บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 สารตัวอย่าง

3.2.1 เม็ดเลือดแดง

โลหิตสดที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์บริการโลหิตของสภากาชาดไทย และได้ผ่านการตรวจสอบ Anti HIV แล้ว

นำโลหิตสดปริมาตร 10 มล. มาเซ็นตริฟิวส์เก็บเม็ดเลือดแดงที่ 7,000 รอบต่อนาที จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงนี้ไปปั่นล้างด้วย 0.9% NaCl ปริมาตร 5 มล. ที่ 7,000 รอบต่อนาที 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ถ้าไม่นำไปใช้ในทันที เก็บเม็ดเลือดแดงไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ทำเม็ดเลือดแดงให้แตก (Wraxall & Stolorow, 1986) โดยสกัดด้วยน้ำกลั่น หรือ 0.05 M Dithiothireol (DTT) ด้วยอัตราส่วน 1:5 แล้วนำไปแยกด้วยอิเล็กโทรโฟริซิส

3.1.2 คราบเลือด

นำโลหิตสดหยดลงบนผ้าฝ้ายขนาด 4x4 ซม. ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้นำมาสกัดคราบเลือด โดยตัดคราบเลือดขนาด 0.5 x 0.5 ซม.^{2} แช่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 40 ไมโครลิตร สำหรับวิเคราะห์ PGM หรือสารละลาย 0.05 M Dithiothireol (DTT) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สำหรับวิเคราะห์ EAP และ EsD (Harris, 1971)

ในการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ เตรียมคราบเลือดในลักษณะเดียวกัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

ในการศึกษารูปแบบการกระจายของเอนไซม์ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทย โดยเตรียมครายเลือดจาก ผู้มาบริจาคโลหิตที่สภากาชาดไทย จำนวน 250 ตัวอย่าง แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 สารละลาย 0.1 M Tris-maleic buffer pH 7.4

Tris	12.11	กรัม
Maleic	11.62	กรัม
EDTA	2.92	กรัม
$MgCl_2$ $6H_2O$	2.03	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 700 มล. ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย 1N NaOH ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายนี้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 สารละลาย 0.05 M Tris-glycine electrode buffer, pH 8.3

Tris	6.0	กรัม
Glycine	28.8	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH ให้เป็น 8.3 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

3.2.3 สารละลาย 3.0 M Tris chloride buffer stock solution, pH 8.9

Tris	36.6	กรัม
TEMED	0.23	มล.
6 N HCl	15	มล.
น้ำกลั่น	25	มล.

ปรับ pH ให้เป็น 8.9 ด้วย 6N HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น

100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

3.2.4 สารละลาย 0.5 M Tris-chloride buffer solution, pH 6.7

Tris	5.98	กรัม
TEMED	0.46	มล.
1N HCl	48	มล.

ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ปรับ pH ให้เป็น 6.7 ด้วย 1N HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.

3.2.5 สารละลาย 0.10 M NaOH

ละลาย NaOH 4 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

3.2.6 สารละลาย 0.20 M NaOH

ละลาย NaOH 8 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

3.2.7 สารละลาย 0.05 M H_3PO_4

ใส่ H_3PO_4 1.43 มล. ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

3.2.8 สารละลาย 0.1 M H_3PO_4

ใส่ H_3PO_4 2.86 มล. ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

3.2.9 สารละลาย 1% Ethanolamine

ใส่ Ethanolamine 1 มล. ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.

3.2.10 สารละลาย 1% Acetic acid

ใส่ Acetic acid 1 มล. ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.

3.2.11 สารละลาย 0.1 M Tris-chloride buffer, pH 8.0

Trizma base	12.00	กรัม
$MgCl_2 . 6H_2O$	4.06	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย 1:1 HCl ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายนี้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.12 <u>สารละลาย 0.05 M Sodium-citrate buffer, pH 5.0</u>

Citric acid 10.51 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับ pH ด้วย 0.02% NaOH จนกระทั่ง pH เท่ากับ 5.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายนี้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.13 <u>สารละลาย 1.0 M Sodium-acetate buffer, pH 5.6</u>

สารละลาย A: NaOH 40 กรัม ในสารละลาย 1000 มล.

สารละลาย B: Acetic acid 57.19 มล. ในสารละลาย 1000 มล.

ผสมสารละลาย A และ B อย่างละ 129 มล. เข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้เป็น 5.6 เก็บ สารละลายนี้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.14 <u>สารละลาย 30% Acrylamide solution</u>

Acrylamide 29.1 กรัม

Methylene bis-acrylamide 0.9 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.15 <u>สารละลาย 30% Acrylamide solution</u>

Acrylamide 30 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. เก็บในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.16 <u>สารละลาย 1% Methylene-bis acrylamide solution</u>

Methylene bis-acrylamide 1 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. เก็บสารละลายนี้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.17 <u>สารละลาย 10% Ammonium persulfate</u>

Ammonium persulfate 0.1 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1 มล. (เตรียมทันที่ก่อนใช้)

3.2.18 สารละลาย 0.2 M Ammonium persulfate

Ammonium persulfate 0.23 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มล. เก็บสารละลายนี้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.19 สารละลาย 20 mg% Riboflavine

Riboflavine 0.002 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มล. (เตรียมทันทีก่อนใช้)

3.2.20 สารละลายสำหรับย้อมสีโปรตีน (Stain concentrate solution)

ละลาย Coomassie blue R 0.25 กรัม ใน 95% Ethanol ปริมาตร 100 มล. คนประมาณ 1 ชม. กรองแล้วเก็บไว้

3.2.21 สารละลายสำหรับล้างสีโปรตีน (Destaining solution)

ใช้ 95% Ethanol, 5% และ 10% Acetic acid ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ดังข้อ 3.3

3.2.22 สารละลาย 0.05 M Dithiothreitol (DTT)

ละลาย Dithiothreitol 0.0077 กรัม

ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล. (เตรียมก่อนใช้ทันที)

3.3 การย้อมสีโปรตีน นำเจลที่ต้องการย้อมแช่ในสารละลายตามขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 สารผสมระหว่าง 10% Acetic acid และสารละลายสำหรับย้อมสีโปรตีน (ข้อ 3.2.20) ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งไว้ข้ามคืน

ขั้นที่ 2 สารผสมระหว่าง 95% Ethanol และ 5% Acetic acid ในอัตราส่วน 2:3 ตั้งไว้ 1 ชม.

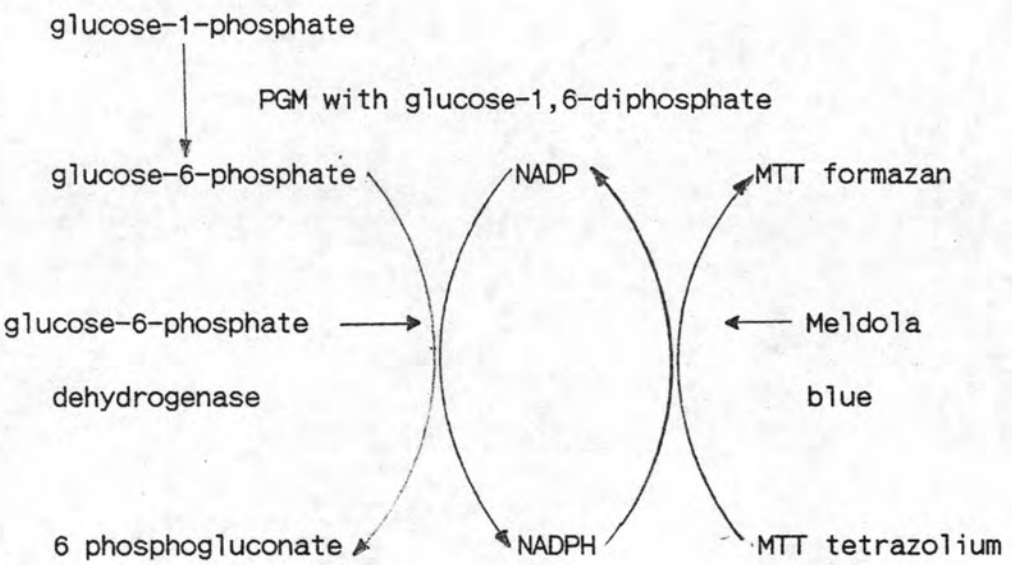
ขั้นที่ 3 สารผสมระหว่าง 95% Ethanol และ 5% Acetie acid ในอัตราส่วน 3:7 ตั้งไว้ 30 นาที

ขั้นที่ 4 เหมือนขั้นที่ 3

ขั้นที่ 5 สารผสมระหว่าง 95% Ethanol และ 5% Actic acid ในอัตราส่วน 1:4 ตั้งไว้ 30 นาที

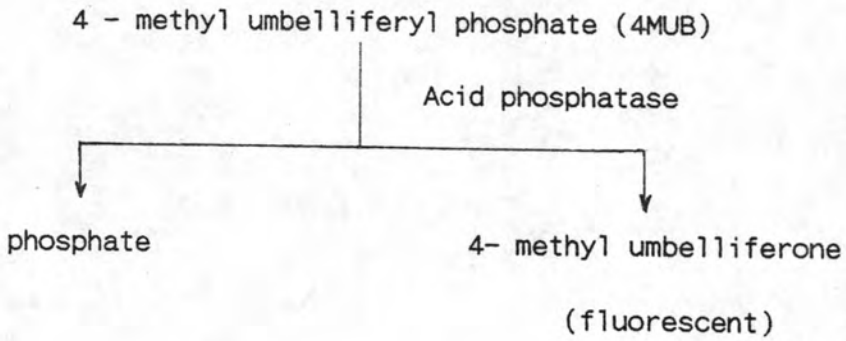
ขั้นที่ 6 แช่เจลไว้ในสารผสมระหว่าง 5% Acetic acid และน้ำในอัตราส่วน 7:3

3.4 **การติดตามแอคติวิตี้ของ PGM** (Divall & Ismail, 1983) มีหลักการดังนี้



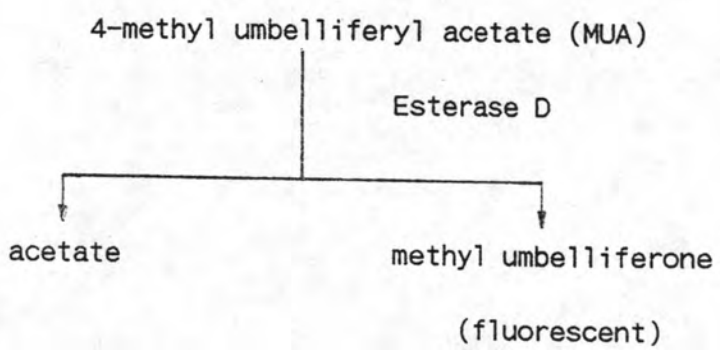
ผสมสับสเตรท glucose-1-phosphate with 1% glucose 1,6 diphosphate 35 มก., NADP 2 มก., MTT 3 มก., meldola blue 0.2 มล.(0.5 มก.ต่อ มล.) และ glucose-6-phosphate dehydrogenase 3 ไมโครลิตร (1 unit) ลงใน 0.1M Tris-chloride buffer, pH 8.0 10 มล. (ข้อ 3.2.11) แล้วนำไปอินคิวเบตที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้สับสเตรทละลายดี จากนั้นผสมกับ 2% วุ้นละลาย ปริมาตร 15 มล. (อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส) เทสารผสมทั้งหมดลงบนตัวค้ำจุนของอิเล็กโทร-โฟริซิสหรือไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เมื่อวุ้นแข็งอินคิวเบตไว้กับตัวค้ำจุนที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-60 นาที เก็บผลโดยการถ่ายรูป

3.5 <u>การติดตามแอคติวิตี้ของ EAP</u> (Stella, 1985) มีหลักการดังนี้



ผสมสับสเตรท 4 MUB 3 มก. กับ 0.05 M Sodium-citrate buffer, pH 5.0 3 มล. (ข้อ 3.2.12) ลงใน 2% วุ้นละลายปริมาตร 15 มล. เทสารผสมทั้งหมดลงบนตัวค้ำจุนของอิเล็กโทรโฟริซิสหรือไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนวุ้นแข็งนำไปอ่านผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตเมื่อเห็นแถบไอโซไซม์ชัดเจน เก็บผลโดยการถ่ายรูป (ประมาณ 5 นาที)

3.6 <u>การติดตามแอคติวิตี้ของ EsD</u> (Stella T. Finney, 1985) มีหลักการดังนี้



ผสมสับสเตรท 4 MUA 6 มก., อะซิโตน 0.6 มล. และ 1.0 M Sodium-acetate buffer, pH 5.6 6 มล. (ข้อ 3.2.13) ลงใน 2% วุ้นละลายปริมาตร 6 มล. เทสารทั้งหมดลงบนตัวค้ำจุนของอิเล็กโทรโฟริซิสหรือไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เมื่อวุ้นแข็ง นำไปอ่านผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตทันที เก็บผลโดยการถ่ายรูป

3.7 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนอะกาโรสและสตาร์ชเจล

(Wraxall, 1986)

ใช้ 0.1 M Tris-maleic, pH 7.4 (ข้อ 3.2.1) เป็น Tank buffer และเจือจาง 0.1 M Tris-maleic buffer, pH 7.4 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 15 ใช้เป็น gel buffer

เลือดตัวอย่างเตรียมโดยใช้เม็ดเลือดแดงที่ล้างด้วย 0.9% NaCl จำนวน 3 ครั้ง ผสมกัน 0.05 M DTT ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที

การทำอิเล็กโทรโฟริซิส

เตรียม 2% ES agarose gel หรือสารผสมระหว่าง agarose และ starch ในอัตราส่วนอย่างละ 1% ปริมาตร 40 มล. ต้มจนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทลงบนแผ่นกระจกขนาด 12.5 x 26 ซม. จะได้เจลที่มีความหนาประมาณ 0.1 ซม. รอให้เจลแข็ง นำไปวางหงายในแชมเบอร์ของเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิส ขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน ใช้เส้นด้ายขนาดเบอร์ 8 ยาว 1 ซม. จุ่มในเลือดตัวอย่าง แล้ววางบนเจลให้ห่างจากขั้วลบ (Cathode) ประมาณ 2.5 ซม. ใช้ผ้าสำลีเป็นสะพานไฟโดยให้ปลายผ้าสำลีจุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์ทั้งสองข้าง ให้กระแสไฟฟ้าโดยใช้ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 250 โวลต์ (ประมาณ 90 มิลลิแอมแปร์) นาน 2 ซม. 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ PGM ตามวิธีในข้อ 3.4

3.8 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล

3.8.1 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลประเภทต่อเนื่อง (Continuous gel electrophoresis) ที่ pH 7.4

ใช้ 0.02 M Tris-maleic, pH 7.4 เป็น Electrode buffer และ Gel buffer และ 0.01 M Tris-maleic, pH 7.4 ใช้เป็น Sample buffer (0.05 M DTT ใน 0.01 M Tris-maleic, pH 7.4)

<u>การเตรียมเจล</u> (7.5%T) ผสมสารละลายตามปริมาตรต่อไปนี้

30% Acrylamide solution	6.25	มล.
Gel buffer, pH 7.4	3.13	มล.
น้ำกลั่น	15.42	มล.
10% Ammonium persulfate	0.21	มล.
TEMED	42	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมที่ได้ไปเทลงในระหว่างแผ่นกระจกและอลูมิเนียมออกไซด์ (Aluminium oxide) ขนาด 8 x 10 x 0.075 ซม. เจลจะแข็งตัวภายใน 45 นาที

<u>การทำอิเล็กโทรโฟริซิส</u>

นำเจลที่เตรียมได้ไป pre-run ที่ 40 มิลลิแอมแปร์, 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชม 30 นาที เปลี่ยนบัฟเฟอร์ในแชมเบอร์บน ล่าง ใส่เลือดตัวอย่างที่ผ่านขบวนการในข้อ 3.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในเจล ให้กระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสคงที่ และขนาดเท่ากับเมื่อ pre-run ติดตามผลโดยการย้อมสีโปรตีนดังข้อ 3.3 และแอคติวิตี้ของ PGM ดังข้อ 3.4

3.8.2 <u>การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล แบบไม่ต่อเนื่อง (Discontinuous gell electrophsresis) ที่ pH 8.9</u>

ใช้ 0.05 M Tris-glycine, pH 8.3 (ข้อ 3.2.2) เป็น Electrode buffer

Working gel solution

สารละลาย (มล.)	Separating gel					Stacking
	%T					%T
	5.0	7.5	10.0	12.0	15.0	4.5
30% Acrylamide solution	3.33	5.00	6.70	8.00	10.00	2.80
3.0 M Tris-HCl stock solution, pH 8.9	2.53	2.53	2.53	2.53	2.53	-
0.5 M Tris-HCl Stock solution, pH 6.7	-	-	-	-	-	2.53
น้ำกลั่น	13.87	12.30	10.70	9.40	7.30	12.70
10% Ammonium persulfate	0.20	0.17	0.17	0.15	0.15	0.40

การเตรียมเหมือน 3.8.1 แต่ให้ separating gel สูง 6 ซม. และรอให้ separating gel แข็ง แล้วจึงเตรียม stacking gel สูง 1.5 ซม.

การทำอิเล็กโทรโฟริซิส

ใส่เลือดตัวอย่างที่ผ่านขบวนการใน 3.1 ลงในเจลตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร แล้วให้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 40 มิลลิแอมแปร์, 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ซม. แล้วนำเจลนั้นไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ PGM ดังข้อ 3.4

3.9 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

3.9.1 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโฟริซิส ขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midgelt electrophoresis) (Budowle,

Electrolyte

Cathode : 0.20 M NaOH (ข้อ 3.2.6)

Anode : 0.05 M H_3PO_4 (ข้อ 3.2.7)

Working gel solution (สำหรับ 2 เจล, 14 มล.)

สูตร I (Metropolitan Police Laboratory, London, England)

%T=5.5, %C=4.5, ความหนาเจล 0.50 มม.

30% Acrylamide solution (ข้อ 3.2.15)	2.45	มล.
1% Methylene-bisacrylamide (ข้อ 3.2.16)	3.56	มล.
Ampholine, pH 5-7	0.67	มล.
น้ำกลั่น	3.89	มล.
50 g% Sucrose	3.32	มล.
0.2 M Ammonium persulfate (ข้อ 3.2.18)	0.11	มล.

สูตร II (Budowle, 1986)

%T=5.5 , %T=6.0 , %T=7.0 ที่ %C=3.0 ความหนาเจล 0.75 มม.

สารละลาย (มล.)	%T		
	5.5	6.0	7.0
30% Acrylamide solution (ข้อ 3.2.14)	3.66	4.00	4.66
น้ำกลั่น	14.00	13.66	13.00
Ampholine, pH 5-7	2.20	2.20	2.20
EPPS (กรัม)	0.26	0.26	0.26
20 mg% Riboflavine(ข้อ 3.2.19) หรือ 10% Ammonium persulfate (ข้อ 3.2.17)	0.20	0.20	0.20
TEMED (ไมโครลิตร)	15.00	15.00	15.00

เทเจลส่วนผสมตามสูตร I หรือ II ลงในระหว่างแผ่นกระจกกับแผ่นอลูมิเนียมออกไซด์ขนาด 8 x 10 x 0.075 ซม. ปล่อยให้เจลแข็งตัวภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต เจลจะแข็งตัวภายใน 45 นาที พร้อมที่จะนำไปใช้

<u>การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง</u>

ใส่เลือดตัวอย่างที่ผ่านขบวนการใน 3.1 ลงในเจลที่เตรียมได้ตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตรและให้กระแสไฟฟ้า โดยกำหนดศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 500 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชม. จากนั้นนำเจลไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ PGM ดังข้อ 3.4

3.9.2 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 และ pH 5.0-6.5 โดยอิเล็กโทรโฟริซิส ขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF) (Bio-Rad Laboratoies)

Working gel solution (สำหรับ 1 เจล, 5 มล.)

(Metropolitan Police Laboratory, London, England) %T=5.5, %C=4.5

สารละลาย (มล.)	pH ในเจล	
	5.0-6.5	5-7
30% Acrylamide solution (ข้อ 3.2.15)	0.90	0.90
1% Methylene-bisacrylamide (ข้อ 3.2.16)	1.25	1.25
Ampholine pH 4-6	0.08	-
Ampholine pH 5-7	0.16	0.24
น้ำกลั่น	1.39	1.39
50% Sucrose	1.19	1.19
0.2M Ammonium persulfate (ไมโครลิตร) (ข้อ 3.2.18	40.00	40.00
TEMED (ไมโครลิตร)	2.00	2.00
EPPS (กรัม)	0.07	-

เตรียมเจลโดยการติด gel support film ด้าน hydrophobic เข้ากับแผ่นกระจกขนาด 12.5 x 6.5 x 0.15 ซม. โดยใช้น้ำหยดลงบนแผ่นกระจกก่อน แล้วรีดแผ่น gel support film ให้แนบติดกับกระจก จากนั้นคว่ำกระจกด้านที่มี gel support film ลงบน gel casting tray เทเจลส่วนผสมดังในตาราง ลงในระหว่างแผ่น gel support film และ gel casting tray โดยใช้หลอดหยดสารค่อย ๆ ปล่อยเจลที่ละน้อย เจลจะแข็งตัวภายในเวลาประมาณ 45 นาที (เจลหนาประมาณ 0.4 มม.)

<u>การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง</u>

หลังจากที่เจลแข็งแกะเจลออกจาก gel casting tray แล้วหงายกระจกขึ้น โดยให้เจลอยู่บนแผ่น gel support film แล้ว apply เลือดตัวอย่างที่เตรียมได้ดังข้อ 3.1 โดยการวาง sample plate ลงบนเจล แล้วหยอดเลือดตัวอย่างลงไปหลุมละ 1.5–2.0 ไมโครลิตร โดยใน 1 แผ่นเจลจะสามารถจำแนกเลือดตัวอย่างได้ประมาณ 15 ตัวอย่าง จากนั้นทิ้งให้เลือดตัวอย่างถูกดูดซับลงในเจลประมาณ 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปวางลงใน mini IEF outer chamber โดยคว่ำด้านเจลลงสัมผัสกับอิเล็กโทรด (graphite electrodes) ให้ตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง อยู่ห่างจากขั้วบวก 2 ซม. ปิดฝา chamber ให้สนิท ให้กระแสไฟฟ้าศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ 15 นาที, 200 โวลต์ 15 นาที และ 450 โวลต์ 60 นาที ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลา นำเจลนั้นไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ PGM ดังข้อ 3.4

3.9.3 <u>ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล pH 5–7 โดยอิเล็ก-โทรโฟริซิส ขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis)</u>

(Metropolitan Police Laboratory, London, England)

Electrolyte

Cathode : 1% Ethanolamine (ข้อ 3.2.9)

Anode : 1% Acetic acid (ข้อ 3.2.10)

Working gel solution (สำหรับ 1 เจล, 7 มล.)

%T=5.5, %C=4.5

30% Acrylamide solution (ข้อ 3.2.15)	1.25	มล.
1% Methylene-bisacrylamide (ข้อ 3.2.16)	1.75	มล.
Ampholine, pH 5-7	0.34	มล.
น้ำกลั่น	1.95	มล.
50% Sucrose	1.66	มล.
0.2 M Ammonium persulfate (ข้อ 3.2.18)	55.00	ไมโครลิตร

เตรียมเจลโดยเทเจลส่วนผสมดังกล่าวลงในระหว่างแผ่นกระจก ขนาด 15x20 ซม. (โดยใช้แผ่น parafilm ทบกัน 1 ชั้น วางคั่นระหว่างแผ่นกระจกทั้งสอง เจลที่ได้จะหนาประมาณ 0.1 มม.) เจลจะแข็งตัวภายใน 15 นาที

การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

หลังจากเจลแข็งแกะแผ่นกระจกแผ่นบนออก apply เลือดตัวอย่างที่เตรียมได้ดังข้อ 3.1 โดยใช้กระดาษกรองขนาด 4 x 4 มม.^{2} จุ่มลงในเลือดตัวอย่างให้ชุ่มพอดี จากนั้นนำไปวางบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ให้ห่างจากขั้วบวกประมาณ 4 ซม. เจล 1 แผ่น จะสามารถใช้แยกสารตัวอย่างได้ประมาณ 20 ตัวอย่าง แล้วนำแผ่นเจลนี้ไปวางบน cooling plate ของ horizontal chamber ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ electrode wicks จุ่มใน 1% Acetic acid ไปวางบนเจลทางปลายด้านขั้วบวก และจุ่มใน 1% Ethanolamine ไปวางบนเจลทางปลายด้านขั้วลบ ปิดฝาแชมเบอร์ให้อิเล็กโทรดทับ electrode wicks ให้สนิท ให้กระแสไฟฟ้าศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 2,000 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟ 8 มิลลิแอมแปร์ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชม. 30 นาที แล้วนำเจลนั้นไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ PGM ดังข้อ 3.4

3.10 การจำแนกรูปแบบ EAP ด้วยระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

3.10.1 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 และ pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟริซิส ขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (vertical midget electrophoresis)

(ดัดแปลงจากวิธีของ Budowle, 1986)

Electrolyte

เหมือนข้อ 3.9.1

Working gel solution (สำหรับ 2 เจล, 14 มล.)

%T = 5.5, %C = 3.0, ความหนาเจล 0.75 มม.

สารละลาย (มล.)	pH ในเจล	
	5-7	4-8
30% Acrylamide solution (ข้อ 3.2.14)	3.66	3.66
น้ำกลั่น	14.00	14.00
Ampholine, pH 5-7	2.20	-
Ampholine, pH 4-8	-	2.20
20 mg% Riboflavine (ข้อ 3.2.19)	0.20	0.20
TEMED (ไมโครลิตร)	15.00	15.00

การเตรียมเจลเหมือน ข้อ 3.9.1

การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

เหมือนข้อ 3.9.1 แต่นำเจลที่ได้ไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ EAP ดังข้อ 3.5

3.10.2 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5.0–6.5 และ pH 6–8โดยอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF)

(Bio-Rad Laboratori

Working gel solution (สำหรับ 1 เจล, 5 มล.)

(Metropolitan Police Laboratory, London, England)

%T = 5.5, %C = 4.5

สารละลาย (มล.)	pH ในเจล	
	5.0–6.5	6–8
30% Acrylamide solution (ข้อ 3.2.15)	0.90	0.90
1% Methylene-bis acrylamide (ข้อ 3.2.16)	1.25	1.25
Ampholine, pH 4–6	0.08	–
Ampholine, pH 5–7	0.16	–
Ampholine, pH 6–8	–	0.24
น้ำกลั่น	1.39	1.39
50% Sucrose	1.19	1.19
0.2 M Ammonium persulfate	40.00	40.00
TEMED (ไมโครลิตร)	2.00	2.00
EPPS หรือ glycine (กรัม)	0.16	–
HEPES (กรัม)	–	0.16

การเตรียมเจลเหมือนข้อ 3.9.2 แต่เจลที่ได้มี 2 ช่วง pH คือ pH 6-8 และ pH 5.0-6.5 ที่ใส่ EPPS หรือ glycine และไม่ใส่ EPPS หรือ glycine

การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

เหมือนข้อ 3.9.2 แต่นำเจลที่ได้ไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ EAP ดังข้อ 3.5

3.10.3 **ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis)**

(Metroplitan Police Laboratory, London, England)

Electrolyte

เหมือนข้อ 3.9.3

Working gel solution

เหมือนข้อ 3.9.3 แต่เปลี่ยน Ampholine pH 5-7 (0.34 มล.) เป็น Ampholine pH 4-6 และ pH 6-8 (อย่างละ 0.17 มล.)

การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

เหมือนข้อ 3.9.3 แต่เวลาที่ใช้ในการ run ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงลดลงเหลือ 1 ชม. แล้วนำเจลนั้นไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ EAP ดังข้อ 3.5

3.11 Simultaneous typing

คือการจำแนกรูปแบบของเอนไซม์เพียงครั้งเดียวที่สามารถ assay แอคติวิตี้ของเอนไซม์ได้มากกว่าหนึ่งเอนไซม์

3.11.1 **การทำ Simultaneous typing ของ PGM และ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis)**

Electrolyte

เหมือนข้อ 3.9.1

Working gel solution

เหมือนเจลสูตร II %T = 5.5, %C = 3.0 ในข้อ 3.9.1

การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

เหมือนข้อ 3.9.1

หลังจาก run ครบ 4 ชม. ก็นำเจลแผ่นหนึ่งไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ PGM ดังข้อ 3.4 และอีกแผ่นหนึ่งไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ EAP ดังข้อ 3.5

3.11.2 การทำ Simultaneous typing ของ EAP และ EsD ด้วย ไอโซอิ-เล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis)

(Stella, 1985)

Electrolyte

Cathode : 0.1 M NaOH (ข้อ 3.2.5)

Anode : 0.1 M H_3PO_4 (ข้อ 3.2.8)

Working gel solution

เหมือนข้อ 3.10.3 แต่เพิ่ม specer คือ HEPES ลงในเจล ในอัตราส่วน 3.14% (ใช้ HEPES 0.22 กรัม ต่อสารละลายเจล 7 มล.)

การเตรียมเจลเหมือน 3.10.3

การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

เมื่อเจลแข็งพร้อมที่จะนำไปใช้ นำเจลไปวางบน cooling plate ของ horizontal chamber ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ electrode wicks จุ่มใน 0.1 M H_3PO_4 ไปวางบนเจลทางปลายด้านขั้วบวก และจุ่มใน 0.1 M NaOH ไปวางบนเจลทางปลายด้านขั้วลบ ปิดฝาให้อิเล็กโทรดทับ electrode wides ให้สนิท ให้กระแสไฟฟ้า, pre-run ที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 700 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 150 มิลลิแอมแปร์ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หลังจากนั้นนำเจลมา apply เลือดตัวอย่าง โดยวิธีเช่นเดียวกับ 3.10.3 โดยให้จุด

เริ่มต้นห่างจากขั้วบวกประมาณ 3.5 ซม. หลังจากนั้นนำเจลไปวางบน cooling plate ให้กระแสไฟฟ้า ที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 2500 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟ 150 มิลลิแอมแปร์ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชม. 30 นาที แล้วนำเจลไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ EAP ระหว่างจุดเริ่มต้นและขั้วลบตังข้อ 3.5 และย้อมดูแอคติวิตี้ของ EsD ระหว่างจุดเริ่มต้นและขั้วบวกตังข้อ 3.6 ตามลำดับ

3.12 <u>การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ</u>

3.12.1 <u>การศึกษาความเสถียรของ PGM</u>

หยดเลือดบนผ้าฝ้ายขนาด 4x4 ซม.^{2} ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บเลือดห่างกันทุก ๆ 2 และ 5 วัน เป็นเวลาต่าง ๆ กัน (0–105 วัน) แล้วนำไปเปรียบเทียบรูปแบบด้วยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5–7 ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิส ขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) %T = 5.5, %C = 4.5 ตามวิธีใน 3.9.3

3.12.2 <u>การศึกษาความเสถียรของ EAP และ EsD</u>

ใช้คราบเลือดชุดเดียวกับ 3.12.1 แล้วนำไปเปรียบเทียบรูปแบบด้วยการทำ Simultaneoue typing ของ EAP และ EsD ด้วย ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4–8 โดยอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) ตามวิธีใน 3.11.2

3.13 <u>การศึกษารูปแบบของ PGM, EAP ในแง่การตรวจพิสูจน์ พ่อ–แม่–ลูก</u>

(Paternity testing)

เก็บเลือดตัวอย่างจากคนไข้ที่มาขอตรวจพิสูจน์ พ่อ–แม่–ลูก ของ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยหยดเลือดบนผ้าฝ้ายขนาด 4x4 ซม^2 ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วมาจำแนกรูปแบบ PGM ตามวิธีในข้อ 3.9.3 และ EAP ตามวิธีใน ข้อ 3.10.3

3.14 <u>การศึกษารูปแบบการกระจายของเอนไซม์ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทย</u>

เก็บเลือดตัวอย่าง จากผู้มาบริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยไม่จำกัดเพศ และอายุ จำนวน 250 ตัวอย่าง โดยการหยดเลือดบนผ้าฝ้ายขนาด 4x4 ซม.^{2} ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ถ้ายังไม่ใช้ในทันที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสก่อนใช้นำมาสกัดคราบเลือด โดยตัดคราบเลือดขนาด 0.5x0.5 ซม.^{2} แล้วสกัดด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับ PGM และสกัดด้วย 0.05 M DTT ปริมาตร 40 ไมโครลิตร สำหรับ EAP และ EsD แล้วนำมาศึกษารูปแบบการกระจายของ PGM ดังวิธีในข้อ 3.9.3 และศึกษารูปแบบการกระจายของ EAP และ EsD ดังวิธีในข้อ 3.11.2