บทที่ 4

การดำเนินการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ *T. vaginalis* จากห้องปฏิบัติการปาราสิตวิทยา ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 42 สายพันธุ์บริสุทธิ์ และเชื้อ *T. vaginalis* จากห้องปฏิบัติการปาราสิตวิทยา โรงพยาบาลบางรัก ซึ่งยังไม่ได้แยกออกเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ จำนวน 50 ตัวอย่าง ถูกเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM-NA โดยการดูดเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมอยู่ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่โดยวิธีสเตอไรค์ จากนั้นนำไปฟักตัวในตู้อบ อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 48 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อที่แยกออกเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์แล้ว สายพันธุ์ละ 1 หลอด และเชื้อที่ยังไม่ได้แยกเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ตัวอย่างละ 2 หลอด

สำหรับเชื้อที่ยังไม่ได้แยกออกเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์คือ เชื้อ *T. vaginalis* ที่ได้จากห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลบางรัก เป็นเชื้อที่เก็บมาจาก โพสิทีฟ คัลเจอร์ ที่ได้จากคนไข้โดยตรง ซึ่งมักจะมีแบคทีเรียปนอยู่ด้วยเสมอ และบางครั้งมีรา *Candida albicans* ก่อนนำไปแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ ต้องกำจัดแบคทีเรียและราให้หมดเพื่อสะดวกต่อการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ซึ่งทำได้โดยใช้ยาปฏิชีวนะ คือ เพนนิซิลิน 5,000 ยูนิต ไดไฮโดรเสตรปโตมัยซิน 5,000 ไมโครกรัมและมัยโคสแตติน 300 แกมมา ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร

การใส่ยาเพื่อฆ่าแบคทีเรียและรา จะใส่เพียง 2-3 ครั้ง เมื่อสามารถกำจัดได้หมด ก็ไม่จำเป็นต้องใส่ยาอีก จากนั้นจึงนำไปแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์

2. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM - NA

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ สุภาภรณ์ (2522) ได้ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM ของ Johnson and Trussell (1943) โดยไม่ใส่วุ้น และลดปริมาณซีรัมลงให้น้อยกว่าเดิมคือ ใช้ซีรัม 0.5 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 8 มิลลิลิตร และเรียกอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ว่า CPLM-NA มีส่วนประกอบและวิธีเตรียมดังนี้

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 350 มิลลิลิตร อุ่นที่ 50°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปถึง 80°C นาน 5 นาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน กรอง จะได้สารละลายของตับที่มีปริมาตร 320 มิลลิลิตร

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

Ringer's solution เตรียมจาก

NaCl	6.5	กรัม
KCl	0.14	กรัม
$CaCl_2$	0.12	กรัม
$NaHCO_3$	0.20	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ นำส่วนประกอบทั้งหมดในข้อ 2.1 ผสมเข้าด้วยกัน ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 5.8-6.0 ด้วย 1N NaOH เติม 0.5% เมธทิลีนบลู 0.7 มิลลิลิตร เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ แบ่งสารละลายนี้ใส่ลงในหลอดที่มีฝาจุกเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดละ 8 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นเติมอินแอกติเวทซีรัมของคน หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ซีรัมคนที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที เพื่อทำลายคอมพลีเมนท์)

3. วิธีเตรียมอาหารสำหรับแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์

การเตรียมอาหารสำหรับแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ใช้ส่วนผสมตามวิธีของ Samuels (1962) ซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เพียงแต่ได้ปรับให้ความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 6.0-6.5 และเตรียมอาหารเป็นสองชั้นโดยใช้ส่วนผสมของวุ้นแตกต่างกันคือ อาหารชั้นล่างเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM ที่มีวุ้น 1.6% อาหารชั้นบนมีวุ้น 0.8% ต้มอาหารทั้งสองชั้นให้เดือดจนวุ้นละลาย บรรจุใส่หลอดทดลองที่มีฝาจุกเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร อาหารชั้นล่างบรรจุหลอดละ 10 มิลลิลิตร อาหารชั้นบนบรรจุหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ 121°C นาน 15 นาที

4. วิธีแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์

เมื่อเลี้ยง <u>T. vaginalis</u> ให้ปราศจากแบคทีเรียและราแล้ว นำ <u>T. vaginalis</u> ที่มีอายุ 48 ชั่วโมง มาแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ตามวิธีของ Samuels (1962) แต่ได้ดัดแปลงโดยเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตามวิธีของ Jensen and Trager (1977) ด้วยวิธีจุดเทียนไขแทนวิธีใช้น้ำแข็งแห้ง ดังนี้

