70 % ใน PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นหยด 10 % calf serum ใน PBS (P_1+) เป็นเวลา 30 นาที หยดแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- หรือ เพปไทด์ T+ ที่เจือจาง 1:5000 ใน P_1+ ให้คลุมเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆละ 15 นาที หยด GAM-HRP ที่เจือจาง 1:1000 ใน P_1+ และนำเนื้อเยื่อไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆละ 15 นาที นำเนื้อเยื่อจุ่มในสารละลายซับสเตรต ซึ่งประกอบด้วย 0.006% hydrogen peroxide และ 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง

จากนั้นดึงน้ำออกและย้อมเนื้อเยื่อโดยแช่ในตัวทำละลายเป็นเวลาอย่างละ 5 นาที ตามลำดับดังนี้ แช่ในเอทานอล 70 % 90% และ 95% ใน 0.02% Eosin Y ในเอทานอล 95% ในบิวทานอล ใน

ด้วทำละลายผสมระหว่างบิวทานอลกับไซลีน และในไซลีน 3 ครั้ง ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้เปอร์เม้าท์ (permount)

2.5.2.3 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ในก้านตากุ้งก้ามกรามด้วยวิธี immunocytochemistry

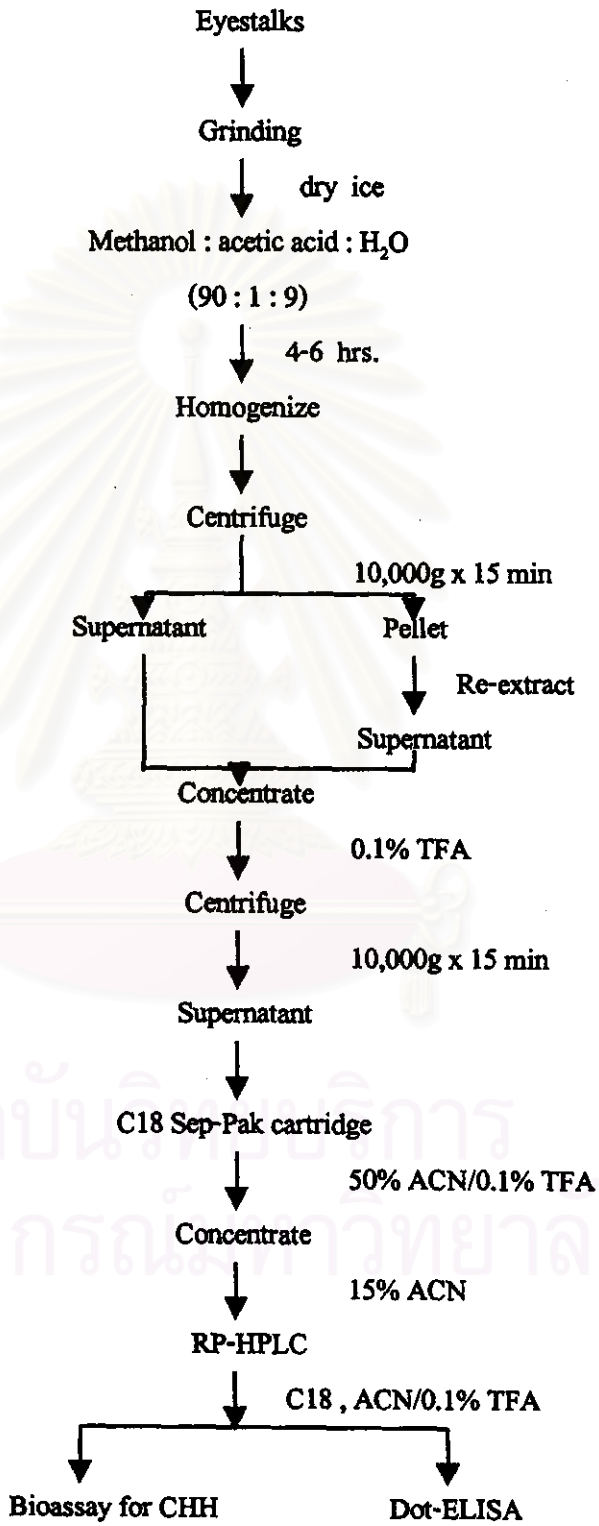
จากการทดลองข้อ 2.5.2 พบว่าเฉพาะแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ เท่านั้นที่จับกับ CHH ในก้านตากุ้งก้ามกรามและเพื่อเป็นการยืนยันว่าการจับของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ กับ CHH ในก้านตาไม่ได้เกิดจากการปนเปื้อนของแอนติบอดีอื่นๆ ที่สามารถจับกับองค์ประกอบในก้านตาได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองตามวิธีการดังนี้คือ

