บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อายุ 3-4 เดือน ซื้อจากอำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. แท่งแก้วบดเนื้อเยื่อ (glass homogenizer)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Sigma Z-15
4. เครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator) Savant
5. เครื่องดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
6. เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) Crest
7. เครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) Gilson
8. เครื่องเก็บแฟรคชัน (fraction collector)
9. คอลัมน์ (column) ชนิดต่างๆ

C18	ขนาด 4.6 × 250 มิลลิเมตร	Vydac
C8	ขนาด 4.6 × 250 มิลลิเมตร	Microsorb-MV,Rainin
Cyano	ขนาด 4.6 × 250 มิลลิเมตร	Microsorb-MV,Rainin

10. เครื่อง MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) Bruker
11. C18 Sep-Pak cartridge Waters
12. กระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) Bio-rad
13. autopipette พร้อม tip
14. หลอดเซนตริฟิวจ์

15. ตู้แช่แข็ง และ ultrafreezer (-25 °C, -70 °C)
16. ตู้อบ (hot air oven) Memmert
17. กล้องจุลทรรศน์สองตา

สารเคมี

1. น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
2. Methanol (analytical grade) Merck
3. Acetic acid (analytical grade) Merck
4. Acetonitrile (analytical grade) Mallinkrodt
5. Acetonitrile (ACN, HPLC grade) Mallinkrodt
6. Trifluoroacetic acid (TFA, analytical grade) Fluka
7. Trifluoroacetic acid (TFA, HPLC grade) Sigma
8. Heptafluorobutyric acid (HFBA, HPLC grade) Sigma
9. Sodium chloride (NaCl) Fluka
10. α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) Sigma
11. Human angiotensin II Sigma
12. Insulin from bovine pancreas Fluka
13. Bovine Serum Albumin (BSA) Sigma
14. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) Sigma
15. 25% Glutaraldehyde Sigma
16. 30% Hydrogen peroxide (H_2O_2)
17. 1% cobalt chloride ($CoCl_2$)
18. Phosphate buffered saline (PBS) 0.15 M pH7.2
19. Antibodies
    - Mouse anti-CHH antiserum
    - FM-23 (mouse anti-FMRF Monoclonal antibody)
    - AF1-62 (mouse anti-KNEFIRFamide Monoclonal antibody)
    - AF2-32 (mouse anti-KHEYLRFamide Monoclonal antibody)
    - Rabbit anti-human PP6 antiserum
    - Rabbit anti- PDH antiserum

20. Goat anti-rabbit IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) Biorad
21. Goat anti-mouse IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) Biorad

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเก็บรวบรวมต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ
2. การเตรียมสารสกัดจากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ
3. การทำให้บริสุทธิ์ของสารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC
4. การตรวจหาสารเปปไทด์โดยใช้วิธี Dot-ELISA หลังจากแยกด้วย RP-HPLC
5. การหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS

3.3.1 การเก็บรวบรวมต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ

ตัดตากุ้งกุลาดำที่มีอายุประมาณ 3-4 เดือน โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของตากุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่ แช่ในสารละลาย 0.9% NaCl บนน้ำแข็ง จากนั้นตัดเอาต่อมไซนัสออกมาทันทีภายใต้กล้องจุลทรรศน์สองตา แล้วนำไปแช่บนน้ำแข็งแห้งทันที และเก็บไว้ที่ -70 °C จนกระทั่งนำมาใช้

3.3.2 การเตรียมสารสกัดจากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ

นำต่อมไซนัสที่เก็บรวบรวมไว้จำนวนประมาณ 1,000 ต่อม มาบดละเอียดในสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90:1:9) ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร บนน้ำแข็ง โดยใช้ glass homogenizer แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยแรงเหวี่ยง 10000 g เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใส (supernatant) เก็บไว้ ส่วนตะกอน (pellet) ที่เหลือนำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยงเท่าเดิม แยกเอาส่วนน้ำใสเก็บไว้ นำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาเมทานอลและกรดอะซิติกออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vaccuum concentrator) แล้วเติม 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำสารสกัดไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge เพื่อดูดซับสารสกัด

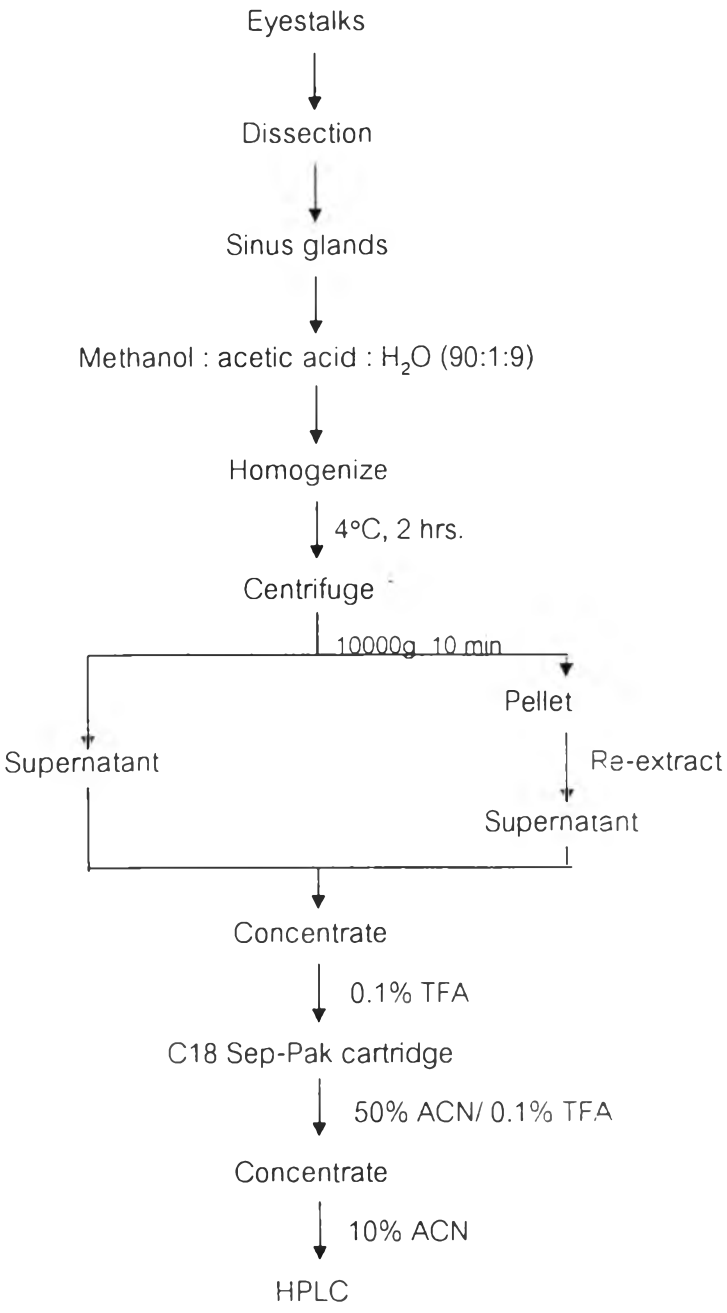
ไว้ แล้วจึงชะด้วยสารละลาย 50% acetonitrile ใน 0.1% TFA และ 80% acetonitrile ใน 0.1% TFA นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย acetonitrile ออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง แล้วนำไปเติมสารละลาย 20% acetonitrile ใน 0.1% TFA เพื่อปรับให้สารสกัดอยู่ในสารละลาย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10% acetonitrile (ภาพประกอบ 3.1) (วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton,1995)

3.3.3 การทำให้บริสุทธิ์ของสารเปปไทด์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

ขั้นตอนที่ 1 นำสารสกัดจากต่อมไซนัสที่ได้จากข้อ 3.3.2 ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยผ่านคอลัมน์ C18 ขนาด 4.6 × 250 มิลลิเมตร จากนั้นชะด้วยสารละลาย A (0.1% TFA) และ สารละลาย B (80% acetonitrile ใน 0.1% TFA) ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 10% ถึง 80% ของสารละลาย B โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที ติดตามสารที่ออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร และเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติก โดยเครื่องแฟรคชั่นคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุก ๆ 1 นาที

ขั้นตอนที่ 2 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 ขนาด 4.6 × 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (0.1% HFBA) และ B (80% acetonitrile ใน 0.1% HFBA) โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 10% จนถึง 75% ของสารละลาย B อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที ติดตามสารที่ออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกโดยเครื่องแฟรคชั่นคอลเลคเตอร์ทุก ๆ 1 นาที

ขั้นตอนที่ 3 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ขนาด 4.6 × 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (0.1% TFA) และ B (80% acetonitrile ใน 0.1% TFA) โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 20% - 35% B จะใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที หลังจากนั้นเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 35% - 50% โดยมีอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 0.5 % ต่อนาที เพื่อที่จะแยกเปปไทด์จากขั้นตอนที่ 2 ให้ดีขึ้น และที่ความเข้มข้น 50% - 70% B จะเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที เพื่อชะสารเปปไทด์ที่ตกค้างออกจากคอลัมน์ให้หมด ติดตามสารโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกโดยเครื่องแฟรคชั่นคอลเลคเตอร์ทุก ๆ 1 นาที



ภาพประกอบ 3.1 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ

การทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดจากต่อมไซนัสในแต่ละขั้นตอนนั้น จะใช้วิธีการ Dot-ELISA ติดตามในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ (วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton,1995)

3.3.4 การตรวจหาสารเปปไทด์โดยวิธี Dot-ELISA หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC

แบ่งสารละลายของแต่ละแฟรคชั่น ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ประมาณ 25-100 ไมโครลิตร ผสมกับโปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเรียงตามลำดับแฟรคชั่นที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่หยดสารแต่ละแฟรคชั่นไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นนำไปอบต่อในไอของ 0.4% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสไว้ในกล่องปิดฝาสนิทที่มีไอของ glutaraldehyde แล้วแช่ต่อในสารละลาย 0.2% glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วจึงนำไปบล็อค (block) ด้วย 0.5% blotto เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการป้องกันการจับของแอนติบอดีบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสแบบไม่จำเพาะ

การตรวจหาเปปไทด์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase assay ทำโดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มในสารละลายแอนติบอดีสำหรับตรวจสารคล้ายเปปไทด์แต่ละชนิด ซึ่งได้แก่ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies (FM-23 เจือจาง 1:100: AF1-62 เจือจาง 1:200 : AF2-32 เจือจาง 1:500) , mouse anti-CHH antiserum (เจือจาง 1:10,000) , rabbit anti-human PP6 antiserum และ rabbit anti-PDH antiserum เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วจึงนำไปบ่มใน goat anti-rabbit IgG H+L horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) หรือ goat anti-rabbit IgG H+L horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) เจือจาง 1:1,500 ด้วย 5% blotto เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างต่อด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) , 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง (ภาพประกอบ 3.2) นำไปตรวจดูความ

เข้มของสีในแต่ละจุด โดยบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนกับแอนติบอดีจะปรากฏเห็นเป็นจุดสีเทาแกมน้ำเงิน นำผลที่ได้จาก Dot-ELISA ไปเปรียบเทียบกับพีคที่ได้จากโครมาโตแกรมที่แยกด้วย RP-HPLC เพื่อใช้เลือกแฟรคชั่นที่จะนำไปผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป (วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul, Stretton and Cowden,1991)

3.3.5 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS

นำแฟรคชั่นของสารเปปไทด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย มาแบ่งสารละลายประมาณ 25-50 ต่อม แล้วระเหยตัวทำละลาย acetonitrile ออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1). การเตรียม matrix "film" บน probe

นำสารละลายอิ่มตัวของ α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) ที่ละลายในอะซีโตนไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง หยดส่วนที่เป็นของเหลวใสลงบนแผ่นโลหะ (probe) ในช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง ช่องละ 1 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง

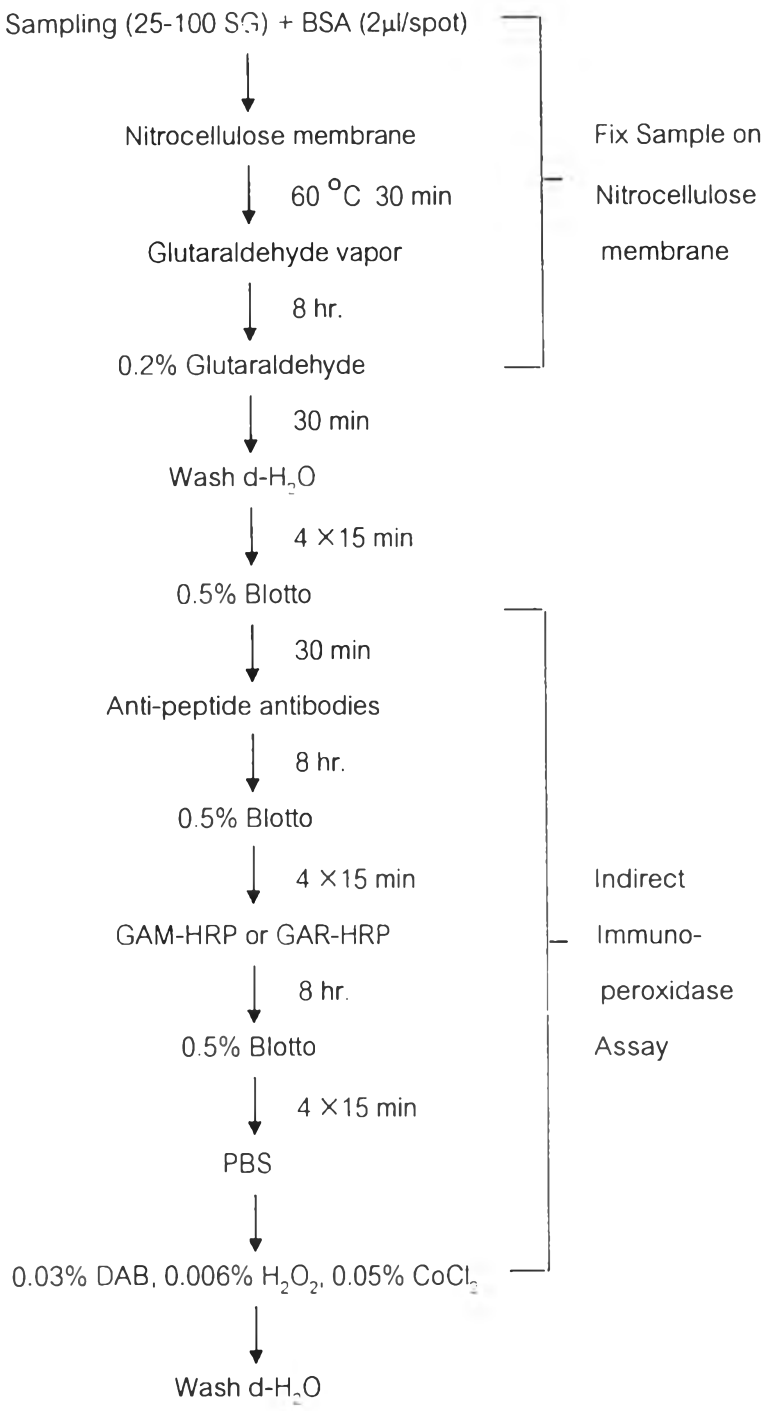
2). การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารตัวอย่างไปละลายใน 0.1%TFA:acetonitrile (2:1) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วหยดสารตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

3). การเตรียมสารมาตรฐาน (standard)

เตรียมสารมาตรฐาน Human Angiotensin II และ Insulin bovine ที่มีความเข้มข้น 100 pmol/ml ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 1,047 และ 5,734 ดาลตัน ตามลำดับ แล้วหยดสารมาตรฐาน 1 ไมโครลิตร ลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

4). นำแผ่นโลหะเข้าเครื่อง MALDI-TOF MS เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ linear, positive ion mode



ภาพประกอบ 3.2 ขั้นตอนการทำ Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbant Assay)

I 19196982