อาหารชั้นล่าง หลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 40°C ใส่ยาปฏิชีวนะคือ เพนนิซิลิน และไดไฮโดรสเตรปโตมัยซิน ที่มีความเข้มข้นของตัวยา 5,000 ยูนิต และ 5,000 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าให้เข้ากันแล้วรีบเทใส่จานแก้วเลี้ยงเชื้อขนาด 20 มิลลิลิตร ที่สะอาดและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งและดูดซึมแกซคาร์บอนไดออกไซด์ 2% โดยนำจานแก้วเลี้ยงเชื้อวางในเดสสิเคเตอร์ขณะที่อาหารยังไม่แข็ง จุดเทียนไข ปิดฝาเดสสิเคเตอร์ เปิดรูระบายอาหาศ เมื่อเทียนไขที่ติดไฟจวนจะดับ ปิดรูระบายอากาศ ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวอย่างน้อย 15 นาที นำออกจากเดสสิเคเตอร์ เพื่อเทอาหารชั้นบนต่อไป

อาหารชั้นบน วางทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 40°C ใส่ยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นของตัวยาเท่ากับที่ใส่ในอาหารชั้นล่าง ซีรัมคนที่อุ่นแล้ว 1.0 มิลลิลิตร และเชื้อ T. vaginalis ที่มีอายุ 48 ชั่วโมง 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เทลงในจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารชั้นล่างแข็งตัวอยู่แล้วโดยเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อเกิดอาการช็อคเนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไปได้ ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวและดูดซึมกาซคาร์บอนไดออกไซด์ในเดสสิเคเตอร์ที่มีกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 2% เมื่ออาหารแข็งตัวนำเดสสิเคเตอร์เก็บไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37°C นาน 3-5 วัน วันที่สามจะเริ่มเห็นโคโลนีเป็นจุดสีขาวเล็ก ๆ วันที่ห้าโคโลนีจะมีขนาดใหญ่ขึ้น มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร เลือกโคโลนีที่มีรูปร่างไม่เหมือนกัน 4 โคโลนี เขี่ยกลุ่มโคโลนีใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 กลุ่ม ทำให้โคโลนีแตกและแยกตัวออกจากวุ้น โดยใช้ปาสเตอร์ปิเปตที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าและออก ประมาณ 3-4 ครั้ง แล้วจึงดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่โคโลนีแตกและแยกตัวออกจากวุ้นใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.0 มิลลิลิตร ใส่ซีรัมคนที่อุ่นแล้ว 0.5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุก ๆ 48 ชั่วโมง จนเชื้อ T. vaginalis เจริญดีและมีจำนวนมากพอที่จะนำไปทดสอบเอ็นไซม์

จากตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis ที่ได้จากผู้ป่วยจำนวน 50 ตัวอย่าง จะได้โคโลนี 200 กลุ่ม หรือแยกออกเป็น 200 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ซึ่งได้จัดลำดับสายพันธุ์เป็น C_1-C_{200} โดยเรียงลำดับจากผู้ป่วยคนที่หนึ่งเป็น C_1-C_4 ผู้ป่วยคนที่สองเป็น C_5-C_8 และผู้ป่วยคนสุดท้ายเป็น C_{196}-C_{200}

5. วิธีเตรียมสารละลายเอ็นไซม์จากตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis สำหรับอีเล็คโตรฟอรีซีส

นำสายพันธุ์บริสุทธิ์ T. vaginalis ที่มีอายุ 48 ชั่วโมง มาปั่น 2,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนบนไป เก็บตะกอนที่มีแต่เชื้อ T. vaginalis มาล้างด้วยน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว 3 ครั้ง โดยใส่น้ำเกลือลงไปครั้งละ 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ 2,000 รอบ ต่อ นาที จะได้ตะกอนเชื้อ T. vaginalis ประมาณ 0.5 กรัม ในน้ำเกลือ 0.5 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยใส่ 1% triton X-100 ใน EDTA-tris-HCL buffer ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.4 ประมาณ 30 ไมโครลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างเอ็นไซม์ใส่ถาดหลุมซึ่งวางบนน้ำแข็ง

6. วิธีเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับอีเล็คโตรฟอรีซีส

การเตรียมบัฟเฟอร์นี้ใช้ตามวิธีของ Carter and Walliker (1977) และ Harris and Hopkinson (1976) บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการศึกษาเอ็นไซม์แต่ละชนิดมีส่วนประกอบดังนี้

6.1 บัฟเฟอร์สำหรับศึกษาเอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส และแลคเตท ดีไฮโดรจิเนส

การศึกษาเอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส และแลคเตท ดีไฮโดรจิเนส ได้ใช้บัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ซึ่งมี 4 แบบดังนี้

สต๊อกบัฟเฟอร์คือ 0.45 M tris กับ 0.16 M citric acid ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 เตรียมโดยใช้ tris 55 กรัม citric acid 33 กรัม เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

เจลบัฟเฟอร์คือ สต๊อกบัฟเฟอร์ที่เจือจาง 7 เท่า เตรียมโดยใช้สต๊อกบัฟเฟอร์ 1 ส่วน น้ำกลั่น 6 ส่วน

อีเล็คโตรดบัฟเฟอร์คือ สต๊อกบัฟเฟอร์ที่เจือจาง 2 เท่า เตรียมโดยใช้สต๊อกบัฟเฟอร์ 1 ส่วน น้ำกลั่น 1 ส่วน

เอ็นไซม์แอสเสบัฟเฟอร์คือ tris-HCl ที่มีความเป็นกรดด่างเท่า 8.0 เตรียมโดยใช้ tris 6 กรัม ละลายน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1N HCl ซึ่งใช้ประมาณ 30 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

6.2 บัฟเฟอร์สำหรับศึกษาเอ็นไซม์มาเลท ดีไฮโดรจิเนส มี 3 แบบ

อีเล็คโตรดบัฟเฟอร์คือ 0.245 M NaH_2PO_4 กับ 0.15 M citric acid (trisodium salt dihydrate) ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.9 เตรียมโดยใช้ NaH_2PO_4 33.8 กรัม citric acid (trisodium salt dihydrate) 38.71 กรัม ละลายน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 5.9 ด้วย 10 N NaOH ซึ่งใช้ประมาณ 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

เจลบัฟเฟอร์คือ อีเล็คโตรดบัฟเฟอร์ที่เจือจาง 40 เท่า เตรียมโดยใช้อีเล็คโตรดบัฟเฟอร์ 1 ส่วน น้ำกลั่น 39 ส่วน

เอ็นไซม์แอสเสบัฟเฟอร์คือ tris-HCl ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 วิธีเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 6.1

6.3 บัฟเฟอร์สำหรับศึกษามาลิค เอ็นไซม์ มี 3 แบบ

อีเล็คโตรดบัฟเฟอร์คือ 0.188 M tris กับ 0.047 M citric acid ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.6 เตรียมโดยใช้ tris 22.767 กรัม citric

acid 9.875 กรัม ละลายน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 8.6 ด้วย 10 N NaOH ซึ่งใช้ประมาณ 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

เจลบัฟเฟอร์คือ อีเล็คโตรดบัฟเฟอร์ที่เจือจาง 10 เท่า เตรียมโดยใช้อีเล็คโตรดบัฟเฟอร์ 1 ส่วน น้ำกลั่น 9 ส่วน

เอ็นไซม์แอสเสบัฟเฟอร์คือ tris-HCl ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 เตรียมโดยใช้ tris 12.11 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วย 1 N HCl ซึ่งใช้ประมาณ 86 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

7. วิธีเตรียมสตาร์ชเจลสำหรับอีเล็คโตรฟอรีซีส

วิธีเตรียมสตาร์ชเจลสำหรับอีเล็คโตรฟอรีซีสเพื่อศึกษาเอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส มาเลท ดีไฮโดรจิเนส และมาลิค เอ็นไซม์ เตรียมได้โดยใช้วิธีเดียวกัน จะแตกต่างกันเฉพาะส่วนประกอบของเจลบัฟเฟอร์ ซึ่งได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 6.

สตาร์ชเจลสำหรับอีเล็คโตรฟอรีซีสเตรียมโดยใช้

แป้งไฮโดรไลซ์สำหรับอีเล็คโตรฟอรีซีส	23.5 กรัม
เจลบัฟเฟอร์	250.0 มิลลิลิตร

ละลายแป้งในเจลบัฟเฟอร์ใส่ขวดแก้วทรงกรวยที่มีแขนด้านข้างขนาด 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้ม ขณะที่ต้มเขย่าขวดให้แป้งได้รับความร้อนเท่ากันตลอดจนกระทั่งแป้งใสและเดือด นำไปดูดอากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศเพื่อให้ฟองอากาศออกจากสตาร์ชเจลให้หมด ค่อย ๆ เทสตาร์ชเจลลงในแม่พิมพ์ วางทิ้งไว้ให้สตาร์ชเจลเย็นและแข็งตัวอย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิห้องครึ่งชั่วโมง แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 2-4°C อย่างน้อย 3 ชั่วโมงจึงจะนำไปใช้ได้

8. วิธีใส่ตัวอย่างเอ็นไซม์ลงในแผ่นสตาร์ชเจล

นำแผ่นสตาร์ชเจลที่แข็งและเย็นได้ที่แล้วมาเจาะให้เป็นช่องด้วยใบมีดโกนอย่างบางขนาด 1X1 เซนติเมตร จำนวน 12 ช่อง แต่ละช่องห่างกัน 1 กระเบียดนิ้ว (แผนภาพที่ 2) ในแนวขนานกับขอบแม่พิมพ์ ห่างจากขอบแม่พิมพ์ $1\frac{1}{2}$ นิ้ว (แนวนี้ใช้เป็นแนวเริ่มต้น) เมื่อเจาะเจลเสร็จแล้วใช้ปากคีบคีบกระดาษกรองอย่างหนา (Whatman No.1) ที่มีขนาด 5X7 มิลลิเมตรจุ่มลงในสารละลายตัวอย่างเอ็นไซม์ที่เตรียมไว้ในข้อ 7 จนเอ็นไซม์ซึมเข้ากระดาษกรองทั่วทั้งแผ่นแล้วนำมาสอดลงในเจลตามช่องที่เจาะไว้ให้กระดาษกรองจมอยู่ใต้ผิวเจล

9. วิธีจัดตั้งเครื่อง และการทำอีเล็คโตรฟอรีซีส

นำแผ่นเจลที่ใส่ตัวอย่างเอ็นไซม์เรียบร้อยแล้วไปแยกหาไอโซไซม์ (จัดตั้งเครื่องมือดังแผนภาพที่ 2) โดยวางเจลไว้บนแผ่นทำความเย็นอุณหภูมิ 2-4°C ตลอดเวลา ให้อยู่ระหว่างกล่องอีเล็คโตรดบัฟเฟอร์ขั้วบวกและขั้วลบ (แต่ละกล่องใส่อีเล็คโตรดบัฟเฟอร์แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของเอ็นไซม์ที่ต้องการศึกษา กล่องละ 500 มิลลิลิตร) ให้แนวเริ่มต้นอยู่ทางขั้วลบ วางฟองน้ำที่ขอบเจลทั้งสองด้านให้ปลายอีกข้างหนึ่งจุ่มลงในอีเล็คโตรดบัฟเฟอร์ ฟองน้ำนี้ใช้เป็นสื่อเชื่อมระหว่างเจลกับอีเล็คโตรดบัฟเฟอร์ วางแผ่นพลาสติคปิดบนเจลและฟองน้ำส่วนที่แตะกับเจล วางแผ่นทำความเย็นอีกอันหนึ่งลงบนแผ่นพลาสติคส่วนที่ปิดบนเจลให้อยู่ระหว่างฟองน้ำทั้งสองข้าง เปิดเครื่องผ่านกระแสไฟเข้าเจลโดยใช้กระแสไฟหรือความต่างศักย์ที่คงที่และระยะเวลาที่ทำอีเล็คโตรฟอรีซีสแตกต่างกันตามชนิดของเอ็นไซม์ที่ต้องการศึกษาดังนี้

เอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส และ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส ใช้กระแสคงที่ 75 มิลลิแอมแปร์ นาน 14 ชั่วโมง

เอ็นไซม์มาเลท ดีไฮโดรจิเนส และ มาลิค เอ็นไซม์ ใช้ความต่างศักย์คงที่ 110 โวลท์ นาน 17 ชั่วโมง

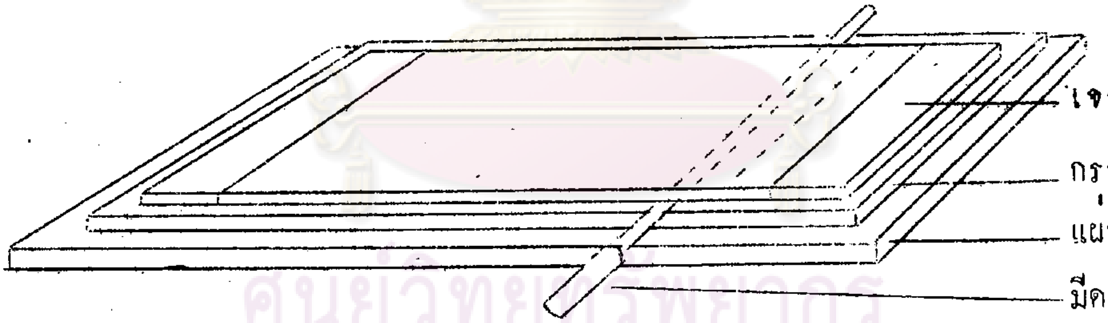
10. วิธีฝานเจล

หลังจากผ่านกระแสไฟฟ้าเพื่อแยกหาไอโซไซม์ของเอ็นไซม์แต่ละตัวแล้ว ก่อนที่จะนำไปย้อมสีเพื่อดูแถบของไอโซไซม์ที่จะปรากฏให้เห็นบนเจล จะต้องนำเจลมาฝานแบ่งครึ่งตามแนวนอนให้ได้เป็น 2 แผ่น หนาแผ่นละ 3 มิลลิเมตร ทั้งนี้เพราะว่าการผ่านกระแสไฟฟ้าโดยมีตัวกลางเป็นสตาร์ชเจล เอ็นไซม์จะมีวิถีการวิ่งไปในเจลเป็นเส้นโค้ง ดังแผนภาพที่ 4 ดังนั้นถ้าย้อมสีดูแถบของไอโซไซม์ตรงกลางแผ่นเจลจะทำให้เห็นแถบของไอโซไซม์ครบทุกแถบ และทำให้การอ่านผลถูกต้องสมบูรณ์ที่สุด

วิธีฝานเจอทำได้โดยเอากรอบแม่พิมพ์ออกจากเจล นำกรอบพลาสติคที่มีขนาดเดียวกับกรอบแม่พิมพ์แต่มีความหนาเพียง 3 มิลลิเมตร มาใส่แทน ใช้มีดขนาดยาว 30 เซนติเมตร ฝานแบ่งครึ่งเจลตามแนวนอนโดยลากใบมีดให้ขนานไปกับกรอบอันใหม่ พลิกแผ่นเจลอันบนออกมาวางบนแผ่นพลาสติคให้ส่วนผิวหน้าเจลอันเดิมอยู่ด้านล่าง ส่วนตรงกลางก็จะเป็นผิวหน้าเจลอันใหม่ จะได้เจลเป็น 2 แผ่นที่มีขนาดเท่ากัน สามารถนำมาย้อมสีเพื่อดูแถบของไอโซไซม์ได้ทั้งสองแผ่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 4 แสดงวิถีการวิ่งของเอ็นไซม์ในสตาร์ชเจล

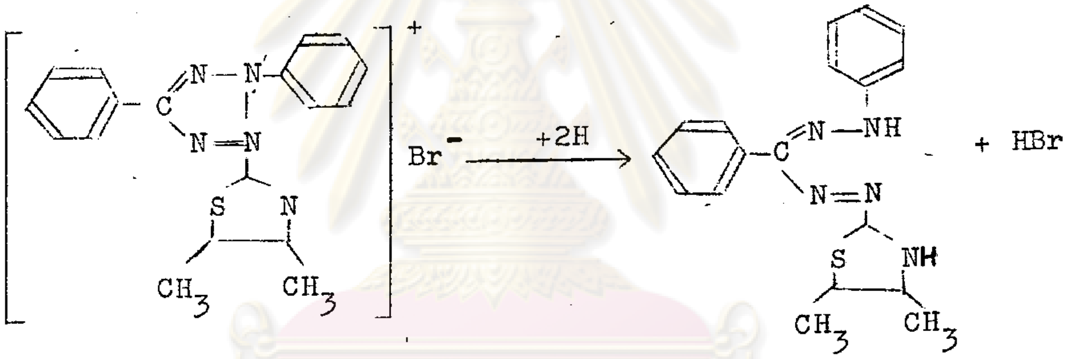


แผนภาพที่ 5 แสดงวิธีฝานเจล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. การย้อมสีตามวิธีของ Harris and Hopkinson (1976)

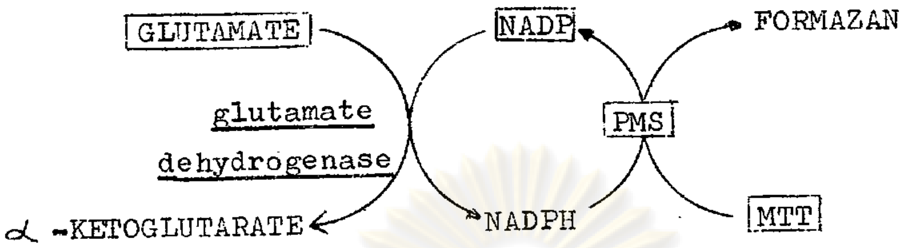
เมื่อผ่านเจลเสร็จแล้วนำมาย้อมสีเพื่อหาตำแหน่งของไอโซไซม์ด้วยวิธี อีเล็คตรอน ทรานสะเฟอ ดาย สเตนนิ่ง (electron transfer dye staining) สีที่ใช้ย้อมคือ เมธิล ไทอะโซลิล เตตระโซเลี่ยม (methyl thiazolyl tetrazolium หรือ MTT) ซึ่งเป็นตัวรับอีเล็คตรอนสำหรับปฏิกิริยา ดีไฮโดรจิเนส โดย MTT จะถูกรีดิวส์โดยอีเล็คตรอนโดนเนอร์ให้เป็นฟอร์มาซานที่ไม่ละลายน้ำมีสีม่วงแก่แกมน้ำเงิน ปฏิกิริยานี้มีฟีนาซีน เมโธซัลเฟต (phenazine methosulphate หรือ PMS) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (แผนภาพที่ 6)



แผนภาพที่ 6 แสดงการเกิดฟอร์มาซาน โดยปฏิกิริยารีดักชัน ของ MTT

11.1 เอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส

เอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนสที่ได้จาก *T. vaginalis* จะเร่งปฏิกิริยาออกซิโดรีดักชันของกลูตาเมทให้เปลี่ยนเป็น แอลฟา คีโต กลูตาเรท โดยมี NADP เป็นโคเอ็นไซม์ และส่งผ่านอีเล็คตรอนให้ MTT เกิดเป็นฟอร์มาซาน ปริมาณฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการทำงานของเอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนสดังแผนภาพที่ 7



แผนภาพที่ 7 แสดงการเกิดฟอร์มาซานบนแผ่นเจล โดยเอ็นไซม์ กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส

ส่วนประกอบของสารละลายสี

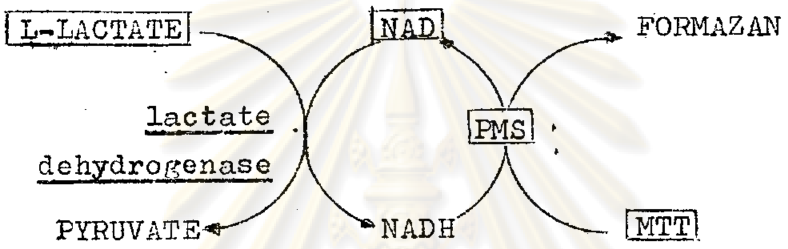
tris-HCl buffer pH 8.0	50	มิลลิลิตร
mono-sodium glutamate	100	มิลลิกรัม
NADP	5	"
MTT	5	"
PMS	5	"
special agar-Noble	400	"

วิธีเตรียมสารละลายสีและย้อม

ละลาย special agar-Noble ใน tris-HCl buffer pH 8.0 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80°C ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 45°C ละลายส่วนประกอบที่เหลือทั้งหมดใน tris-HCl buffer pH 8.0 25 มิลลิลิตร เมื่อละลายดีแล้วจึงเทใส่ในสารละลาย special agar-Noble เขย่าให้เข้ากันเทลงบนผิวหน้าเจลทันทีก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว วางทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัวประมาณ 3 นาที นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้จนกว่าจะเห็นแถบของไอโซไซม์ปรากฏขึ้นบนเจลซึ่งกินเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

11.2 เอ็นไซม์แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส

เอ็นไซม์แลคเตท ดีไฮโดรจิเนสที่ได้จาก T. vaginalis จะเร่งปฏิกิริยาออกซิโดรีดักชันเปลี่ยนแลคเตทเป็นไพรูเวทโดยมี NAD เป็นโคเอ็นไซม์ และส่งผ่านอีเล็คตรอนให้ MTT เกิดเป็นฟอร์มาซาน ปริมาณฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการทำงานของเอ็นไซม์แลคเตท ดีไฮโดรจิเนสดังแผนภาพที่ 8



แผนภาพที่ 8 แสดงการเกิดฟอร์ม่าซานบนแผ่นเจล โดยเอ็นไซม์ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส

ส่วนประกอบของสารละลายสี

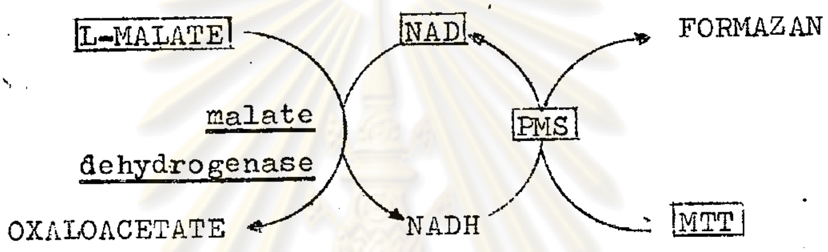
tris-HCl buffer pH 8.0	50	มิลลิลิตร
lactic acid	200	มิลลิกรัม
NAD	5	"
MTT	5	"
PMS	5	"
special agar-Noble	400	"

วิธีเตรียมสารละลายสีและย้อม

ใช้วิธีการเดียวกันกับการย้อมเอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส ต่างกันเฉพาะระยะเวลาที่ใช้ในการอบเจลที่อุณหภูมิ 37°C ซึ่งจะสามารถเห็นแถบของไอโซไซม์ปรากฏขึ้นบนเจลได้ชัดเจนภายในเวลาประมาณ 30 นาที หลังจากย้อม

11.3 เอ็นไซม์มาเลท ดีไฮโดรจิเนส

เอ็นไซม์มาเลท ดีไฮโดรจิเนสที่ได้จาก *T. vaginalis* จะเร่งปฏิกิริยาออกซิโดรีดักชันเปลี่ยนมาเลทเป็นออกซอลโลอะซิเตท โดยมี NAD เป็นโคเอ็นไซม์ และส่งผ่านอีเล็คตรอนให้ MTT เกิดเป็นฟอร์มาซาน ปริมาณฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการทำงานของเอ็นไซม์มาเลท ดีไฮโดรจิเนส ดังแผนภาพที่ 9



แผนภาพที่ 9 แสดงการเกิดฟอร์มาซานบนแผ่นเจล โดยเอ็นไซม์มาเลท ดีไฮโดรจิเนส

ส่วนประกอบของสารละลายสี

tris-HCl buffer pH 8.0	50	มิลลิลิตร
malic acid	350	มิลลิกรัม
NAD	5	"
MTT	5	"
PMS	5	"
special agar-Noble	400	"

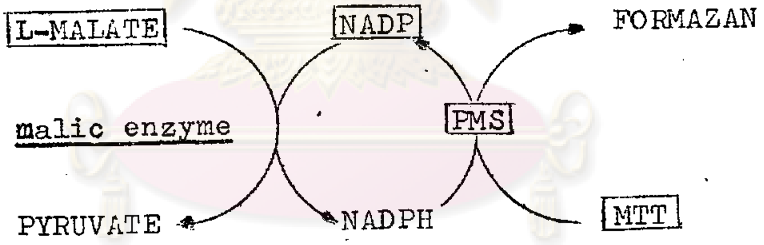
วิธีเตรียมสารละลายและวิธีย้อม

ละลาย special agar-Noble ใน tris-HCl buffer pH 8.0 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80°C ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 45°C ละลาย malic acid ใน tris-HCl buffer pH 8.0 25 มิลลิลิตร ปรับความเป็น

กรดด่างให้ได้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1N NaOH แล้วเติมส่วนประกอบที่เหลือทั้งหมดลงไป คนจนละลายดีแล้วจึงเทใส่ในสารละลาย special agar-Noble เขย่าให้เข้ากัน เทลงบนผิวหน้าเจลทันทีก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว วางทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 3 นาที นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้จนกว่าจะเห็นแถบของไอโซไซม์ปรากฏขึ้นบนเจล ซึ่งกินเวลาประมาณ 30 นาที

11.4 มาลิค เอ็นไซม์

มาลิค เอ็นไซม์ที่ได้จาก <u>T. vaginalis</u> จะเร่งปฏิกิริยาออกซิไดรีดักชัน ทำให้มาเลทเปลี่ยนเป็นไพรูเวท โดยมี NADP เป็นโคเอ็นไซม์ และ $MgCl_2$ เป็นโคแฟคเตอร์ มีการส่งผ่านอีเล็คตรอนไปให้ MTT เกิดเป็นฟอร์มาซาน ปริมาณฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการทำงานของมาลิค เอ็นไซม์ ดังแผนภาพที่ 10



แผนภาพที่ 10 แสดงการเกิดฟอร์มาซานบนแผ่นเจล โดยมาลิค เอ็นไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนประกอบของสารละลายสี

tris-HCl buffer pH 7.0	50	มิลลิลิตร
malic acid	100	มิลลิกรัม
$MgCl_2$	50	"
NADP	5	"
MTT	5	"

PMS	5	มิลลิกรัม
special agar-Noble	400	"

วิธีเตรียมสารละลายสีและย้อม

ละลาย special agar-Noble ใน tris-HCl buffer pH 8.0 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80°C ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 45°C ละลาย malic acid ใน tris-HCl buffer pH 8.0 25 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 1 N NaOH แล้วจึงเติมส่วนประกอบที่เหลือทั้งหมดลงไป คนจนละลายดีแล้วจึงเทใส่ในสารละลาย special agar-Noble เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงบนผิวหน้าเจลทันทีก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว วางทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 3 นาที นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้จนกว่าจะเห็นแถบของไอโซไซม์ปรากฏขึ้นบนเจลซึ่งกินเวลาประมาณ 60 นาที

12. วิธีศึกษาเอ็นไซม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส

วิธีศึกษาเอ็นไซม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ของ <u>T. vaginalis</u> จำนวน 242 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ทำโดยใช้เทคนิคสตาร์ช เจล อีเล็คโตรฟอรีซีส ตามวิธีของสุภาภรณ์ (2522)

13. วิธีอ่านและบันทึกผลการทดลอง

การอ่านผลการทดลองจะต้องทำภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากเห็นแถบของไอโซไซม์ปรากฏขึ้นบนเจล ทั้งนี้เพราะว่าถ้าทิ้งไว้นาน สี MTT-PMS จะสลายตัว เนื่องจากสภาวะที่เป็นด่างของสารละลายสีเป็นเหตุให้พื้นเจลมีสีดำเกิดความลำบากในการอ่านผล นอกจากนี้ถ้าทิ้งไว้นานเอ็นไซม์จะมีการแพร่กระจายไปในเจลทำให้แถบของไอโซไซม์เลือนไม่คมชัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอ่านผลการทดลอง

1. ดูการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ว่ามีการเคลื่อนที่ห่างจากแนวเริ่มต้นหรือไม่ หรือเคลื่อนที่ออกไปมากน้อยเพียงใด และเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกหรือขั้วลบ

2. ไอโซไซม์ที่ปรากฏบนเจลนั้นมีกี่แถบ แต่ละแถบห่างจากกันเท่าใด

3. ศึกษาเปรียบเทียบไอโซไซม์ที่มีลักษณะต่างกัน ว่าต่างกันอย่างไร โดยการนำเอาไอโซไซม์ที่ต่างกันมาทดลองซ้ำอีกบนเจลแผ่นเดียวกัน

4. ดูการทำงานของแต่ละไอโซไซม์ว่ามากน้อยเพียงใด สามารถทำให้เกิดสีฟอร์มาซานเข้มหรือจางเพียงใด

5. ถ้าการอ่านผลในแต่ละครั้งไม่ชัดเจนจะต้องนำตัวอย่างเอ็นไซม์นั้นไปทดลองใหม่เปรียบเทียบกับตัวอย่างเอ็นไซม์ที่อ่านผลได้ชัดเจนแล้วเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างกัน ซึ่งการศึกษาเอ็นไซม์แต่ละตัวใน *T. vaginalis* แต่ละสายพันธุ์บริสุทธิ์ต้องทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

การบันทึกผลการทดลอง

1. ถ่ายรูปภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากเห็นแถบของไอโซไซม์โดยถ่ายรูปขาวดำขนาด 3X4 นิ้ว และถ่ายสไลด์สีตัวอย่างละ 1 รูป

2. บันทึกผลโดยตรง ทำโดยใช้แผ่นพลาสติคใสขนาดเท่ากับเจล และปากกาหมึกซึมที่ไม่ละลายน้ำบันทึกผล โดยลากเส้นไปตามแถบของไอโซไซม์ รูปที่ได้จะมีขนาดเท่าของจริง

3. วัดระยะห่างของไอโซไซม์ที่เคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้น