เตรียมเนื้อเยื่อก้านตากุ้งก้ามกรามเช่นเดียวกับข้อ 2.5.2.1 แต่ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 8 ไมครอน จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทาง immunocytochemistry เช่นเดียวกับข้อ 2.5.2.2 โดยหยดแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ที่ผสมในสารละลาย BSA-Gly เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:5000 สลับกับการหยดแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ที่ผสมในสารละลาย BSA-T+ เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน 1:5000

2.5.3 การตรวจปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ T-และ เพปไทด์ T+ ในก้านตากุ้งกุลาดำโดยวิธี immunocytochemistry

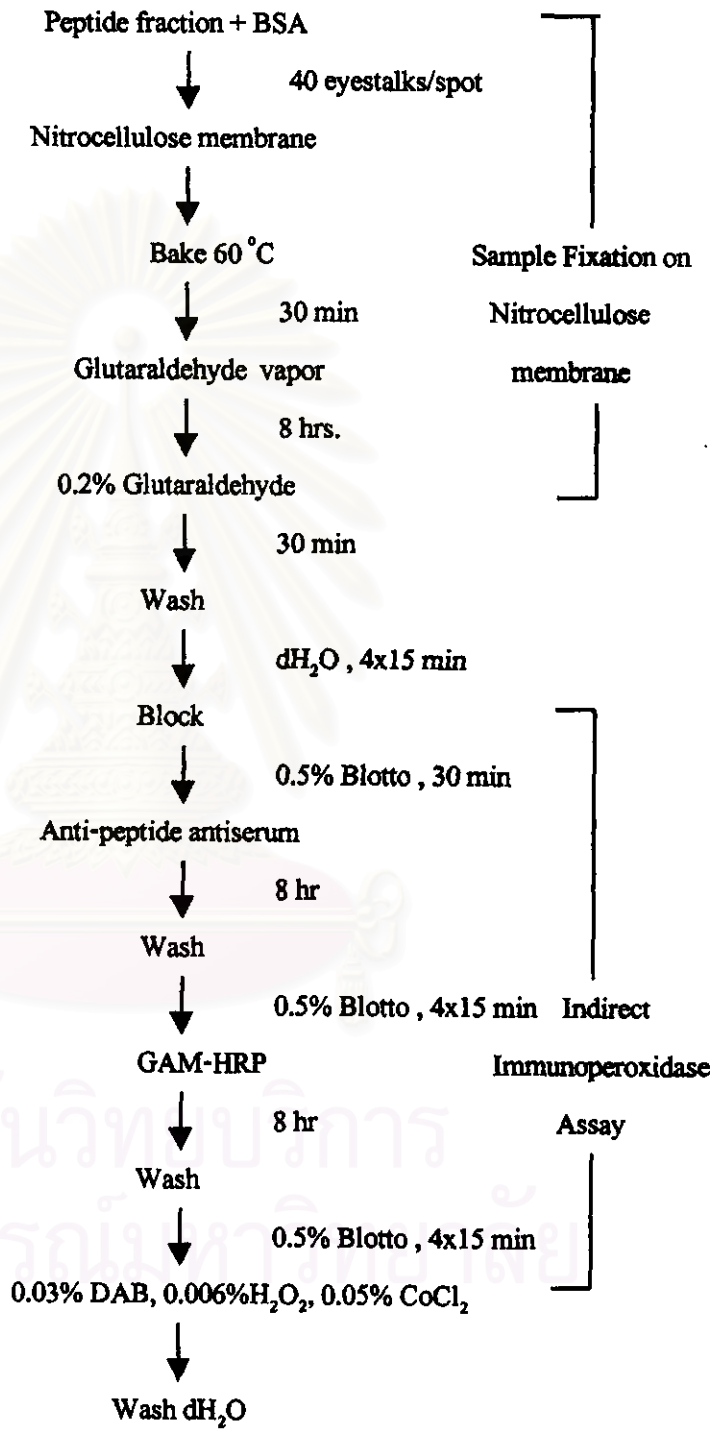
ใช้ก้านตากุ้งกุลาดำทำการทดลองทำเช่นเดียวกับข้อ 2.5.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

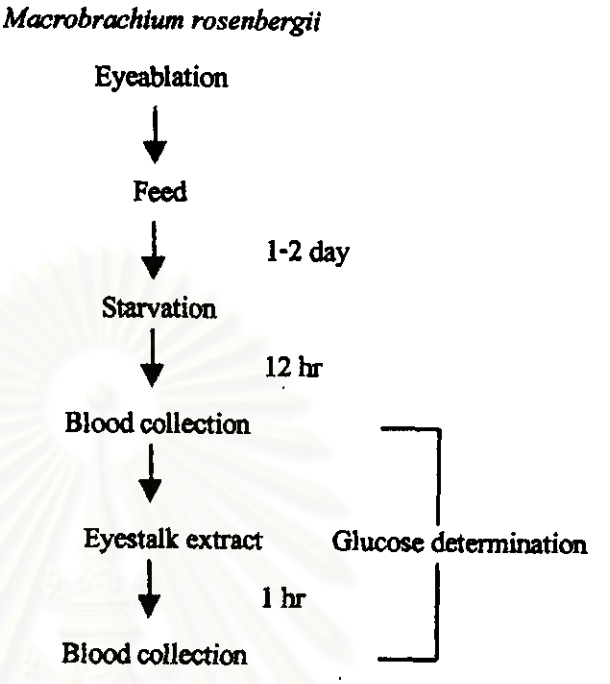


รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกราม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

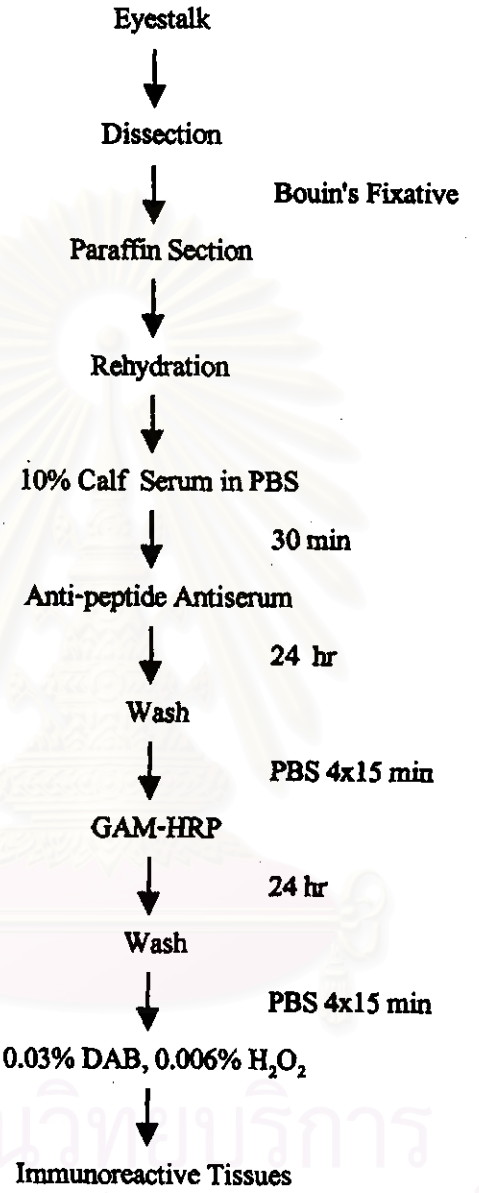


รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์โดยวิธี dot-ELISA



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการตรวจหาฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดกุ้งก้ามกราม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการตรวจหาแหล่งที่พบ CHH ในเนื้อเยื่อก้านตาโดยวิธี Immunocytochemistry

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย