บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ศึกษารูปแบบโปรตีนโดยทำการแยกโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงด้วยกระแสไฟฟ้าใช้วิธีอิเลคโตรโฟริซิสแบบเอสดีเอสเพจ (Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis) โดยศึกษาในยุงเพศผู้และเพศเมีย

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive)

การให้คำนิยามในเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational Definitions)

Dissecting: เป็นการ dissect ต่อมน้ำลายยุง โดยใช้เข็มเขี่ย (needle) แยกส่วนอกและส่วนหัวของยุงออกจากกันเพื่อเก็บต่อมน้ำลาย ภายใต้กล้อง stereomicroscope

อุปกรณ์

High speed refrigerated microcentrifuge (Tomy)

Magnatic stirrer (Thermolyne)

Stereomicroscope (Olympus)

Thermo-block TDB-120 (Biosan)

Bio-shaker BR-300L (Taitec)

Spectophotometer SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad)

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดอ่านได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa)

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดอ่านได้ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precisa)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (EcoMet)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตู้เย็น 4°C (LG)

ตู้เย็น –40 °C (Puffer Hubbard)

ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic adjustable micropipette) ขนาด 0.5-10, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร (GIBTHAI)

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (BECThai)

เครื่อง centrifuge ขนาด 1.5 มล. x 12 MICRO 12 (HANIL)

เครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Bio-Rad)

ตู้อบ (Memmert)

เครื่องกรองน้ำ Millipore (Milli-Q PF Plus)

วัสดุ

กระจกสไลด์ ขนาด 2.5 x 7.5 ซม.

กระบอกตวง ขนาด 10, 100, 500 และ 1,000 มล.

กระติกน้ำแข็ง

ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมี (Schott Duran)

ถุงมือยาง (latex gloves)

ที่วางหลอดทดลอง ขนาด 0.1, 1.0 และ 1.5 มล.

นาฬิกาจับเวลา

บิกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250 และ 1,000 มล.

ปากคีบ (forcep)

ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Euro Lab®)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (microtube) ขนาดความจุ 1.5 มล. (TPP®)

กรงยุงอลูมิเนียมขนาด 30 x 30 x 30 ซม. 3 กรง

ถาดพลาสติก ขนาด 20x 30 x 6 ซม.

ถ้วยพลาสติกสำหรับใส่ลูกน้ำและตัวโม่งยุง

สำลี, ไม้, กระดาษทิชชู

ผ้าขนหนู ขนาด 64 x 34 ซม.

หลอดหยดขนาดใหญ่สำหรับดูดลูกน้ำและตัวโม่งยุง

หลอดดูดยุงตัวเต็มวัย

เข็มเขี่ย (needle)

หลอดหยด (dropper)

ตะแกรง fix หนู

กระดาษเซลโลเฟน

กระจก ขนาด 11x13 ซม.

ตัวหนีบ

Cuvettes

สารเคมี

1. **สารเคมีทั่วไป**

   - NaCl (amresco®)
   - KCl (J.T. Baker)
   - $NaHCO_3$ (AR®)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- $MgCl_2.6H_2O$ (amresco®)
- HEPES (amresco®)
- Sucrose (amresco®)
- Bovine serum albumin (Sigma)

2. **สารเคมีที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE**

- Acrylamide PAGE, 40 % (Pharmacia)
- Methylenebis acrylamide (Phamacia)
- Tris (USB™)
- Tris [hydroxymethyl] aminomethane (Sigma)
- Mercaptoethanol (Pharmacia)
- Ammonium persulphate (Pharmacia)
- SDS (APS)
- TEMED (N' –tetramethylethylenediamine) (USB™)
- Glycine (USB™)
- Glyceral (MERCK)
- Bromophenol blue (USB™)

3. **สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีเจล**

- Ethanol (MERCK)
- Glacial acetic acid (MERCK)
- Methanol (J.T.Baker)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **สารเคมีที่เป็น** Reagent kit

- Silver Stain kit (Bio-Rad)
- Protein Assay kit (Bio-Rad)
- น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานสำหรับเอสดีเอสอิเลคโตรโฟริซิส (Pharmacia)

ยุง

Aedes aegypti

Aedes albopictus

Armigeres subalbatus

การเลี้ยงยุง (Rearing mosquitoes)

