หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

การดำเนินการทดลอง

1. การผ่านทอดเชื้อ Plasmodium berghei ไว้ในหนูไมซ์

1.1 การเก็บเลือดจากหนูที่ติดเชื้อ และเจือจางให้ได้จำนวนปาราสิตตามต้องการ

นำหนูไมซ์ที่ติดเชื้อ P. berghei และมีระดับปาราสิตในเลือดอยู่ระหว่าง 40-45 % มาทำให้สลบด้วยอีเทอร์ ผ่าตัดดูดเลือดทั้งหมดจากตัวหนูทางบราเคียลเวน (brachial vein) โดยใช้เฮพพาริน (heparin) ขนาด 0.1 มิลลิลิตรต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ป้องกันการแข็งตัว โดยวิธีนี้จะได้เลือดทั้งหมดประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อหนูติดเชื้อ 1 ตัว นำเลือดที่ได้มานับจำนวนเม็ดเลือดแดงด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ และหาระดับปาราสิตในเลือดนั้น โดยการนับจากแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง เพื่อนำมาคำนวณหาจำนวนปาราสิตทั้งหมดต่อเลือด 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเจือจางเลือดนั้นด้วย 1% โซเดียมซิเตรทในนอร์มอลซาไลน์ เพื่อให้ได้จำนวนปาราสิตเป็น 2.5×10^7 เซลล์ต่อเลือด 0.05 มิลลิลิตร และนำเชื้อนี้ไปฉีดเข้าท้องหนูไมซ์กลุ่มละ 5 ตัว ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร

ทำการผ่านทอดเชื้อ P. berghei ในหนูไมซ์ทุก ๆ 5 วัน

1.2 วิธีเตรียมสารละลายโซเดียมซิเตรท 1 % ในนอร์มอลซาไลน์

ส่วนประกอบ :-

sodium citrate	1.0	กรัม
sodium chloride	0.85	กรัม
น้ำกลั่น		

008605

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น จนได้สารละลายทั้งหมด 100 มิลลิลิตร จะได้ 0.85 % ซาไลน์ หรือ นอร์มอลซาไลน์ ชั่งโซเดียมซิเตรท 1.0 กรัม ใส่คนโทวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยนอร์มอลซาไลน์จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ก็จะได้สารละลายโซเดียมซิเตรท 1 % ในนอร์มอลซาไลน์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 120 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

2. การติดตามระดับปาราสิตในหนูไมซ์ที่ติดเชื้อ P. berghei

หลังจากฉีดเชื้อ P. berghei เข้าในท้องหนูไมซ์จำนวน 2.5×10^7 เซลล์ต่อเลือด 0.05 มิลลิลิตรแล้ว ได้ติดตามการเพิ่มระดับปาราสิตในหนูไมซ์ โดยการขลิบหางหนู และทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางแล้วย้อมด้วยสีจิมซา และนับจำนวนปาราสิตทุกวันจนกระทั่งระดับของปาราสิตสูงถึง 40 - 45 % จึงเก็บเลือดจากหนูที่ติดเชื้อเหล่านี้ไว้ เพื่อเตรียมเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว

2.1 วิธีทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง และย้อมด้วยสีจิมซา

หยดเลือดที่ได้จากหนูติดเชื้อลงบนสไลด์ที่แห้งและสะอาด เกลี่ยให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ด้วยขอบสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาจุ่มในแอบโซลูทเม็ททิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 2 นาที ผึ่งให้แห้งอีกครั้งจึงย้อม

ผสมสีจิมซา โดยใช้ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่าง 6.8 จำนวน 10 มิลลิลิตรต่อสี 1 มิลลิลิตรให้เข้ากันดี แล้วหยดสีลงบนสไลด์ให้ท่วมบริเวณที่จะย้อม ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที จึงล้างสีออกด้วยน้ำประปา จนแผ่นฟิล์มเลือดเป็นสีม่วงอมชมพู ผึ่งให้แห้ง และเก็บไว้นับจำนวนปาราสิตในเม็ดเลือดต่อไป (Department of the Army Technical Mannual, 1961; Emmel & Cowdry, 1964.)

2.2 การเตรียมสีจิมซา

ส่วนประกอบ :-	ผงสีจิมซา	0.6	กรัม
	กลีเซอรอล	50.0	มิลลิลิตร
	แอบโซลูทเม็ททิลแอลกอฮอล์	50	มิลลิลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีเตรียม

1. บดผงสีจิมซา กับ กลีเซอรอลทีละน้อยให้ละเอียดในโกร่งจนเข้ากันและเป็นเนื้อเดียวกันดี ทำเช่นนี้จนผงสีหมด

2. ล้างสีที่เหลือติดโกร่งด้วยกลีเซอรอล แล้วเทรวมใส่ขวดแก้วทรงกรวย

3. นำสีไปอุ่นในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 55-60°C นาน 6-8 ชั่วโมง ถอยเขย่าขวดให้สีอุ่นทั่วกันทุกครึ่งชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมแอบโซลูท เม็ททิลแอลกอฮอล์ และเขย่าให้เข้ากัน

5. ปิดปากขวดทรงกรวย แล้วนำสีไปอบที่อุณหภูมิ 37°Cในตู้อบเป็นเวลา 2 สัปดาห์

6. กรองสารละลายของสีใส่ขวดสีน้ำตาล และเก็บไว้ใช้ต่อไป

3. การเก็บเลือดติดเชื้อ <u>P. berghei berghei</u> โดยใช้ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ เป็นไครโอโปรเท็กแตนท์

3.1 วิธีที่ 1 Pavanand et al (1974)

นำเลือดหนูที่มีเชื้อมาเลเรีย 13 มิลลิลิตรมาปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นเม็ดเลือดไว้แล้ว ล้างด้วยน้ำยาสเตอไรไทโรด (Sterile Tyrode's solution) 2 ครั้ง โดยเติมน้ำยาไทโรดลงในส่วนเม็ดเลือดจำนวน 8 เท่าตัว เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำมาปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากที่ได้ล้างเม็ดเลือดแล้วจึงนำมาเติม 15% ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ในน้ำยาไทโรดลงไป 4 เท่าตัว โดยเติมทีละหยดพร้อม ๆ กับเขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แบ่งเลือดนี้ใส่หลอดแก้วเล็ก ๆ ที่มีปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร หลอดละประมาณ 0.06 มิลลิลิตร ทั้งหมด 143 หลอด ปิดปลายหลอดแก้วทั้งสองด้านให้สนิทด้วยการลนไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ และนำหลอดแก้วตัวอย่างเลือดเหล่านี้เก็บใส่ถังที่บรรจุไนโตรเจนเหลวทันที

3.1.1 การเตรียมน้ำยาสเตอไรไทโรด

ส่วนประกอบ :-	NaCl	8.00	กรัม
	KCl	0.20	กรัม
	$CaCl_2$	0.20	กรัม
	$MgCl_2$	0.10	กรัม
	NaH_2PO_4	0.50	กรัม
	glucose	0.05	กรัม
	$NaH\ CO_3$		สำหรับฉีด

ที่เข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1.33 มิลลิลิตร

ชั่งสารทุกตัวนอกจากโซเดียมไบคาร์บอเนต แล้วนำมาละลายรวมกันด้วยน้ำกลั่นชนิดกลั่น 3 ครั้ง ให้ได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นลงจึงเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต

3.2 วิธีที่ 2 Phillip & Wilson (1978)

นำเลือดหนูที่ติดเชื้อ P. berghei จำนวน 6 มิลลิลิตร มาเติมน้ำยา 20 % ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ ในฟอสเฟทบัฟเฟอร์ซาไลน์ ลงไป 1 เท่าตัว โดยเติมทีละหยดพร้อมกับคนให้เข้ากันด้วยสเตอไรปาสเตอร์ปิเปต แบ่งเลือดนี้บรรจุใส่หลอดแก้วเล็ก ๆ เช่นเดียวกับใน 3.1 ให้ได้ทั้งหมด 130 หลอด แล้วนำไปเก็บไว้ในถังที่บรรจุไนโตรเจนเหลวทันที

3.2.1 การเตรียมฟอสเฟทบัฟเฟอร์ซาไลน์

ส่วนประกอบ :-	$Na_2HPO_4.2H_2O$	2.106 กรัม
	NaH_2PO_4	8.733 กรัม
	NaCl	4.500 กรัม

นำสารทุกตัวมาละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับใน 3.1.1

4. การเก็บเลือดติดเชื้อ P. berghei โดยใช้กลีเซอรอลเป็นไครโอโปรเท็กแตนท์

4.1 วิธีที่ 3 Phillip & Wilson (1978)

นำเลือดหนูที่มีเชื้อมาเลเรียจำนวน 6 มิลลิลิตร มาเติมน้ำยากลีเซอรอล 1 เท่าตัว คนเบา ๆ ให้เข้ากันด้วยสเตอไรปาสเตอร์ปิเปต ตั้งทิ้งไว้ที่ 4°C โดยแช่ในน้ำแข็งประมาณครึ่งชั่วโมง เพื่อให้กลีเซอรอลซึมผ่านเข้าเม็ดเลือดและเซลล์ปรสิต แล้วจึงแบ่งเลือดใส่หลอดแก้วเล็ก ๆ ให้ได้ 130หลอด ดังใน 3.1 และนำหลอดแก้วตัวอย่างเลือดเหล่านี้ไปเก็บในถังที่บรรจุไนโตรเจนเหลวทันที

4.1.1 การเตรียมน้ำยากลีเซอรอล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนประกอบ :-	glycerol	38.00	กรัม
	sorbitol	2.90	กรัม
	NaCl	0.63	กรัม

นำสารทั้งหมดมาละลายรวมกันด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านมิลลิพอร์เมมเบรน (millipore membrane) ที่มีรูขนาด 0.22 μ

4.2 วิธีที่ 4 Rowe, Dexter & Kellner (1968)

นำเลือดหนูที่ติดเชื้อ P. berghei มา 12 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10นาที ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แยกเอาเม็ดเลือดมาเติมสารละลายกลีเซอรอลลงไป 1 เท่าตัว คนเบา ๆ ให้เข้ากันด้วยสเตอไรปาสเตอร์ปิเปต ตั้งทิ้งไว้ที่ 4°C แล้วจึงแบ่งใส่หลอดแก้วเล็ก ๆ ให้ได้ 116หลอด และนำไปเก็บไว้ในถังที่บรรจุไนโตรเจนเหลว เช่นเดียวกับ 4.1

4.2.1 การเตรียมสารละลายกลีเซอรอล

ส่วนประกอบ :-	glycerol	28.0 %
	sorbital	3.0 %
	NaCl	0.65 %

เตรียมโดยเติม 28.0 มิลลิลิตรของกลีเซอรอลลงใน 72.0 มิลลิลิตร ของสารละลาย 4.2 % sorbital ใน 0.9% NaCl คนให้เข้ากัน และทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีกรองดังใน 4.1.1

5. การนำเชื้อมาเลเรียออกจากไนโตรเจนเหลว และทำให้เหลวตัว

การนำเชื้อมาเลเรียออกจากถังบรรจุไนโตรเจนเหลว เพื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอด หรือทดสอบสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ทำโดยนำหลอดแก้วที่บรรจุเชื้อมาเลเรียออกจากถังบรรจุไนโตรเจนเหลว และจุ่มลงในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C ทันที เพื่อให้เกิดการเหลวตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะลดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง และเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเชื้อมาเลเรีย

6. การทดสอบความอยู่รอด ของเชื้อ P. berghei ภายหลังจากถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว

หลังจากเก็บเชื้อมาเลเรียโดยวิธีทั้ง 4 ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวแล้ว ทุก ๆ 2 สัปดาห์เป็นเวลา 6 เดือน ได้นำเชื้อมาเลเรียทั้ง 4 แบบนั้นมาทดสอบความอยู่รอด โดยการนำเชื้อแต่ละแบบมาฉีดเข้าหนูถีบจักรทางช่องท้องตัวละ 0.1 มิลลิลิตรแล้วติดตามดูลาเทนท์พีเรียด กับการเปลี่ยนแปลงระดับของปาราสิตในโฮสต์ เทียบกับโฮสต์ที่ได้รับเชื้อที่เติมไกรโอโปรเท็กแตนท์แล้ว แต่ยังไม่ผ่านการเก็บซึ่งให้เป็นกลุ่มควบคุม

6.1 **การหาค่าลาเทนท์พีเรียด**

หลังจากฉีดเชื้อมาเลเรียเข้าช่องท้องหนูถีบจักรแล้วทำฟิล์มเลือดชนิดบาง ย้อมสีและนับเปอร์เซ็นของปาราสิตในเม็ดเลือดหนูทุก ๆ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งระดับปาราสิตในเลือดหนูเพิ่มถึง 2 % ระยะเวลาตั้งแต่ฉีดเชื้อมาเลเรียเข้าช่องท้องหนูถีบจักร จนกระทั่งระดับปาราสิตในเลือดหนูสูงถึง 2 % ถือเป็นลาเทนท์พีเรียด (Warhurst and Folwell, 1968)

6.2 การศึกษาระดับปาราสิตในโฮสต์

ติดตามการเพิ่มระดับของปาราสิตในหนูไม่ทุกวัน หลังจากฉีดเชื้อมาเลเรียเข้าทางช่องท้องจนกระทั่งหนูตาย โดยใช้เลือดจากหางหนูและทำฟิล์มเลือดบางย้อมสีแล้วนับจำนวนปาราสิตที่พบต่อ 10,000 เซลของเม็ดเลือดแดง

7. การทดสอบสมรรถภาพของเอ็นไซม์

หลังจากเก็บเชื้อมาเลเรียโดยวิธีทั้ง 4 ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวแล้ว ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 เดือน ได้นำเชื้อมาเลเรียทั้ง 4 แบบ นั้นมาทดสอบสมรรถภาพของเอ็นไซม์ แลกเตทดีไฮโดรจีเนส โดยวิธีสตาร์ชเจลอีเล็คโตรฟอรีซิส และทุกครั้งที่ทดสอบ จะใช้เลือดของหนูปรกติเป็นตัวเปรียบเทียบ

7.1 วิธีเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับอีเล็กโตรฟอรีซิส

การเตรียมบัฟเฟอร์นี้ใช้ตามวิธีของ Carter & Walliker (1977) บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้มี 4 แบบ คือ

1. สต๊อกบัฟเฟอร์ คือ 0.45 M Tris กับ 0.16 M citric acid ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 ซึ่งเตรียมโดยใช้ Tris 53 กรัม citric acid 33 กรัม เติมน้ำให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. เจลบัฟเฟอร์ คือ สต๊อกบัฟเฟอร์ที่ทำให้เจือจาง 25 เท่า เตรียมโดยใช้สต๊อกบัฟเฟอร์ 1 ส่วน น้ำกลั่น 24 ส่วน

3. อีเล็กโตรดบัฟเฟอร์ คือ สต๊อกบัฟเฟอร์ที่ทำให้เจือจาง 2 เท่า เตรียมโดยใช้สต๊อกบัฟเฟอร์ 1 ส่วน น้ำกลั่น 1 ส่วน

4. เอ็นไซม์แอสเสบัฟเฟอร์ คือ tris-HCl ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 เตรียมโดยใช้ tris 6 กรัม ละลายน้ำประมาณ 800 มิลลิลิตร แล้วปรับความเป็นด่างให้ได้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N HCl ซึ่งจะใช้ประมาณ 30 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

7.2 การเตรียมสตาร์ชเจล สำหรับอีเล็กโตรฟอรีซิส

สตาร์ชเจลสำหรับอีเล็กโตรฟอรีซิส เตรียมโดยใช้:-

แป้งไฮโดรโลส์สำหรับอีเล็กโตรฟอรีซิส	23.5	กรัม
เจลบัฟเฟอร์	250.0	มิลลิลิตร

นำแป้งและบัฟเฟอร์มาใส่ลงในขวดแก้วทรงกรวยที่มีแขนด้านข้างขนาด 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มขณะที่คนเขย่าขวดให้แป้งได้รับความร้อนทั่วกันอยู่ตลอดเวลา จนกระทั่งแป้งใสและเดือด แล้วนำมาดูดอากาศออก โดยใช้ปั๊ม - สำหรับดูดอากาศ เมื่อดูดอากาศออกหมดแล้วค่อย ๆ เทแป้งลงในแม่พิมพ์ขณะที่แป้งยังร้อนอยู่ โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 °C นานอย่างน้อย 3 ชั่วโมงก่อนใช้ ทั้งนี้เพื่อให้แป้งแข็งตัวเท่ากันทั่วทั้งแผ่น และมีอุณหภูมิต่ำ 2-4 °C เมื่อใส่ตัวอย่างเอ็นไซม์ลงไปในเจล เอ็นไซม์จะได้ไม่ถูกทำลาย

7.3 การเตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับอีเล็กโตรฟอรีซิส

นำเชื้อมาเลเรียที่ต้องการดูสมรรถภาพของเอ็นไซม์หยดลงไปในถาดหลุมอุณหภูมิ 2-4 °C แล้วทำเซลล์ให้แตกโดยหยดน้ำกลั่นลงไป 1 หยด คนให้ทั่ว ก็จะได้สารละลายเอ็นไซม์ที่มีทั้งเอ็นไซม์ของเลือดหนู และเอ็นไซม์ของปาราสิตสำหรับอีเล็ก-โตรฟอรีซิส

7.4 วิธีใส่เอ็นไซม์ตัวอย่างลงไปในแผ่นสตาร์ชเจล

นำแผ่นเจลที่เตรียมไว้ในข้อ 7.2 มาเจาะให้เป็นร่องด้วยใบมีดโกนอย่างบางขนาด 1 x 1 เซ็นติเมตร โดยเจาะเจลละ 5 ช่อง แต่ละช่องห่างกันประมาณเกือบ 1 นิ้ว ในแนวขนานกับขอบของแม่พิมพ์ ห่างจากขอบของแม่พิมพ์ 3 นิ้ว (แนวนี้ใช้เป็นแนวเริ่มต้น)

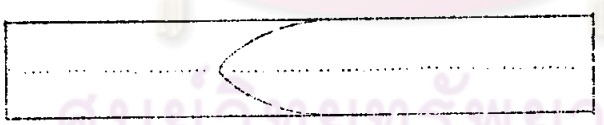
เมื่อเจาะเจลเสร็จแล้ว นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท ขนาด 0.5 x 1.0 เซ็นติเมตร จุ่มลงในสารละลายเอ็นไซม์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 7.3 ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้เอ็นไซม์ซึมเข้าไปในแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทได้มากที่สุดเท่าที่จะมากได้ แล้วใช้ปากคีบ คีบแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทนี้สอดลงในเจลตามช่องที่เจาะไว้ช่องละ 1 ตัว-อย่างโดยไม่ให้เจลแตก และให้แผ่นเซลลูโลสอะซีเตทนี้จมอยู่ใต้ผิวเจล

7.5 วิธีจัดตั้งเครื่องและการทำอีเล็คโทรฟอรีสิส

นำแผ่นเจลที่ใส่ตัวอย่างเลือดเรียบร้อยแล้วนี้ไปแยกหาไอโซไซม์ (จัดตั้งเครื่องดังแผนภาพที่ 1) โดยวางเจลไว้บนแผ่นทำความเย็น 2-4 °C ตลอดเวลา และให้อยู่ระหว่างกล่องอีเล็คโทรดบัฟเฟอร์ทั้งสองที่มีอีเล็กโทรดบัฟเฟอร์กล่องละ 500 มิลลิลิตร ให้แนวเริ่มต้นอยู่ทางขั้วลบ วางฟองน้ำไว้ที่ขอบทั้งสองข้างของเจล ฟองน้ำนี้ใช้เป็นสื่อเชื่อมระหว่างเจลกับอีเล็คโทรดบัฟเฟอร์ ต่อมาวางแผ่นพลาสติกปิดบนเจลและฟองน้ำ แล้ววางแผ่นทำความเย็นทับลงอีกชั้นหนึ่งให้อยู่ระหว่างฟองน้ำทั้งสองข้าง เปิดเครื่องผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าเจลโดยใช้กระแส 70 มิลลิแอมแปร์ คงที่นาน 14 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 2-4 °C

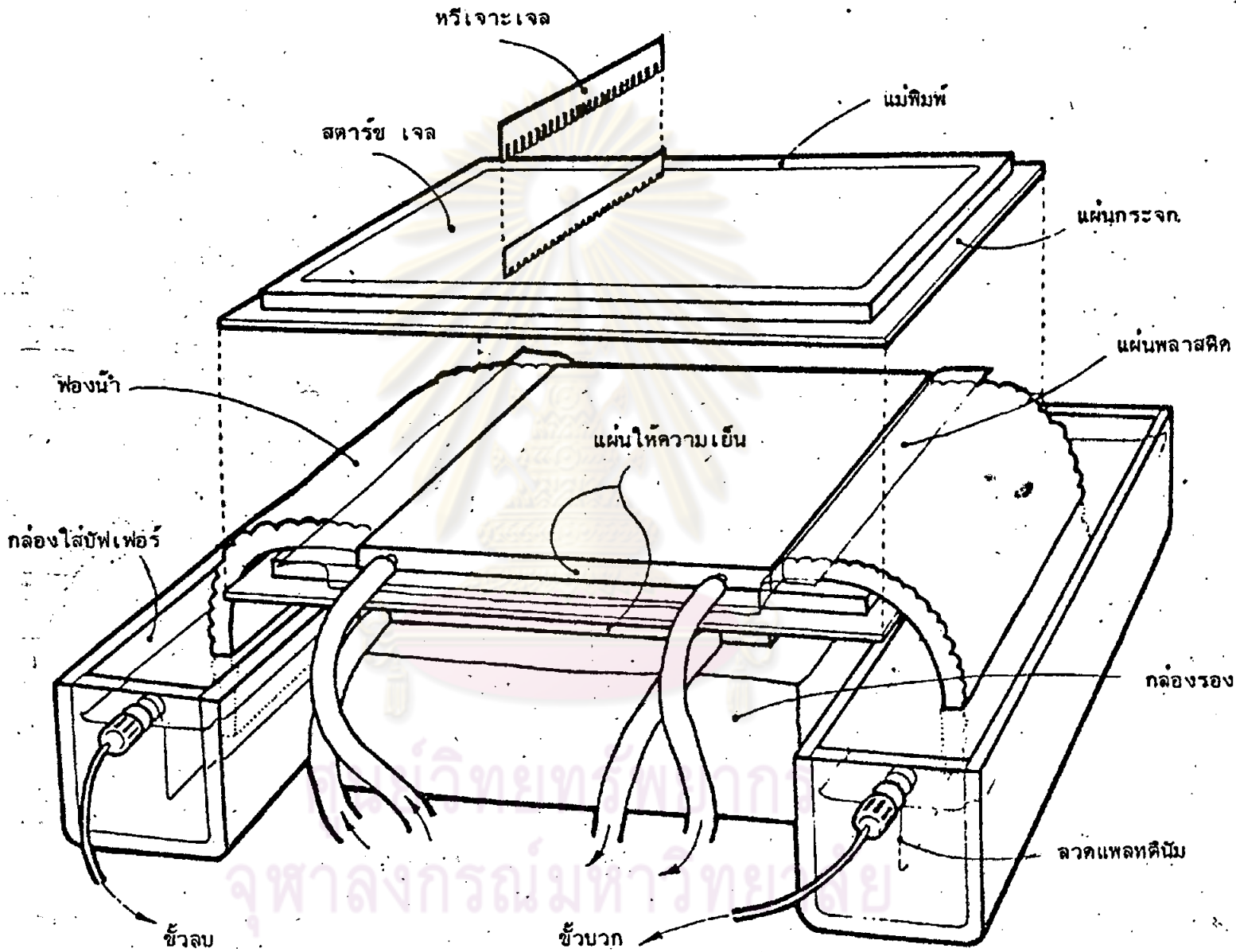
7.6 วิธีผ่านเจล

หลังจากผ่านกระแสไฟฟ้า เพื่อแยกหาไอโซไซม์ของเอ็นไซม์แลกเตทดีไฮโดรจีเนสแล้ว ก่อนที่จะนำไปย้อมสีดูแถบของไอโซไซม์ที่จะปรากฏให้เห็นบนเจล จะนำเจลมาฝานแบ่งครึ่งตามแนวนอนให้ได้เป็น 2 แผ่น หนาแผ่นละ 3 มิลลิเมตร ทั้งนี้เพราะการผ่านกระแสไฟฟ้าโดยมีตัวกลางเป็นสตาร์ชเจล เอ็นไซม์จะมีวิถีการวิ่งไปในเจลเป็นเส้นโค้ง (ดูแผนภาพที่ 2)



วิถีการวิ่งของเอ็นไซม์เป็นเส้นโค้ง

แผนภาพที่ 2 แสดงวิถีการวิ่งของเอ็นไซม์ในสตาร์ชเจล



แผนภาพที่ 1 แสดงการจัดตั้งเครื่องมือสำหรับอีเล็คโตรฟอรีซิส

ดังนั้น ถ้าย้อมสีดูแถบของเอ็นไซม์ตรงกลางแผ่นเจล จะทำให้เห็นแถบของเอ็นไซม์ครบทุกแถบ และทำให้การอ่านผลถูกต้องสมบูรณ์ที่สุด วิธีตัดเจลนี้ทำโดยเอาแม่พิมพ์ออกจากเจล นำกรอบพลาสติกที่มีขนาดเท่าแม่พิมพ์แต่หนาเป็นครึ่งหนึ่งมาใส่แทนที่ แล้วใช้มีดขนาดความยาว 30 เซ็นติเมตร ฝานแบ่งครึ่งเจลตามแนวนอน (โดยลากมีดให้ขนานไปกับกรอบอันใหม่) จะได้เจลเป็น 2 แผ่นที่มีขนาดเท่ากัน สามารถนำมาย้อมสีดูแถบของเอ็นไซม์ได้ทั้งสองแผ่น

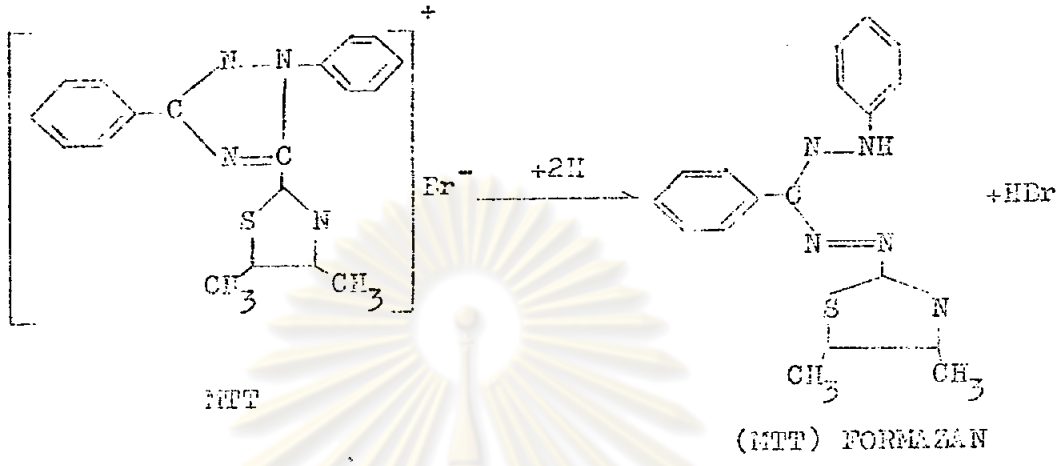
7.7 วิธีย้อมสีเอ็นไซม์ ตามวิธีของ Harris & Hopkinson, 1976

เมื่อฝานเจลเสร็จแล้ว นำมาย้อมสีเพื่อหาตำแหน่งของเอ็นไซม์ ซึ่งในการทดลองนี้ เป็นการย้อมสีด้วยวิธี electron transfer dye staining ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดในการหาตำแหน่งของไอโซไซม์หลังจากอีเล็กโทรฟอรีซิส สีที่ใช้ย้อมคือ เม็ททิลไธอะโซลิลเตรทตระโซเลียม (methyl thiazolyl tetrazolium หรือ MTT) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับอีเล็กตรอน สำหรับปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนส โดย MTT จะถูกรีดิวส์โดยอีเล็กตรอนโดนเนอร์ ให้เป็นฟอร์มาซานที่ไม่ละลายน้ำ มีสีม่วงแก่แกมน้ำเงิน ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นเร็วมาก ถ้ามีฟีนาซีน เมโธซัลเฟต (phenazine methosulphate หรือ PMS) อยู่ด้วย ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ดูแผนภาพที่ 3 และ 4)

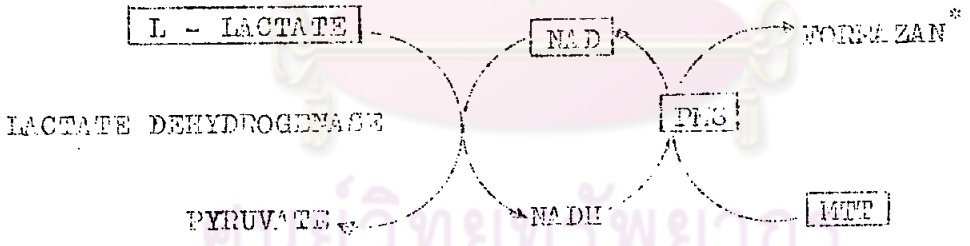
สารละลายสีสำหรับย้อมดูแถบของไอโซไซม์แลกเตทดีไฮโดรจีเนส มีส่วนประกอบและวิธีเตรียมดังนี้

ส่วนประกอบของสารละลายมี:-

Tris HCl pH 8.0	50	มิลลิลิตร
lithium lactate	200	มิลลิกรัม
NAD	5	มิลลิกรัม
MTT	5	มิลลิกรัม
PMS	5	มิลลิกรัม



แผนภาพที่ 3 แสดงการเกิดฟอร์มาซาน โดยปฏิกิริยารีดักชั่นของ MTT



แผนภาพที่ 4 แสดงการเกิดฟอร์มาซานบนแผ่นเจล

วิธีเตรียมสารละลายสี ละลายสารทุกชนิด (ยกเว้น PMS) ใน Tris HCL 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม PMS ลงไปเป็นตัวสุดท้าย คนให้เข้ากัน

วิธีย้อมสี นำแผ่นเจลที่ฝานแบ่งครึ่งเรียบร้อยแล้วมาย้อมสีโดยใช้สารละลายที่เตรียมไว้วางบนเจล ในที่ที่มีแสงสว่างเพียงเล็กน้อย (เพราะว่าสี MTT - PMS มีความไวต่อแสงมาก ถ้าโดนแสงจะทำให้เปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นดำ ซึ่งจะไปบังแถบของไอโซไซม์ที่จะปรากฏขึ้นบนเจลหมด ทำให้มองไม่เห็นแถบของไอโซไซม์) แล้วนำไปไว้ในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 °c นานประมาณ 30 นาที จะเห็นแถบของไอโซไซม์ปรากฏอยู่บนผิวเจล

7.8 การอ่านและบันทึกผลการทดลอง

การอ่านผลการทดลองจะต้องทำภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากเห็นแถบของไอโซไซม์ ปรากฏขึ้นบนเจล ทั้งนี้เพราะว่า

1. สี MTT- PMS เป็นสีที่ไม่สลายตัวในสภาวะเป็นกลางหรือเป็นกรด แต่จะสลายตัวในสภาวะที่เป็นด่าง ในการทดลองนี้ สารละลายสีที่ใช้มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็นด่างเล็กน้อย

2. ถ้าทิ้งไว้นาน เอ็นไซม์จะมีการแพร่กระจายไปในเจล ทำให้แถบของเอ็นไซม์เลือนไม่คมชัด ทำให้เกิดความลำบากในการอ่านผล

3. ถ้าทิ้งไว้นาน จะทำให้พื้นเจลเป็นสีน้ำเงิน ทำให้อ่านผลยากเช่นเดียวกัน

การอ่านผลการทดลอง ทำโดย

1. เปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของแถบไอโซไซม์ของเชื้อบาเลเรียที่เก็บไว้กับกลุ่มควบคุม โดยดูจำนวนแถบไอโซไซม์ การเคลื่อนที่จากแนวเริ่มต้นไปทางขั้วบวกหรือลบ และแต่ละแถบห่างจากแนวเริ่มต้นเท่าใด

2. เปรียบเทียบการทำงาน ของเอ็นไซม์แลกเตทดีไฮโดรจีเนสของเชื้อมาเลเรียที่ถูกเก็บด้วยวิธีต่างกัน แต่ถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนานเท่ากัน เทียบกับเชื้อมาเลเรียกลุ่มควบคุม โดยดูจากความเข้มของสีฟอร์มาซานที่เกิดขึ้น

วิธีบันทึกผล

1. ใช้แผ่นพลาสติกใส ขนาดเท่าแผ่นเจล วางทาบลงไปบนเจล แล้วใช้ปากกาชนิดที่หมึกไม่ละลายน้ำ ลอกรูปแถบของไอโซไซม์ ซึ่งภาพที่ได้จะมีขนาดเท่าของจริง

2. วัดระยะทางที่ไอโซไซม์เคลื่อนที่ไปจากจุดเริ่มต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย