บทที่ 4

การดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis

เชื้อ T. vaginalis ที่ใช้ในการทดลองนี้ เก็บมาจากผู้ป่วยหญิงที่มารับการตรวจรักษาที่ห้องนรีเวชกรรมแผนกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 30 รายและจากศูนย์บริการสาธารณสุข ดินแดง กรุงเทพมหานคร จำนวน 20 ราย รวมทั้งหมด 50 ราย ซึ่งมีขั้นตอนในการเก็บดังนี้คือ

ตรวจหาเชื้อจากช่องคลอด โดยวิธีเวทสเมียร์เปรปปาเรชั่น (wet - smear preparation) ซึ่งทำโดยใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วไปสวอป (swab) ที่ช่องกลอดบริเวณโพสทีเรีย ฟอร์นิกส์ แล้วนำไปแตะบนหยดน้ำเกลือบนกระจกสไลด์ และปิดด้วยแผ่นกระจกบาง (cover slip) นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า เพื่อตรวจหาเชื้อ ถ้าพบเชื้อจึงใช้ไม้พันสำลีสวอปอีกครั้งหนึ่งแล้วนำไปใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ T. vaginalis

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตลอดการทดลองนี้ ได้ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM (cysteine - peptone - liver - maltose) ของ Johnson and Trussell (1943) โดยไม่ใส่วุ้น และลดปริมาณซีรั่มลงให้น้อยกว่าเดิมคือ ใช้ 0.5 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 8 มิลลิลิตร และต่อไปนี้จะเรียกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ดัดแปลงไปแล้วนี้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA มีส่วนประกอบและวิธีเตรียม ดังนี้

2.1 ส่วนประกอบ :-

Cysteine monohydrochloride	2.4	กรัม
Bacto - peptone	32.0	กรัม
Maltose	1.6	กรัม
Bacto - liver infusion	320.0	มิลลิลิตร
Ringer's solution	960.0	มิลลิลิตร

2.2 การเตรียม Bacto - liver infusion

Bacto-liver infusion เตรียมจาก Bacto-liver 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 330 มิลลิลิตร นึ่งที่ $50^{\circ}C$ นาน 1 ชั่วโมง แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปจนถึง $80^{\circ}C$ นาน 5 นาที เพื่อให้โปรตีนแข็งตัว กรอง จะได้สารละลายของตับที่มีปริมาตร 320 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียม Ringer's solution (Taylor & Baker, 1968)

Ringer's solution ประกอบด้วย

NaCl	6.5 กรัม	เติมน้ำกลั่นที่กลั่น 3 ครั้งให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
KCl	0.14 กรัม	
$CaCl_2$	0.12 กรัม	
$NaHCO_3$	0.20 กรัม	

การเตรียมนำส่วนประกอบทั้งหมดนี้ผสมเข้าด้วยกัน แล้วนำมาปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 5.8-6.0 ด้วย 1N NaOH เมื่อได้ตามต้องการแล้ว เติม 0.5%เมธิลีนบลู 0.7 มิลลิลิตร เพื่อให้ทำหน้าที่เป็นอินดิเคเตอร์ แบ่งสารละลายนี้ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาจุกเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดละ 8 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ

121°C 15 ปอนด์ นาน 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อนี้เย็น เติมซีรั่มของคนที่อุ่นแล้ว (inactivated human serum) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ซีรั่มของคนที่ใช้ตลอดการทดลองนี้ ได้นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 56°C ก่อน เพื่อทำลายคอมพลีเม้นท์)

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อ T. vaginalis เพื่อให้ปราศจากแบคทีเรียและรา ก่อนทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ (cloning)

ทำการเลี้ยงเชื้อ T. vaginalis ที่ได้จากคนไข้แต่ละรายในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA โดยดูดเชื้อที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บมาจากคนไข้ 0.5 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีเสตอไรล์ และให้ฟักตัวอยู่ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 48 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยง T. vaginalis ที่ได้จากคนไข้แต่ละราย รายละ 2 หลอด ถ้าหลังจากแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์แล้ว ทำการเลี้ยงสายพันธุ์บริสุทธิ์ละ 1 หลอด

เนื่องจากเชื้อ T. vaginalis ที่ได้มาจากคนไข้จะมีแบคทีเรียปนอยู่ด้วยเสมอ และในบางครั้งก็จะมีเชื้อรา Candida albican ด้วย ดังนั้นก่อนที่จะนำไปแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์จึงจำเป็นที่จะต้องกำจัดออกไป เพื่อให้เกิดความสะดวกในการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยใส่ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าแบคทีเรีย คือ ไดไฮโดรสเตรปโตมัยซิน และ เพนนิซิลินปริมาณ 5,000 ไมโครกรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร และ 5,000 ยูนิตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตรตามลำดับ ในกรณีที่มีเชื้อราปนอยู่ด้วย จะใส่ยาไมโคสแตติน 300 แกมมาต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร

การใส่ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียนี้ ใส่เพียง 2 ครั้งติดต่อกันก็สามารถกำจัดแบคทีเรียให้หมดไปได้ และถ้าหลังจากที่ปราศจากแบคทีเรียแล้วก็ไม่จำเป็นต้องใส่ยาปฏิชีวนะอีก สำหรับการฆ่าเชื้อราต้องใส่ไมโคสแตติน 3 ครั้งติดต่อกัน ราถึงจะหมดไป

4. วิธีเตรียมอาหารสำหรับแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์

การเตรียมอาหารที่ใช้ในการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์นั้นใช้ส่วนผสมในการเตรียมตามวิธีของ Samuels (1962) และได้ใช้วิธีเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ในภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงตามวิธีของ Jensen & Trager (1977) ซึ่งทำให้มีปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ประมาณ 2% ในบรรยากาศ

อาหารที่ใช้ในการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์นี้มีส่วนประกอบเหมือนกับที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแต่ได้เติมวุ้นลงไปด้วยเพื่อให้มีความแข็ง และมีความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 6.0 - 6.5 การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์นี้จะต้องเตรียมอาหารเป็น 2 ส่วน เพื่อจะทำให้เป็นสองชั้น คือ

ชั้นล่างเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM ที่มีวุ้น 1.6% และยาปฏิชีวนะไดไฮโดรสเตรปโตมัยซิน และ เพนนิซิลิน 5,000 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร และ 5,000 ยูนิตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ บรรจุใส่หลอดที่มีฝาจุกเกลียวหลอดละ 5 มิลลิลิตร

ชั้นบนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM ที่มีวุ้น 0.8% ยาปฏิชีวนะไดไฮโดรสเตรปโตมัยซิน และ เพนนิซิลิน 5,000 ไม่โครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร และ 5,000 ยูนิตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ และซีรั่มที่อุ่นแล้ว 0.25 มิลลิลิตร บรรจุใส่หลอดที่มีฝาจุกเกลียวหลอดละ 2.5 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารก่อนใช้แยกสายพันธุ์บริสุทธิ์นี้ ต้องทำให้ปราศจากเชื้อโรคเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เมื่อเวลาจะใช้ก็นำมาอุ่นในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ $40^{\circ}C$ เพื่อให้วุ้นละลาย

5. วิธีแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์

เมื่อเลี้ยง T. vaginalis ให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรียและราได้นาน 48 ชั่วโมง แล้ว จึงนำมาแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ตามวิธีของ Samuels (1962) ซึ่งดัดแปลงโดยใช้จานแก้วเลี้ยงเชื้อ ขนาด 20 มิลลิลิตรแทนขนาด 100 มิลลิลิตร และใช้การจุดเทียนไข แทนการใช้น้ำแข็งแห้ง โดยมีวิธีแยกดังนี้

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM ชั้นล่างที่มีวุ้น 1.6% และยาปฏิชีวนะลงในจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อโรคแล้วในขณะที่อาหารที่อุณหภูมิ 40°C แล้วทิ้งไว้ให้อาหารแข็งและดูดซึมก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ในเดสสิคเคเตอร์ที่มีบรรยากาศประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ 2% ทำโดยวางจานแก้วเลี้ยงเชื้อขณะที่อาหารในจานยังไม่แข็งลงในเดสสิคเคเตอร์ แล้วจุดเทียนไขไว้ในเดสสิคเคเตอร์ ปิดฝา เปิดท่อนำอากาศออก เมื่อเทียนไขจวนจะดับปิดท่ออากาศ และทิ้งไว้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง อาหารชั้นล่างนี้จะแข็ง นำออกจากเดสสิคเคเตอร์ เพื่อเทอาหารชั้นบนที่มีวุ้น 0.8% ทับลงไป อาหารชั้นบนนี้ได้ผสมเชื้อ T. vaginalis ที่ต้องการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ 0.25 มิลลิลิตรลงไปด้วย แล้วนำกลับเข้าวางในเดสสิคเคเตอร์ใหม่โดยทำเหมือนกับครั้งแรก จนกระทั่งอาหารชั้นบนแข็งแล้ว ปล่อยให้ T. vaginalis เจริญและเพิ่มจำนวนในเดสสิคเคเตอร์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-5 วัน หลังจากนี้จะเห็นมีโคโลนีของ T. vaginalis ขึ้นอยู่ระหว่างชั้นทั้งสองของอาหารเป็นจุดสีขาวเห็นได้ชัด

เมื่อได้กลุ่ม T. vaginalis แล้ว แยกแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA โดยใช้พาสเตอร์ไปเปต ที่สะอาดและฆ่าเชื้อโรคแล้ว เขี่ยกลุ่มของ T. vaginalis มาเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยเลือกกลุ่มที่มีรูปร่างลักษณะไม่เหมือนกัน จำนวน 2 กลุ่มจาก T. vaginalis ที่ได้จากคนไข้แต่ละราย จะได้ตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis ทั้งหมด 100 กลุ่ม หรือ 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ทำการเลี้ยงและเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 48 ชั่วโมง จนกว่าจะได้ T. vaginalis จำนวนมากพอที่จะนำมา

ทดสอบเอ็นไซม์ได้ (T. vaginalis จำนวน 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้หลังจากการแยกสาย-พันธุ์บริสุทธิ์นี้ จะได้นำมาเรียงเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ 1-100 เพื่อสะดวกในการจัดลำดับ โดยใช้หลักดังนี้คือ สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ 1, 2 มาจากคนไข้รายที่ 1, สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ 3, 4 มาจากคนไข้รายที่ 2 ... สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ 99, 100 มาจากคนไข้รายที่ 50 ตามลำดับ)

6. วิธีเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับอีเล็คโตรฟอริซิส

การเตรียมบัฟเฟอร์นี้ใช้ตามวิธีของ Carter and Walliker (1977) บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้มี 4 แบบคือ

1. สต๊อก บัฟเฟอร์ 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. เจล บัฟเฟอร์ คือ สต๊อก บัฟเฟอร์ ที่ทำให้เจือจาง 25 เท่า เตรียมโดยใช้ stock buffer 1 ส่วน น้ำกลั่น 24 ส่วน

3. อีเลคโทรด บัฟเฟอร์ คือ สต๊อก บัฟเฟอร์ ที่ทำให้เจือจาง 2 เท่า เตรียมโดยใช้ stock buffer 1 ส่วน น้ำกลั่น 1 ส่วน

4. เอ็นไซม์ แอสเส บัฟเฟอร์ 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. วิธีเตรียมสตาร์ชเจล สำหรับอีเล็คโตรฟอรีซิส

สตาร์ชเจลสำหรับอีเล็คโตรฟอรีซิส เตรียมโดยใช้

แป้งไอโดรไลส์ สำหรับอีเล็คโตรฟอรีซิส	23.5	กรัม
เจล บัฟเฟอร์	250.0	กรัม

นำแป้งและบัฟเฟอร์มาใส่ลงในขวดแก้วทรงกรวยที่มีแขนด้านข้าง ขนาด 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้ม ขณะที่ต้มเขย่าขวดให้แป้งได้รับความร้อนทั่วกันตลอดเวลาจนกระทั่งแป้งใส และเดือด แล้วนำมาดูดอากาศออก (degas) โดยใช้ปั๊มสำหรับดูดอากาศ เมื่อดูดอากาศออกหมดแล้ว ค่อย ๆ เทแป้งลงในแม่พิมพ์ขณะที่แป้งยังคงร้อนอยู่โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เพื่อให้แป้งแข็งเล็กน้อย แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 2-4°C นานอย่างน้อย 3 ชั่วโมงก่อนใช้ ทั้งนี้เพื่อให้แป้งแข็งตัวเท่ากันทั่วทั้งแผ่น และมีอุณหภูมิต่ำ 2-4°C เมื่อใส่ตัวอย่างเอ็นไซม์ลงไปในเจล เอ็นไซม์จะได้ไม่ถูกทำลาย

8. การเตรียมตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis สำหรับอีเล็คโตรฟอรีซิส

นำเชื้อ T. vaginalis แต่ละสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำไป เก็บตะกอนซึ่งมีแต่เชื้อ T. vaginalis มาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อโรคแล้ว (sterile normal saline solution) 3 ครั้ง ที่ 2,000 รอบต่อนาที ครั้งละ 10 นาที ให้ได้เซลปาราสิตประมาณ 0.5 กรัม (wet weight) ในน้ำเกลือ 0.5 มิลลิลิตร (ในการทดลองนี้ใช้ 1 หลอดทดลอง) นำเซลปาราสิตที่ได้มาใส่ในถาดหลุมที่อุณหภูมิ 2-4°C แล้วทำเซลให้แตกโดยใช้ 1% triton X-100 in EDTA-Tris-HCl buffer ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.4 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบน T. vaginalis จะได้สารละลายเอ็นไซม์ตัวอย่างของปาราสิตสำหรับอีเล็คโตรฟอรีซิส

9. วิธีใส่เอ็นไซม์ตัวอย่างลงในแผ่นสตาร์ชเจล

นำแผ่นเจลที่เตรียมไว้ในข้อ 7 มาเจาะให้เป็นร่องด้วยใบมีดโกนอย่างบางขนาด 1 x 1 เซนติเมตร โดยเจาะเจลเจลละ 12 ช่อง แต่ละช่องห่างกัน 1 กระเบียดนิ้ว (ดูแผนภาพที่ 1) ในแนวขนานกับขอบของแม่พิมพ์ห่างจากขอบแม่พิมพ์ 1½ นิ้ว (แนวนี้ใช้เป็นแนวเริ่มต้น)

เมื่อเจาะเจลเสร็จแล้ว นำกระดาษกรองอย่างหนาของ Whatman นัมเบอร์ 1 สำหรับโครมาโตกราฟฟี ที่มีขนาด 5 x 7 มิลลิเมตร จุ่มลงในสารละลายเอ็นไซม์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 8 ทิ้งไว้นานประมาณ 5 นาที เพื่อให้เอ็นไซม์ซึมเข้ากระดาษกรองได้มากที่สุดเท่าที่จะมากได้ แล้วใช้ปากคีบ คีบกระดาษกรองนี้สอดลงในเจลตามช่องที่เจาะไว้ทั้ง 12 ช่อง ช่องละ 1 ตัวอย่าง โดยไม่ให้เจลแตก และให้แผ่นกระดาษกรองนี้จมอยู่ใต้ผิวเจล (ไม่ให้โผล่ขึ้นมาเหนือเจล)

10. วิธีจัดตั้งเครื่อง และการทำอีเล็คโตรฟอรีซิส

นำแผ่นเจลที่ใส่ตัวอย่างเรียบร้อยแล้วนี้ ไปแยกหาไอโซไซม์ (จัดตั้งเครื่องมือดังแผนภาพที่ 1) โดยวางเจลไว้บนแผ่นทำความเย็นอุณหภูมิ 2-4°C ตลอดเวลาให้อยู่ระหว่างกล่องอีเล็คโทรดบัฟเฟอร์ทั้งสอง (แต่ละกล่องใส่อีเล็คโทรดบัฟเฟอร์ 500 มิลลิลิตร) ให้แนวเริ่มต้นอยู่ทางขั้วลบ วางฟองน้ำไว้ที่ขอบทั้งสองข้างของเจล ฟองน้ำนี้ใช้เป็นสื่อเชื่อมระหว่างเจลกับอีเล็คโทรดบัฟเฟอร์ ต่อมาวางแผ่นพลาสติคปิดบนเจลและฟองน้ำ แล้ววางแผ่นทำความเย็นทับลงอีกชั้นหนึ่งให้อยู่ระหว่างฟองน้ำทั้งสองข้าง เปิดเครื่องผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าเจลโดยใช้กระแสไฟ 75 มิลลิแอมแปร์ คงที่นาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 2-4°C

11. วิธีฝานเจล

หลังจากผ่านกระแสไฟฟ้า เพื่อแยกหาไอโซไซม์ของเอ็นไซม์กลูโคสฟอสเฟตไอโซ-เมอเรสแล้ว ก่อนที่จะนำไปย้อมสีดูแถบของไอโซไซม์ที่จะปรากฏให้เห็นบนเจล จะต้องนำเจลมาฝานแบ่งครึ่งตามแนวนอนให้ได้เป็น 2 แผ่น หนาแผ่นละ 3 มิลลิเมตร ทั้งนี้เพราะว่าการผ่านกระแสไฟฟ้า โดยมีตัวกลางเป็นสตาร์ชเจล เอ็นไซม์จะมีวิถีการวิ่งไปในเจลเป็นเส้นโค้ง (ดูแผนภาพที่ 2)

วิถีการวิ่งของเอ็นไซม์เป็นเส้นโค้ง

แผนภาพที่ 2 แสดงวิถีการวิ่งของเอ็นไซม์ในสตาร์ชเจล

ดังนั้น ถ้าย้อมสีดูแถบของเอ็นไซม์ตรงกลางแผ่นเจล จะทำให้เห็นแถบของเอ็น-ไซม์ครบทุกแถบ และทำให้การอ่านผลถูกต้องสมบูรณ์ที่สุด วิธีตัดเจลนี้ทำโดย เอาแม่พิมพ์ออกจากเจล นำกรอบพลาสติคที่มีขนาดเท่าแม่พิมพ์แต่หนาเป็นครึ่งหนึ่งมาใส่แทนที่ แล้วใช้มีดขนาดความยาว 30 เซนติเมตรฝานแบ่งครึ่งเจลตามแนวนอน (โดยลากมีดให้ขนานไปกับกรอบอันใหม่) จะได้เจลเป็น 2 แผ่นที่มีขนาดเท่ากัน สามารถนำมาย้อมสีดูแถบของเอ็น-ไซม์ได้ทั้งสองแผ่น

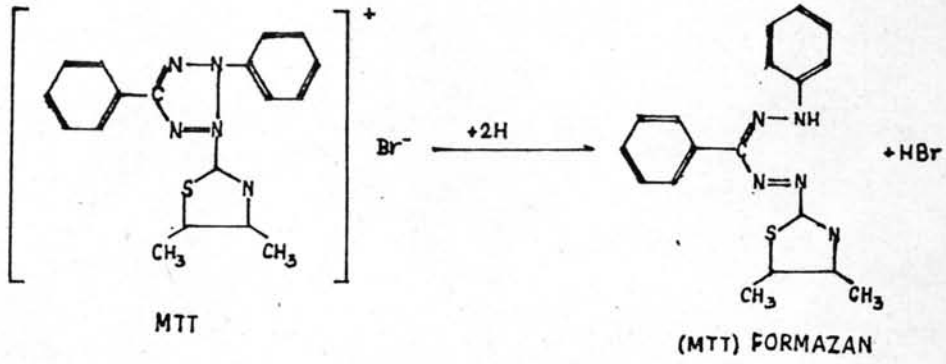
12. วิธีย้อมสี ตามวิธีของ Harris และ Hopkinson, 1976

เมื่อฝานเจลเสร็จแล้ว นำมาย้อมสีเพื่อหาตำแหน่งของเอ็นไซม์ ซึ่งในการทดลองนี้ เป็นการย้อมสีด้วยวิธี electron transfer dye staining ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดในการหาตำแหน่งของไอโซไซม์หลังจากอีเล็คโตรฟอรีซิส สีที่ใช้ย้อม คือ เมธิล ไทอะโซลิล เตรทตระโซเลียม (methyl thiazolyl tetrazolium หรือ MTT) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับอีเล็คตรอน สำหรับปฏิกริยาดีไฮโดรจีเนส โดย MTT จะถูกรีดิวส์โดยอีเล็คตรอนโดนเนอร์ให้เป็นฟอร์มาซานที่ไม่ละลายน้ำ มีสีม่วงแก่แกมน้ำเงิน ปฏิกริยานี้เกิดขึ้นเร็วมากถ้ามีฟีนาซีน เมโธซัลเฟต (phenazine methosulphate PMS) อยู่ด้วย ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวแร่งปฏิกริยา (ดูแผนภาพที่ 3 และ 4)

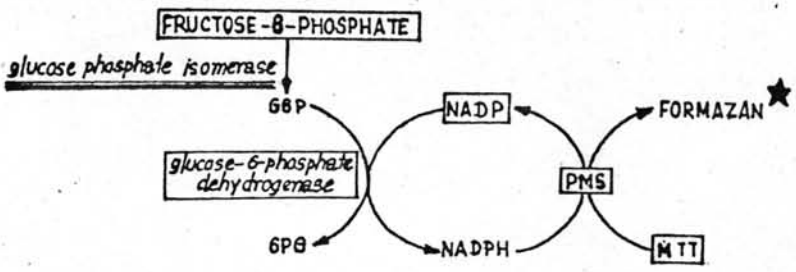
สารละลายสีสำหรับย้อมดูแถบของไอโซไซม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส มีส่วนประกอบและวิธีเตรียมดังนี้ :-

ส่วนประกอบของสารละลายสี

Tis - HCl pH 8.0	50	มิลลิลิตร
disodium fructose-6-phosphate	50	มิลลิกรัม
NADP	5	มิลลิกรัม
MTT	5	มิลลิกรัม
PMS	5	มิลลิกรัม
$MgCl_2$	20	มิลลิกรัม
G6PD enzyme	0.01	มิลลิลิตร
special agar-Nobel	400	มิลลิกรัม



แผนภาพที่ 3 แสดงการเกิดฟอร์มาซาน โดยปฏิกริยารีดักชั่นของ MTT



แผนภาพที่ 4 แสดงการเกิดฟอร์มาซานบนแผ่นเจล

วิธีเตรียมสารละลายสี

ละลาย special agar-Nobel ใน Tris-HCl ที่มีความเป็นกรดด่างที่ 8.0 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80°C แล้วทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนถึง 45°C แล้วใช้ Tris-HCl อีก 25 มิลลิลิตร ละลายส่วนประกอบที่เหลือทั้งหมด โดยใส่เอ็นไซม์เป็นตัวสุดท้าย เมื่อส่วนประกอบที่เหลือละลายหมดแล้ว เทลงผสมใน special agar-Nobelที่ละลายเตรียมไว้

วิธีย้อมสี

นำแผ่นเจลที่ฝานแบ่งครึ่งเรียบร้อยแล้วมาย้อมสี โดยเทสารละลายสีที่เตรียมไว้ (ขณะที่มีอุณหภูมิ 45°C) ในที่ที่มีแสงสว่างเพียงเล็กน้อย (เพราะว่าสี MTT-PMS มีความไวต่อแสงมาก ถ้าโดนแสงจะทำให้เปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีดำ ซึ่งจะไปบังแถบของไอโซไซม์ที่จะปรากฏขึ้นบนเจลหมด ทำให้มองไม่เห็นแถบของไอโซไซม์) ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งจึงนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C นานประมาณ 30 นาที จะเห็นแถบของไอโซไซม์ปรากฏขึ้นบนเจล

13. วิธีอ่านผลการทดลอง และบันทึกผลการทดลอง

การอ่านผลการทดลอง จะต้องทำภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเห็นแถบของไอโซไซม์ปรากฏขึ้นลนเจล ทั้งนี้เพราะว่า :-

1. สี MTT-PMS เป็นสีที่ไม่สลายตัวในสภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นกรด แต่จะสลายตัวในสภาวะที่เป็นด่าง ในการทดลองนี้ สารละลายสีที่ใช้ก็มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็นด่างเล็กน้อย

2. ถ้าทิ้งไว้นาน เอ็นไซม์จะมีการแพร่กระจายไปในเจล ทำให้แถบของเอ็น-ไซม์เลือนไม่คมชัด ทำให้เกิดความลำบากในการอ่านผล

3. ถ้าทิ้งไว้นาน จะทำให้พื้นเจลเป็นสีดำ ซึ่งทำให้การอ่านผลยากเช่นเดียวกัน

การอ่านผลการทดลอง

1. ดูการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ ว่ามีการเคลื่อนที่ห่างออกจากแนวเริ่มต้นหรือไม่ หรือเคลื่อนที่ออกไปมากน้อยเท่าใด มีการเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกหรือขั้วลบ

2. ไอโซไซม์ที่ปรากฏบนเจลนั้นมีกี่แถบ แต่ละแถบห่างจากกันเท่าใด

3. ศึกษาเปรียบเทียบไอโซไซม์ที่มีลักษณะต่างกัน ว่าต่างกันอย่างไร โดยการนำเอาไอโซไซม์ที่ต่างกันมาทดลองซ้ำอีกบนเจลเดียวกัน

4. ดูการทำงานของแต่ละไอโซไซม์ ว่ามากน้อยเพียงไร สามารถทำให้เกิดสีของฟอร์มาซานเข้มหรือจางเท่าใด

5. ถ้าการอ่านผลในแต่ละครั้งไม่ชัดเจน จะต้องนำตัวอย่างเอ็นไซม์นั้นไปทดลองใหม่ เปรียบเทียบกับตัวอย่างเอ็นไซม์ที่อ่านผลได้ชัดเจนแล้ว เพื่อจะได้แน่ใจว่าเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างกัน และทำซ้ำจนกว่าจะได้ผลที่ชัดเจน

วิธีบันทึกผลการทดลอง

1. ถ่ายรูปภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเห็นแถบของไอโซไซม์ โดยถ่ายรูปขาวดำ ขนาด 3" x 5" และทำไสลด์สี ตัวอย่างละ 1 รูป

2. บันทึกผลโดยตรง ซึ่งให้มีขนาดของแถบของเอ็นไซม์เท่าของจริง ทำโดยใช้แผ่นพลาสติกใสขนาดเท่ากับเจลวางทาบไปบนเจล แล้วใช้ปากกาหมึกซึมที่ไม่ละลายน้ำบันทึกผล โดยลากเส้นไปตามแถบของไอโซไซม์ ซึ่งรูปที่ได้จะมีขนาดเท่าของจริง

3. วัดระยะห่างของไอโซไซม์ที่เคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้น

หมายเหตุ

1. เอ็นไซม์ของแต่ละสายพันธุ์บริสุทธิ์ จะนำมาทดลองหาไอโซไซม์ซ้ำอย่างน้อยสายพันธุ์ละ 3 ครั้ง

2. หาค่าเฉลี่ยของระยะทางที่แต่ละไอโซไซม์เคลื่อนที่ไปจากจุดเริ่มต้นทางสถิติโดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน