บทที่ 2

วัสดุเคมีเภัณฑ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุเคมีภัณฑ์และเครื่องมือ

2.1.2 เครื่องมือ

เครื่องมือ	บริษัท
Incubator, model 1H-100	Gallenkamp
Microscope, model BH-2	Olympus
MSE centrifuge, model 50	Measuring & Scientific Equipment Ltd.
Laboratory counter, model 185117	Clay Adams
Hemocytometer	American Aptical (AO)
Red cell count pipette (thoma type)	Resistance, W.
MSE homogenizer	Measuring & Scientific Equipment Lts.
Water bath, model BKM 250	A Gallenkamp and Co., Ltd.
Beckman refrigerated centrifuge, model J - 21C	Meckman Instruments, Inc.
Beckman digital pH meter, model 7b	Beckman Instruments, Inc.
Ultrarack fraction collector, model 12070	LKB productor, AB, Bromma.

เครื่องมือ	บริษัท
Beckman spectrophotometer model 25	Beckman Instruments, Inc.
GE Vacuum pump	General Electric, U.S.A.
Analytical balance, model H 10 TW	Mettler Instrument.
Sartorius analytical balance, model 12355	Sartorius Werke.
Eppendork pipette, model 13130	Hamburg, Germany.
Ground glass base & stopper for suction pump	Millipore Corporation, Bedford
Autoclave	Griffin
Spectonic 20	Bousch and Lomb
Vacuum Dessicator, diameter 10 & 12 inchs	RTW, Germany
Circulating controlled bath model SCB IV	Sahapesaj Co., Thailand
Packard PL. Tri-Carb liquid Scintillation Counter	Packard Instrument Comp. Inc.
Vortex mixer, model K 550GE	Scientific Industry Inc.
ตู้ปลอดเชื้อติดหลอดไฟแสงอุลตราไวโอเลท	สำหรับปฏิบัติการเพาะเลี้ยง

2.1.2 เคมีภัณฑ์

007597

ชื่อ	บริษัท
[2 - ^{14}C] pyrimethamine specific activity - 54 mCi/mmol molecular weight 250.4	Amersham International Ltd.
NADPH (nicotinamide adinine dinucleotide phosphate, reduced form) Tetrasodium salt, type III,	Sigma
Blue dextran 2000.	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
Bovine serum albumin (BSA) A grade, crystallized.	Calbiochem Sandiego, U.S.A.
Sephadex G-200	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
Sephadex G-75	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
Ficoll-400, nonionized, high molecular weight	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
Pyrimethamine	Thai Governt. Pharm. Org.
Aldolase, crystallized, rabbit muscle	Sigma
Catalase, crystallized,beef liver	Sigma
Myoglobin, crystallized, beef muscle	Sigma
Folic acid pure, Lot no. 79950	Koch-light Laboratories Ltd.
L-Ascorbic acid, Analar grade	BDH Chemicals. Lts.

I 18062131

ชื่อ	บริษัท
Sodium dithionite, Laboratory reagent	May & Beaker Ltd.
Methotrexate (prepare as the sodium salt) Lot no. BV - 71 - 236	Cancer Chemotherapy National National Cancer Institue, NIA, Bethesda, Maryland,
Gentamycin for intravenous use (40 mg/ml)	Atlantic Laboratories corp., Ltd. Bangkok
Giemsa (Certified Giemsa's stain lots of Azure B type)	BDH Chemicals Ltd.
D-Sorbitol, Laboratory Reagent	BDH Chemicals Ltd.
Saponin, Laboratory Reagent	BDH Chemicals Ltd.
Triton X-100	Packard Instrument Comp.
Lactic acid, G.P.R. grade	Hopkin and Williams
Sodium bicarbonate, Analar grade	Merck.
N-2-Hydroxyethylpiperazine-N' -2-ethane-sulfonic acid (HEPES) buffer, No. H-3375	Sigma
เคมีภัณฑ์อื่น ๆ ที่ใช้ในห้องทดลอง เป็นชนิด Analar grade	Merck, Fluka-Garentie และ BDH Chemicals Ltd.

2.13 วัสดุภัณฑ์

Filter Paper Whatmen no. 41, Whatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone Kent, England

Plastic Tissue Culture Dish size 15 x 60, 10 x 35 m.m.,
Falcon, Becton, Dickinson and Co.,
Millipore Filter, pore size 0.45 micron, Filter type HA,
Millipore Corporation Bedford, Massachusetts.
Millipore filter, pore size 0.22 micron, Filter type G.S.,
Millipore Corporation Bedford, Massachusetts.

2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

RPMI medium 1640, Gibgo Laboratories, Grand Island Biological Company, New York, U.S.A.
เม็ดเลือดแดง และซีรัมของคน กรุป บี,

2.2 เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม

2.2.1 พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 ได้จากผู้ป่วยที่มาตรวจรักษาที่หน่วยมาลาเรีย จังหวัดกาญจนบุรี เมื่อวันที่ 29 มกราคม พ.ศ. 2522 เป็นไอโซเลทที่ต้านคลอโรควิน

2.2.2 พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท CC ได้จากผู้ป่วยจังหวัดปราจีนบุรี มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน เมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2523 เป็นไอโซเลทชนิดต้านคลอโรควินเช่นกัน

2.2.3 พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท G_{112} ได้จากผู้ป่วยของประเทศแกมเบีย โดยความอนุเคราะห์ของ Dr.David Walliker, Institute of Animal Genetics, University of Ediburgh, England เป็นไอโซเลทชนิดไวต่อคลอโรควิน

เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมทั้ง 3 ไอโซเลท ถูกเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว และนำออกมาเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นครั้งคราว ณ ห้องปฏิบัติการมาลาเรียภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ห้องปฏิบัติการมาลาเรีย แผนกวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม

2.3.1 การเตรียมสารละลาย RPMI

ละลาย RPMI 1640 (Grand Island) 5.94 กรัม ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ชนิดกลั่นสามครั้ง (triple distilled water) 900 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติม HEPES buffer ให้ความเข้มข้นเป็น 25 มิลลิโมลาร์ จะได้ pH เท่ากับ 6.75 ทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 960 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยน้ำกลั่นชนิดเดียวกัน เติมเจนตาไมซิน (ชนิด 40 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ลงไป 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการปลอดเชื้อโดยผ่านมิลลิพอร์ฟิลเตอร์ ขนาด 0.22 ไมครอน ถ่ายใส่ในขวดสำหรับเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วขวดละ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลาย RPMI ที่เตรียมนี้สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 2 สัปดาห์

2.3.2 การเตรียมสารละลาย 5% โซเดียมไบคาร์บอเนต

ละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 5 กรัม ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดกลั่นสามครั้ง 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปลอดเชื้อโดยผ่านมิลลิพอร์ฟิลเตอร์ขนาด 0.22 ไมครอน ถ่ายใส่ในขวดที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้สารละลาย RPMI 1640 (ในข้อ 2.3.1) ปริมาณ 100 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ผสมกับสารละลาย 5% โซเดียมไบคาร์บอเนต (ในข้อ 2.3.2) 4.2 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร อาหารที่ได้นี้เรียกอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา pH เท่ากับ 7.4 ก่อนใช้เพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ต้องเติมซีรัมของคนลงไปให้ความเข้มข้นสุดท้ายของซีรัมเป็น 10 - 12 เปอร์เซ็นต์ เรียกอาหารนี้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์

2.4 การเตรียมเม็ดเลือดแดงสำหรับเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม

เม็ดเลือดแดงเพื่อการเพาะเลี้ยงได้จากผู้บริจาค เจาะใส่ในหลอดแก้วที่ปราศจากเชื้อ และมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดสารละลาย acid citrate dextrose (ACD)

(สารละลาย ACD ประกอบด้วยโซเดียมซิเตรท 1.32 กรัม, กรดซิทริค 0.48 กรัม, เด็ก-โตรส 1.40 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเลือดต่อสารละลาย ACD 1 ต่อ 9 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เก็บได้นานไม่เกิน 4 สัปดาห์) เลือดที่ได้ปริมาณ 5 - 7 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำมาปั่นแยกพลาสมา เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด (buffy coat) ออกจากเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ที่ 800 g. อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ใช้พาสเจอร์ปิเปตต์ (pasteur pipette) ดูดพลาสมา และส่วนที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างเม็ดเลือดแดงกับพลาสมาออก ล้างเม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่ด้วยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาลงไปประมาณ 2 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดแดง ทำการปั่นและล้าง 3 ครั้ง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ตรวจดูว่าเลือดที่ได้ไม่มีเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดปน โดยทำฟิล์มบางและย้อมด้วยสีเสียมซ่า (Giemsa) นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ โดยใช้เลนส์กำลังขยาย 10 x 100 ตามวิธี 2.6.3 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ปริมาตรเท่าตัว แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เลือดที่เตรียมได้นี้สามารถใช้ได้ภายใน 1 สัปดาห์

2.5 การเตรียมซีรัม

เจาะเลือดจากผู้บริจาคใส่ในภาชนะปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ลิ่มโลหิตหดตัวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นแยกซีรัมที่ได้เก็บไว้ในภาชนะที่ปลอดเชื้อ นำซีรัมที่แยกมาได้นี้ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง (เพื่อทำลายคอมพลีเมนท์) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 10 องศาเซลเซียส ซีรัมที่เตรียมโดยวิธีนี้สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 6 เดือน

2.6 การเตรียมและย้อมสีเสียมซ่า

2.6.1 สารละลายเสียมซ่า

บดสีเสียมซ่า 0.6 กรัม กับกลีเซอรอล ในโกร่งที่ละน้อยให้ละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกันดี จนผงสีละลายหมด ล้างสีที่ติดโกร่งด้วยกรีเซอรลอ ปริมาณของกลีเซอรอลที่ใช้ทั้งหมด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเทรวมใส่ในขวดแก้วทรงกรวย นำไปอุ่นและเขย่าบ่อย ๆ ที่

อุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียส นาน 6 - 8 ชั่วโมง เติมเมธานอลบริสุทธิ์ 50 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดปากขวดทรงกรวย นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้สีสุก กรองผ่านกระดาษกรองเพื่อกำจัดตะกอน สารละลายเสียมซ่าที่ได้เก็บไว้ได้นาน

2.6.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ผสมสารละลาย 0.066 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจน ฟอสเฟต และสารละลาย 0.066 โมลาร์โปแตสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แล้วปรับ pH ตามที่ต้องการ (pH 7.0 - 7.2) ทำการผสมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

2.6.3 วิธีย้อมสีเสียมซ่า

ใช้วิธีย้อมแบบฟิล์มบาง โดยดูดเลือด 1 หยด(ประมาณ 0.05ลูกบาศก์เซ็นติเมตร) ด้วยพาสเจอร์ ปิเปตต์ หยดลงที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของสไลด์แผ่นแรก แตะปลายสไลด์แผ่นที่สองซึ่งสะอาดและเรียบลงบนสไลด์แผ่นแรก แล้วลากถอยไปแตะกับหยดโลหิตให้แผ่กระจายจนเต็มหน้าของสไลด์แผ่นที่สอง ไถสไลด์ไปข้างหน้าโดยทำมุมกับแผ่นแรก 30 - 40 องศา ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จะได้แผ่นฟิล์มบางของเลือด ลนเปลวไฟให้แห้งโดยเร็ว สไลด์ที่ได้นำไปแช่ในเมธานอลบริสุทธิ์นาน 5 - 10 วินาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงติดแน่นขึ้น หยดสีเสียมซ่าที่ผสมบัฟเฟอร์ลงไปบนสไลด์ฟิล์มบางนี้ให้เต็มสไลด์ ทิ้งไว้ตามเวลาดังตารางข้างล่างนี้

อัตราส่วนผสม เสียมซ่า : ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	เวลาที่ใช้ในการย้อมสี
1 : 10	15 นาที
1 : 15	20 นาที
1 : 50	45 นาที
1 : 100	2 ชั่วโมง

เมื่อย้อมสีครบเวลาตามที่กำหนดแล้ว ล้างด้วยน้ำเบา ๆ เพื่อไล่ตะกอนสีออก ทิ้งให้แห้งนำไปตรวจดูรูปร่างลักษณะของเซลด้วยกล้องจุลทัศน์ โดยใช้เลนส์กำลังขยาย 10 x 100 โดยมีหลักสังเกตคือ ระยะวงแหวนโครมาตินติดสีเข้ม ไซโตพลาสมเป็นรูปวงแหวนติดสีฟ้า ระยะโทรโฟซ่อยท์ ไซโตพลาสมเริ่มเปลี่ยนรูปร่าง อาจเป็นรูปยาวรีหรือหนาขึ้น โครมาตินติดสีแดงเข้ม ระยะไซซ่อนท์ ไซโตรพลาสมใหญ่ขึ้นมากติดสีฟ้า โครมาตินแบ่งเป็น 2 หรือมากกว่า 2 อัน ติดสีแดงเข้ม มีรงควัตถุสีน้ำตาลเป็นแท่ง ๆ อยู่ในไซโตพลาสม และบางครั้งพบระยะแกมีโตไซท์มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยวติดสีแดงหรือสีน้ำเงิน

2.7 การเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมแบบต่อเนื่อง (Trager และ Jensen, 1976 และ 1977)

นำตัวอย่างเลือดซึ่งติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม เติมอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ลงไป ปริมาตรเท่ากับเม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่ จากนั้นเจือจางด้วย เม็ดเลือดแดงที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 2.4 เพื่อให้ได้เปอร์เซ่นต์ของพาราไซต์ในเลือด (percent parasitaemia) ตามที่ต้องการ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์จนกระทั่งส่วนผสมสุดท้ายของเลือดเป็น 12 - 15% เซลซัสเปนชั่น ถ่ายใส่จานเพาะเลี้ยงสำหรับเลี้ยงเชื้อขนาด 10 x 35 มิลลิเมตร ความจุ 1.5 ลูกบาศก์เซ่นติเมตร และ/หรือขนาด 15 x 60 มิลลิเมตร ความจุ 5 ลูกบาศก์เซ่นติเมตร นำไปวางในเดสซิเคเตอร์แบบสูญญากาศจุดเทียนไขชนิดสีขาวแล้วปล่อยทิ้งไว้จนเทียนไขดับ ปิดจุก (stopcock) จะได้สภาวะของบรรยากาศภายในเดสซิเคเตอร์ ซึ่งเหมาะแก่การเจริญของพลาสโมเดียม (คาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 5 - 8 เปอร์เซ่นต์ และออกซิเจนมากกว่า 17 เปอร์เซ่นต์) นำไปอบในอินคิวเบเตอร์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์อย่างน้อยวันละครั้ง ในกรณีที่จำนวนพาราไซต์ในเลือดสูงเกิน 3 เปอร์เซ่นต์ ควรเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ทุก ๆ 8 หรือ 12 ชั่วโมง ติดตามการเจริญและตรวจสภาพพลาสโม - เดียม ฟาลซิปารัม ทุก ๆ 8 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง หรือ 24 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิคฟิลม์บางและย้อมสีเจียมซ่าตามวิธี 2.6.3 นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมและระยะการเจริญในขั้นต่าง ๆ โดยเทียบกับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซล

2.8 การเปลี่ยนชนิดของเม็ดเลือดแดง เพื่อการเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมแบบต่อเนื่อง

การเปลี่ยนชนิดของเม็ดเลือดแดงทำได้ 2 วิธีคือ

2.8.1 กรณีที่จำนวนพาราไซต์ในเลือดเดิมสูงประมาณ 1 - 2 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างเช่นเลือดที่ติดเชื้อเป็นเม็ดเลือดแดงกรุปเอบี ต้องนำมาปั่นแยกให้ได้เฉพาะเม็ดเลือดแดง (เซลที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อพลาสโมเดียม) แล้วเจือจางด้วยเม็ดเลือดแดงกรุปบี (ที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.4) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ที่ประกอบด้วยซีรัมกรุปเอบี จนเซลซีสเปนชั้นสุดท้ายประมาณ 12 - 15 เปอร์เซ็นต์ นำไปเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องตามวิธีข้อ 2.7 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ ซึ่งมีซีรัมกรุปเอบีทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนพาราไซต์ในเลือดเพิ่มขึ้นจากเดิม 2 - 4 เท่า (ประมาณ 48 ชั่วโมง - 96 ชั่วโมง) เจือจางด้วยเซลเม็ดเลือดแดงกรุปบีใหม่ ทำเช่นนี้ประมาณ 4 - 5 ครั้ง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ที่ใช้เป็นชนิดที่ประกอบด้วยซีรัมกรุปบี ทำการเพาะเลี้ยงต่อไปตามวิธีข้อ 2.7

2.8.2 กรณีที่จำนวนพาราไซต์ในตัวอย่างเลือดที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมสูงตั้งแต่ 3 เปอร์-เซ็นต์ขึ้นไป อาจทำได้ง่ายขึ้นโดยเจือจางเซลด้วยเม็ดเลือดแดงกรุปบี และอาหารเลี้ยงเชื้อสม-บูรณ์ที่ใช้มีซีรัมกรุปบีได้เลย แต่การเจือจางเม็ดเลือดแดงจากตัวอย่างเลือดด้วยเม็ดเลือดแดงกรุปบี (ที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.4) ต้องใช้อัตราส่วน 1 : 3 เป็นอย่างน้อย ทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งได้เปอร์เซ็นต์ของพาราไซต์ในเลือดเพิ่มขึ้น แล้วเจือจางใหม่ วิธีนี้จะเปลี่ยนเป็นเม็ดเลือดแดงกรุปบี ซึ่งเป็นเซลเจ้าบ้านใหม่ทั้งหมดอย่างรวดเร็ว

2.9 การซินโครไนเซชัน (Synchronization) ของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม (Lambro และ Vanderberg, 1979)

เตรียมสารละลาย **5%** D-sorbitol (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปลอดเชื้อด้วยหม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมที่มีจำนวนพาราไซต์ในเลือดสูงอย่างน้อย 3 เปอร์เซ็นต์ และระยะการเจริญส่วนใหญ่เป็นระยะวงแหวนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นแยกอาหาร

เลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ออกให้หมดที่ 500g - 800 g นาน 5 นาที เซลที่ได้นำมาผสมกับ 5% D-sorbitol ด้วยอัตราส่วนของเม็ดเลือดแดงต่อ 5% D-sorbitol 1 ต่อ 5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ปั่นแยกส่วนของ 5% D-sorbitol ที่มีส่วนของเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysate) ออก นำเซลที่ได้ไปทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องตามวิธีข้อ 2.7 ทุกขั้นตอนต้องทำโดยเทคนิคที่ปลอดเชื้อ

2.10 การทดสอบความไวของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ต่อไพริเมธามีนและเมโธเทรเซท

2.10.1 การเตรียมสารละลายไพริเมธามีน

ละลายไพริเมธามีน 5 มิลลิกรัม ใน 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของกรดแลคติก 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปลอดเชื้อโดยผ่านมิลลิพอร์ฟิลเตอร์ขนาด 0.22 ไมครอน สารละลายไพริเมธามีนที่ได้ (ความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 70 องศาเซลเซียส สามารถใช้ได้มากกว่า 10 เดือน

2.10.2 การเตรียมสารละลายเมโธเทรเซท

ละลายเมโธเทรเซท 9 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดกลั่น 3 ครั้ง 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปลอดเชื้อโดยผ่านมิลลิพอร์ฟิลเตอร์ขนาด 0.22 ไมครอน จะได้สารละลายเมโธเทรเซทความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ ทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

2.10.3 วิธีทดสอบความไวของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม (sensitivity test) ต่อไพริเมธามีน และเมโธเทรเซท (Richards และ Muples, 1979)

จากตัวอย่างเลือดที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องตามวิธีข้อ 2.7 ซึ่งระยะการเจริญของพลาสโมเดียมส่วนใหญ่เป็นระยะวงแหวน นำมาปั่นแยกเอาอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ออก เจือจางด้วยเม็ดเลือดแดง (เตรียมจากวิธีข้อ 2.4) ให้ได้จำนวนพาราไซต์ในเลือดเป็น 1 เปอร์เซนต์ โดยคำนวณจากเปอร์เซนต์ของพาราไซต์ในสไลด์ฟิล์มบาง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ที่มีไพริเมธามีนหรือเมโธเทรเซท (ข้อ 2.10.1 และ 2.10.2) ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์แล้วเติมลง

ในตัวอย่างเลือดที่เตรียมไว้จนกระทั่งส่วนผสมสุดท้ายของเลือดเป็น 15% เซลซัสเปนชัน นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 2.7 โดยใช้จานเพาะเลี้ยงขนาด 10 35 มิลลิเมตร ทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ที่มียาผสมอยู่ด้วยนาน 48 ชั่วโมง (1 วงชีพ) จากนั้นปั่นแยกเอาอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ที่มียาออก ล้าง 3 ครั้ง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ที่ไม่มียา โดยเทคนิคที่ปลอดเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ที่ไม่มียาอีก 48 ชั่วโมง ติดตามการเจริญและตรวจสภาพเชื้อทุก ๆ 12 ชั่วโมง โดยเทคนิคฟิลม์บางและย้อมสีเจียมซ่าตามวิธี 2.6.3 นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซล

(ในการทดสอบความไวของพลาสโมเดียมควรเริ่มตั้งแต่พลาสโมเดียมอยู่ในระยะวงแหวนเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจำเป็นต้องทำซินโครไนเซชันเซลที่เพาะเลี้ยงตามวิธีข้อ 2.9 อย่างน้อย 1 ครั้ง แต่ถ้าจะให้ได้ระยะวงแหวนเกือบ 100 เปอร์เซ่นต์ ควรทำซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องต่อไปจนถึงช่วงที่พลาสโมเดียมเป็นระยะวงแหวนเกือบทั้งหมด จึงนำมาทดสอบความไวของยา)

2.11 <u>วิธีนับเม็ดเลือดแดงและจำนวนพลาสโมเดียม</u>

จำนวนเม็ดเลือดแดงซึ่งติดเชื้อและไม่ติดเชื้อพลาสโมเดียมในเซลซึ่งเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง สามารถนับจำนวนได้โดยนำมาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ใช้ปิเปตต์สำหรับนับเม็ดเลือดแดงชนิด Thoma Type ดูดเม็ดเลือดแดงจากสารตัวอย่างถึงขีด 0.5 แล้วดูดสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ถึงขีด 101 ผสมเลือดให้เข้ากัน นำไปหยดลงบนฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) 1 หยด ทิ้งไว้ 2 - 3 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงกระจายตัวสม่ำเสมอ และนอนกันเรียบร้อยเสียก่อน นำไปนับจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยใช้กล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 10 x 40 จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้จาก ฮีโมไซโตมิเตอร์เป็นจำนวนเซลต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (จะใช้เวลาทั้งหมด 5 นาที)

เมื่อต้องการเทียบว่ามีจำนวนพลาสโมเดียมเท่าไร ทำได้โดยนับจำนวนพลาสโมเดียมเมื่อใช้เทคนิคฟิล์มบางและย้อมด้วยสีเจียมซ่า นับจำนวนพลาสโมเดียมต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซล เมื่อทราบจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดจากตัวอย่าง จะสามารถคำนวณกลับ

เป็นจำนวนพลาส์โมเดียม

2.12 วิธีการนำ ^{14}C - pyrimethamine เข้าสู่เม็ดเลือดแดงซึ่งติดเชื้อและไม่ติดเชื้อพลาส์โมเดียม ฟาลซิปารัม ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

2.12.1 การเตรียม Bray's scintillation fluid (Bray, 1960)

ชั่งแนบธาลีน (naphthalene) 120 กรัม, PPO 8 กรัม, POPOP 0.4 กรัม เติมเมธานอล 200 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร และเอทธาลีนไกลคอล (ethyleneglycol) 40 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 2 ลิตรด้วย ไดออกแซ็น (dioxane) คนให้เข้ากันโดยใช้แท่งกวนแม่เหล็ก เก็บไว้ในขวดสีชาในห้องเย็น (อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส)

2.12.2 วิธีศึกษาการนำ ^{14}C - pyrimethamine เข้าสู่พลาส์โมเดียม ฟาลซิปารัม ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

ทำการ เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ซึ่งประกอบด้วย ^{14}C - pyrimethamine ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อตามเวลาที่ต้องการ นำไปปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ซึ่งมี ^{14}C - pyrimethamine ที่เหลือจากการนำเข้าเซลออก ปั่นล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เติม 0.5% กรดแลคติค 2.5 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร จุ่มลงในน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ตกตะกอนโปรตีนที่เหลือด้วย 5% กรดไตรคลอโรอะซีติค 2.5 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ปั่นแยกและดูดเอาน้ำใสส่วนบน 250 ไมโครลิตร ไปวัดจำนวน ^{14}C - pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลโดยเติม Bray's scintillation fluid 5 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร แล้วนับกัมมันตรังสีด้วยเครื่อง Packard PL Tricarb Liquid Scintillation Counter โดยมี ^{14}C - Toluene เป็น external standare

2.13 วิธีศึกษาการนำไพริเมธามีนเข้าสู่พลาส์โมเดียม ฟาลซิปารัม ช่วงสั้น

2.13.1 การเตรียมสารละลาย 28% ฟิคอล

ละลายฟิคอล - 400 (Ficoll - 400) ในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาให้

มีความเข้มข้น 28 กรัม ต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.13.2 การเตรียมเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม

ใช้พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงตามวิธีข้อ 2.7 จำนวน 10 จาน (ขนาด 15 x 60 มิลลิเมตร) ซึ่งมีจำนวนพาราไซต์ในเลือดสูงอย่างน้อย 10 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนจานเพาะเลี้ยง 10 ใบ นำมารวมกัน ปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ออก ทำเป็น 50% เซลซัสเป็นซันด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ค่อย ๆ เติมลงไปในสารละลาย 28% ฟิคอลด้วยอัตราส่วนของ 50% เซลซัสเป็นซันต่อสารละลาย 28% ฟิคอล 1 ต่อ 1 นำไปปั่นที่ 9,000g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียมระยะโทรโฟซอยท์ระยะปลาย และระยะไซซอนท์ออก ค่อย ๆ ดูดชั้นเลือดส่วนนี้ถ่ายใส่หลอดเซนติฟิวก์ นำไปปั่นล้างเอาฟิคอลออกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา 3 ครั้ง ที่ 800 g นาน 5 นาที ครั้งสุดท้ายทำเป็น 50% เซลซัสเปนซันในอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์

2.13.3 วิธีศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C - pyrimethamine

ใช้สารตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 2.13.2 ปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ 0.7 ลูกบาศก์เซนติเมตร เริ่มปฏิกิริยาการนำเข้าของไพริเมธามีนโดยเติม ^{14}C - pyrimethamine (ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ ในสารละลาย 0.5% กรดแลคติค) 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จับเวลาตามที่ต้องการ (2, 4, 6, 10, 20 และ 30 นาที) นำไปปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ และ ^{14}C - pyrimethamine ที่ไม่ถูกนำเข้าสู่เซลออก จากนั้นปั่นล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เติม 0.5% กรดแลคติค 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จุ่มลงในน้ำเดือด นาน 1 นาที ตกตะกอนโปรตีนที่เหลือด้วย 5% กรดไตรคลอโรอะซีติค 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปั่นแยกและดูดเอาน้ำใส่ส่วนบน 250 ไมโครลิตร ไปวัดจำนวน ^{14}C - pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลโดยเติม Bray's scintillation fluid 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนับกัมมันตรังสีด้วยเครื่อง Packard PL Tricarb Liquid Scintillation Counter โดยมี ^{14}C-Toluene เป็น external standard

การทดลองทุกครั้งต้องวัดปริมาณของการนำเข้าของ ^{14}C - pyrimethamine ต่อ 50% เซลซัสเปนชันของเม็ดเลือดแดงไม่ติดเชื้อ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ควบคู่ไปด้วยกัน

2.14 <u>การสกัดเอนไซม์จากพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม</u>

2.14.1 <u>เตรียมสารละลาย 0.15% แซโปนิน (saponin)</u>

ละลายแซโปนิน 0.15 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา 100 ลูกบาศก์-เซนติเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิแช่แข็ง ได้มากกว่า 1 เดือน

2.14.2 <u>เตรียมสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์-100 (Triton X-100)</u>

ผสมไตรตอนเอกซ์ - 100 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.2 โมลาร์ 2-เมอร์แคพโตเอธานอล ปริมาตรสุดท้าย 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.14.3 <u>วิธีสกัดเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม</u>

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสโมเดียมตามข้อ 2.7 จนได้ปริมาณมากพอ จำนว จำนวน 10 จาน (ขนาด 15 x 60 มิลลิเมตร) จำนวนพาราไซต์ในเลือดสูง 10 เปอร์เซนต์ขึ้นไป นำมารวมกันและปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ออก ทำลายเซลเม็ดเลือดแดงโดยการผสมเม็ดเลือดแดง (เซลติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ) ด้วยสารละลาย 0.15% แซโปนิน อัตราส่วน 1 1 : 2 อุ่นในอ่างปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้พาสเจอร์ ปิเปตต์ ผสมให้เข้ากันตลอดเวลานาน 10 นาที แล้วปั่นล้างส่วนของเม็ดเลือดแดงแตกออก 2 ครั้ง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ส่วนที่ได้จะเป็นพลาสโมเดียมที่ปราศจากเซลเจ้าบ้าน นำไปสกัดเอนไซม์ด้วยการเติมสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์ 100 ที่เย็น เขย่าด้วยเครื่องเขย่าวอร์เทค (vortex mixer) ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (ไม่ควรเติมสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์ - 100 มากกว่า 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพราะจะไปเจือจางเอนไซม์มากเกินควร) นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ Beckman ที่ 9,000g นาน 10 นาที ส่วนของน้ำใสส่วนบนนำไปวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

การวัดเอนไซม์แอคติวิตี้ในพลาสโมเดียมระยะต่าง ๆ ทำได้โดยนำเซลเพาะเลี้ยงมาทำซินโครไนเซซัน ตามวิธีข้อ 2.9 แล้วเลือกระยะต่าง ๆ ของพลาสโมเดียม (โดยอาศัยเทคนิคฟิล์มบางและการย้อมสีเจียมซ่าเช่นกัน) มาสกัดเอาเอนไซม์เพื่อวัดแอคติวิตี้ ตามวิธีที่กล่าวแล้วข้างต้น

2.15 <u>การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเฟต รีดักเตส</u>

2.15.1 <u>วิธีเตรียมไดไฮโดรโฟเลต</u> **(Futterman, 1957 and Blakley, 1960)**

ละลายกรดแอสโคบิค 1 กรัม ในน้ำกลั่น 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับเป็น 6.0 ด้วยสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ **เติมสารละลายกรดโฟลิค** (กรดโฟลิค 38.2 กรัมละลายในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 ลูกบาศก์เซนติ - เมตร) และน้ำกลั่นจนครบ 10 ลูกลาศก์เซนติเมตร จะได้เป็นสารละลาย 10% โซเดียมแอสคอร์-เบต จากนั้นค่อย ๆ เติมโซเดียมไดไธโอไนท์ลงไปทีละน้อย จนกระทั่งครบ 400 มิลลิกรัม เขย่าจนละลายหมด นำไปจุ่มลงในอ่างน้ำแข็ง เขย่าจนกระทั่งอุณหภูมิของสารละลายลดต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เติมสารละลาย 1 โมลาร์ กรดเกลือจน pH เท่ากับ 2.8 ในขั้นนี้จะได้ตะกอนไดไฮโดรโฟเลตตกลงมาอย่างสมบูรณ์ สารละลายที่ได้นำไปปั่นแยกเอาตะกอนออกที่ 1,000 g อุณหภูมิศูนย์องศาเซลเซียสนาน 5 นาที ตะกอนไดไฮโดรโฟเลตที่ได้นำมาทำเป็นซัส-เปนชันด้วยสารละลาย 10% โซเดียมแอสคอร์เบต 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับ pH เป็น 5 - 6 ด้วยสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วตกตะกอนอีกครั้งหนึ่ง โดยการลดลงจนถึง 2.8 ด้วยสารละลาย 1 โมลาร์ กรดเกลือ ผลึกไดไฮโดรโฟเลตที่ได้นำไปปั่นแยกและล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย 0.001 โมลาร์กรดเกลือที่เย็น เก็บผลึกนี้ไว้ใน 0.001 โมลาร์ กรดเกลือ ภายใต้สภาวะกาซไนโตรเจนและแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (เก็บไว้ได้นานมากกว่า 3 เดือน)

สับสเตรทสำหรับวัดแอคติวิตี้ของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ก่อนนำมาใช้จะต้องทดสอบคุณสมบัติของไดไฮโดรโฟเลตทุกครั้ง ทำได้โดยการนำผลึกไดไฮโดรโฟเลตมาละลายใน 0.05 โมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.1 โมลาร์ของ 2-เมอร์แคพโต-

เอธานอลผสมอยู่ด้วย ปรับให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของไดไฮโดรโฟเลตเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ โดยอาศัยค่า molar extinction coefficient ที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร จะเป็น 28 มิลลิโมลาร์

[stamp]

1..5.2 วิธีวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

สารละลายที่ใช้วัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ประกอบด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.5, 0.1 มิลลิโมลาร์ NADPH, 0.05 มิลลิโมลาร์ไดไฮโดรโฟเลต, 150 มิลลิโมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ และ 1 มิลลิโมลาร์ ของ 2-เมอร์แคพโตเอธานอล อุ่นโดยผ่านน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รอบคิวเวตต์นาน 5 นาที เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมเอนไซม์ ปริมาตรสุดท้ายของการวัดเอนไซม์แอคติวิตี้เท่ากับ 1 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร (เวลาที่เริ่มใส่เอนไซม์และเริ่มวัดแอคติวิตี้ควรน้อยกว่า 15 วินาที)

แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส วัดได้โดยอาศัยเครื่องมือ Beckman spectrophotometer ซึ่งดูการลดลงของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เมื่อ NADPH และไดไฮโดรโฟเลตถูกเปลี่ยนเป็น NADPHและเตตระไฮโดรโฟเลต ตามลำดับ (Perkins และคณะ , 1967) ซึ่งค่า molar extinction coefficient ของ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรจะเป็น 6.4 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์

แอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์แสดงเป็นไมโครโมล ของ NADPH /นาที/ มิลลิกรัมโปรตีนที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ยูนิตของเอนไซม์แอคติวิตี้คือจำนวนเอนไซม์ที่จะไปเร่งให้เกิดปฏิกิริยารีดิวส์ไดไฮโดรโฟเลต เป็นเตตระไฮโดรโฟเลต 1 ไมโคลโมลภายใต้สภาวะของสารละลายมาตรฐานดังกล่าว (pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

2.16 การเตรียมเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากตับหนู (McCullough, 1969 และ 1971)

2.16.1 การเตรียมคอลัมน์เซฟาเดกซ์ G-75

แช่เซฟาเดกซ์ G – 75 ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 90 - 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ เทน้ำใส่ส่วนบนออก

ถ่ายเม็ดเจลลงใน 0.05 โมลาร์ ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.1 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ คนเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลตกตะกอน เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันนี้อย่างน้อย 3 ครั้ง นำมาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 2.5 x 80 เซนติเมตร ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันนี้ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเดกซ์ G – 75 นาน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยอัตราไหล 2 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที แรงดันสารละลาย 35 เซนติเมตรของน้ำเพื่อให้ได้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเดกซ์แตรน 3 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ก่อนใช้

2.16.2 การสกัดเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเต๊ส จากตับหนู

ใช้ตับหนูสดหรือที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนเริ่มอ่อนตัว) 6 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ เติมน้ำเย็น 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร บดให้ละเอียดด้วยเครื่อง MSE homogenizer ความเร็วประมาณ 5,000 รอบต่อนาที แล้วปรับให้ได้ pH เท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลาย 1 โมลาร์กรดเกลือ ปั่นแยกที่ความเร็ว 27,000g นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส น้ำส่วนบนนำมากรองผ่านผ้ากรอง สารละลายที่ได้แช่ไว้ในอ่างน้ำแข็ง แล้วค่อย ๆ เติมผงละเอียดของแอมโมเนียมซัลเฟต จนได้เป็นความอิ่มตัว 0-45 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ความเร็ว 27,000g นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เอาน้ำใสส่วนบนมาเติมผละเอียดของแอมโมเนียมซัลเฟต จนได้เป็นความอิ่มตัวเป็น 45-85 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ความเร็ว 27,000g นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตะกอนที่ได้นำไปละลายใน 0.05 โมลาร์ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ แล้วนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ G – 75 ที่เตรียมไว้ เก็บแฟรคชั่น (fraction) 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.12.2 แฟรคชั่นที่มีเอนไซม์แอคติวิตี้นำมารวมกันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.17 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

2.17.1 สารละลายฟีนอลรีเอเจนท์

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม, โซเดียมโมลิบเดท 12.5 กรัม และน้ำกลั่น

50 ลูกบาศก์เซนติเมตร รีฟลักซ์ด้วยไฟอ่อน ๆ 2 ชั่วโมง แล้วเติมลิเทียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บในขวดสีชา

2.17.2 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

เป็นส่วนผสมของ 1% คิวปริคซัลเฟต 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร, 1% โปแตส-เซียม โซเดียมทาร์เทรท 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ 2% โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.17.3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (1 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร)

สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้มี 2 ชนิด คือ 1% BSA (grade A) ใน 100 มิลลิโมลาร์ ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 1% BSA (grade A) ในสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์ - 100

2.17.4 วิธีวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1974)

ใช้สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานโปรตีน 0.1 ลูกบาศก์เซนติ-เมตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (ข้อ 2.17.2) 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนท์ (ข้อ 2.17.1) 0.3 ลูกบาศก์เซนติ - เมตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที วัดการดูดแสงที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร อ่านปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นจากสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร

(สารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างที่อยู่ในสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์-100 ปฏิกิริยาสุดท้ายของการหาโปรตีนจะเกิดตะกอนขาวขุ่นขึ้น จำเป็นต้องนำไปปั่นเพื่อเอาน้ำใสส่วนบนมาวัดการดูดแสง)

2.18 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม

2.18.1 การเตรียมคอลัมน์เซฟาเดกซ์ G - 200

แช่เซฟาเดกซ์ G - 200 ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน หรือที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวสมบูรณ์ จากนั้นถ่ายเม็ดเจลลงใน 0.05 โมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ คนเบา ๆ และตั้งทิ้งไว้ให้เจลตกตะกอน เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันนี้อย่างน้อย 3 ครั้ง นำมาบรรจุลงในคอลัมน์แล้ว ขนาด 2.5 x 100 เซนติเมตร ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันนี้ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเดกซ์ G - 200 อีก 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยอัตราการไหล 18 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อชั่วโมง แรงดันสารละลาย 14 เซนติเมตรของน้ำ เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ก่อนใช้ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารผสมบลูเดกซ์แตรน 3 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.18.2 การหาน้ำหนักโมเลกุล

ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานคือ แคทตาเลส (น้ำหนักโมเลกุล 240,000 ดาลตัน) แอลโดเลส (น้ำหนักโมเลกุล 158,000 ดาลตัน) แอลบูมิน (น้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน) และไมโอโกลบิน (น้ำหนักโมเลกุล 16,900 ดาลตัน) ผ่านลงไปในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ G - 200 ทีละครั้ง เก็บแฟรคชั่นทุก ๆ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร วัดปริมาตรของเอนไซม์ที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ โดยวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำไปคำนวณค่า K_{av} ดังนี้

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

V_e คือ elution volume ของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์

V_o คือ void volume ของสารละลายบลูเดกซ์แตรน

V_t คือ ปริมาตรทั้งหมด (total bed volume)

ผ่านละลายเอนไซม์ที่จะหาน้ำหนักโมเลกุล ลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ G - 200

(เตรียมโดยวิธีจากข้อ 2.14.3) แล้วเก็บแฟรคชันทุก 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปวัดแอคติวิตี้ตามวิธีข้อ 2.15.2 เพื่อหา elution volume ของเอนไซม์ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ คำนวณค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น

2.19 <u>การหาค่า K_m ต่อสับสเตรทไดไฮโดรโฟเลต และค่า K_i ของไพริเมธามีนและเมโธ - เทรเซทต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส</u>

หาค่า K_m โดยอาศัยวิธีของ Lineweaver-Burk ทำได้โดยการพลอตระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยากับส่วนกลับของสับสเตรทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

การหาค่า K_i ทำได้โดยอาศัย Lineweaver-Burk plot เมื่อความเข้มข้นของไพริเมธามีนหรือเมโธเทรเซทมีค่าคงที่

2.20 <u>การหาค่า 50% Inhibition ของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส</u>

ทำได้โดยใช้ไพริเมธามีนความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 5 x 10^{-5}, 10^{-4} โมลาร์ ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ซึ่งเตรียมได้จากตับหนูและพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมไอโซเลท K_1 ที่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์เท่ากัน วัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่เหลือจากการยับยั้งของไพริเมธามีน แล้วนำไปหาค่า ID_{50} โดยการเขียนกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตี้ของเอนไซม์กับความเข้มข้นของไพริเมธามีนที่ใช้

ค่า ID_{50} นี้หมายถึงความเข้มข้นของไพเมธามีนที่ทำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ลดลงจากแอคติวิตี้เริ่มต้น 50 เปอร์เซนต์