ทำการเลี้ยงยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ยุงลายสวน *Ae. albopictus* และยุงแม่ไก่ *Ar. subalbatus* ภายใต้สภาวะที่ถูกควบคุม ซึ่งจะทำการเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 27-30 $^{\circ}$ C และมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 70-80 % เริ่มจากไข่ นำมาฟักในถาดที่มีน้ำ โดยจุ่มแผ่นไข่ลงในน้ำ ประมาณ 5-10 นาที ไข่จะฟักออกมาเป็นตัวลูกน้ำระยะที่ 1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารหนูประมาณ 4-5 วัน ลูกน้ำจะเจริญจนถึงระยะที่ 4 จากนั้นวันที่ 5-6 ก็จะเป็นระยะดักแด้ (pupa) เก็บระยะดักแด้ใส่ถ้วยหรือภาชนะ นำใส่กรง ประมาณเช้าวันที่ 6-7 ดักแด้ก็จะออกมาเป็นตัวเต็มวัย ยุงตัวเต็มวัยทั้งตัวผู้และตัวเมียจะให้สารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 10 % เป็นอาหาร และสำหรับยุงเพศเมียเมื่ออายุได้ 5 วันจะก็ให้เลือดหนูแฮมสเตอร์เป็นอาหาร

การ Dissect ต่อมน้ำลายยุง (Dissecting salivary gland)

ทำการ dissect ต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ยุงลายสวน *Ae. albopictus* และยุงแม่ไก่ *Ar. subalbatus* ตัวเต็มวัยภายใต้กล้อง stereomicroscope ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่มีอายุ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน จากการให้น้ำตาลเป็นอาหาร สำหรับยุงเพศเมีย ทำการ dissect ต่อมน้ำลายยุงเพศเมียที่กินเลือด เป็นเวลา 0 6 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อมน้ำลายยุงเพศผู้จะใช้ประมาณ 15 คู่ต่อม ต่อ 1 ตัวอย่าง ส่วนต่อมน้ำลายยุงเพศเมียจะใช้ประมาณ 10 คู่ต่อม ต่อ 1 ตัวอย่าง

ต่อมน้ำลายที่ได้จากการ dissect นำไปใส่ในสารละลาย *Aedes* Saline[48] ใน microcentrifuge tube แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาทำการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างต่อมน้ำลายยุงสำหรับการทำ SDS-PAGE

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

1. ทำการปั่นต่อมน้ำลายยุงที่อยู่ในสารละลาย *Aedes* Saline ใน tube ด้วย microcentrifuge ที่ 1500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาประมาณ 15 นาที
2. ต่อมน้ำลายจะตกตะกอนอยู่ก้น tube จากนั้นดูดของเหลวใสออกให้เหลือแต่ตะกอน
3. เติม sample buffer 2.5 µl และเติม ddH_2O 7.5 µl
4. นำไป heat ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ (denature)
5. นำตัวอย่างที่ heat แล้วไปปั่นประมาณ 5 วินาที ให้ส่วนน้ำที่ระเหยอยู่ด้านบนหลอดตกลงมารวมกัน
6. ใส่ตัวอย่างลงในช่องเจลตามลำดับช่องละ 1 ตัวอย่าง โดยช่องแรกจะทำการใส่น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานสำหรับเอสดีเอสอิเลคโตรโฟริซิส 3 µl และ run ที่ 100V เป็นเวลาประมาณ 85 นาที

การทำ SDS - PAGE

SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกโปรตีนจากตัวอย่าง แล้วทำการตรวจสอบด้วยการย้อมสี (staining)

ขั้นตอนการเตรียมเจล (Preparation of Gel)

ในการเตรียมเจล เนื้อเจลประกอบด้วย 2 ส่วนซึ่งปรับปรุงมาจากวิธีของ Harlow and Lane (1988)[49] คือ

เจลชั้นล่าง (Resolving Gel) (12 %)	5 ml	10 ml
H_2O	1.6	3.3
30 % acrylamide mix	2.0	4.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5
10 % SDS	0.05	0.1
10 % ammonium persulfate	0.05	0.1
TEMED	0.002	0.004

เจลชั้นบน (Stacking Gel) (5%)	1 ml	2 ml
H_2O	0.68	1.4
30 % acrylamide mix	0.17	0.33
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25
10 % SDS	0.01	0.02
10 % ammonium persulfate	0.01	0.02
TEMED	0.001	0.002

โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้ คือ

1. ทำการประกอบเครื่องมือ และเตรียมแผ่นกระจกสำหรับใส่เจล ตามคู่มือ
2. เตรียมเจลชั้นล่าง (Resolving gel) ตามส่วนผสมข้างต้น แล้วใส่ลงลง plate ที่เป็นแผ่นกระจกประมาณ 3.5 ml. ซึ่งส่วนผสม 2 อย่างสุดท้าย คือ ammonium persulfate และ TEMED จะเป็นตัวทำให้เจลแข็งตัว จากนั้นเติม ddH_2O ลงไปประมาณ 1 ml. เพื่อให้หน้าเจลเรียบ ทิ้งให้เจล แข็งตัวประมาณ 30 นาที
3. ซับน้ำออกด้วยกระดาษทิดชู จากนั้นจึงเตรียมเจลชั้นบน (Stacking gel) แล้วใส่ลง plate ต่อจากเจลชั้นล่าง แล้วนำ comb ใส่ด้านบนของเจลชั้นบนทันที ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว
4. เมื่อเจลแผ่นแข็งตัวแล้วนำ comb ออกแล้วนำ plate ที่มีเจลใส่ใน tank
5. เติม 1X SDS/PAGE gel running buffer ใน tank ด้านในให้ท่วมพอดีเจล และด้านนอกพอท่วมเส้นลวด (หรือประมาณครึ่ง tank)
6. ทำการใส่ตัวอย่างในช่องเจลชั้นบนช่องละ 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Protein molecular weight marker) 3 µl เพื่อการเปรียบเทียบ
7. ทำการต่อเข้าระบบ ใช้กระแสไฟคงที่ขนาด 100 V เป็นเวลาประมาณ 85 นาที

การตรวจสอบ Protein หลังจากการทำ SDS/PAGE

การย้อมด้วย Silver (Silver Staining)

ใช้ Silver Stain Plus kit (Bio-Rad)

1. วางเจลลงในน้ำยา fixative (50% Methanol, 10% acetic acid, 10% Fixative Enhancer Concentrate, 30% ddH_2O v/v) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 20 นาที
2. ล้างเจลใน ddH_2O 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที

3. วางเจลใน Silver reagent (35 ml ddH_2O, 5 ml Silver Complex Solution, 5 ml Reduction Moderator Solution, 5 ml Image Development Reagent, 50 ml Development Acelerator Solution) และเขย่าเบาๆเป็นเวลาประมาณ 15-20 นาที
4. หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่เจลใน 5% acetic acid เป็นเวลา 15 นาที
5. ล้างเจลด้วย ddH_2O 5 นาที ประมาณ 2 ครั้ง

การทำเจลแห้ง

การทำให้เจลแห้งทำโดย นำเจลที่ย้อมสีแล้วปิดด้วยแผ่นกระดาษเซลโลเฟนที่ชุบน้ำ ซึ่งวางอยู่บนกระจก แล้วหนีบด้วยตัวหนีบทั้ง 4 ด้าน ทิ้งข้ามคืนจนเจลแห้ง

การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการวัดปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์จากต่อมน้ำลายยุง *Ar. subalbatus* ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย อายุ 1, 3 และ 5 วัน

ใช้ Bio-Rad Protein Assay (Bradford method) [50] ซึ่งแบ่งเป็นวิธี

- Standard Procedure ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 20-140 µg
- Microassay Procedure ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 1-20 µg

ในการวัดครั้งนี้จะใช้ Microassay Procedure เนื่องจากโปรตีนที่ต้องการวัดมีปริมาณน้อย

<u>ขั้นตอนการวัด</u>

1. เตรียมตัวอย่างต่อมน้ำลายยุงที่จะทำการวัด โดย dissect ต่อมน้ำลายยุงตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ใส่ใน microcentrifuge tube ที่มีสารละลาย *Aedes* Saline
2. เตรียม standard protein ที่จะทำการวัด คือ 1mg/ml ของ Bovine serum albumin (BSA) เตรียมเป็น 3-5 dilutions ของ protein standard เช่น 1, 3, 5, 7 และ 9 µg/ml โดย dilute ด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้กับตัวอย่างที่ต้องการวัด เพื่อเป็นตัวแทนของโปรตีนที่จะทำการทดสอบ และสร้างเป็นกราฟมาตรฐานจากค่าที่วัดได้
3. ใส่ 80 µl ของแต่ละ standard solution และ sample solution ลงใน tube

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. เติม 20 µl ของ dye reagent concentrate ในแต่ละ tube และ vortex

5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง

6. ใส่สารละลายผสมลงใน cuvettes และวัด A_{595} เมื่อได้ค่า A_{595} นำมาหาค่าปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยนำรูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน ยุงลายสวน และยุงแม่ไก่ ตัวเต็มวัยแต่ละชนิดตามอายุ และเพศ ที่ปรากฏบนแผ่นเจลมาวิเคราะห์ศึกษาเชิงเปรียบเทียบ โดยดูจำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏทั้งหมด และดูน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ทำได้โดย คำนวณค่า R_f ซึ่งได้จาก ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุล หารด้วย ระยะการเคลื่อนที่ของ dye marker แล้วหาค่า $\log_{10}$(M.W.) จากกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ซึ่งสร้างจากค่า R_f และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (M_r(Da)) จากนั้นคำนวณกลับออกมาเป็นน้ำหนักโมเลกุล (M.W.)

ในการวัดปริมาณโปรตีน สามารถหาค่าปริมาณโปรตีนที่วัดได้โดย สร้างกราฟมาตรฐานจากค่า $O.D._{595}$ และปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ที่ dilutions ต่างๆ (mg/ml) จากนั้นนำค่า $O.D._{595}$ ของตัวอย่างที่ทำการวัดมาหาค่าปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย