

ภาคผนวก

การศึกษาารูปแบบของโปรตีนในซีรัม (serum protein pattern) และค่าอัตราส่วนอัลบูมินต่อโกลบูลิน (A:G) โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีการของ Helena Laboratories, U.S.A

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือเซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิส และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Helena Laboratories, U.S.A.)
2. แผ่นเซลโลสอะซิเตท (TITAN III-H) ขนาด 76 x 60 มิลลิเมตร
3. จานแก้ว
4. ตู้อบ (Memmert, Germany)
5. เครื่องวิเคราะห์แผ่นเจล EDC (Electrophoresis data center; Helena Laboratories)
6. กระดาษกรอง
7. แผ่นสไลด์
8. Micropipette

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-บาร์บิทัล-โซเดียม (tris-babital-sodium buffer) พีเอช 8.8 สำหรับซีรัมในพลาสติก
2. สีย้อมฟองโซเอส (destaining reagent) ประกอบด้วยฟองโซเอส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก (sulfosalicylic acid) 3.5 เปอร์เซ็นต์ และกรดไทรโคลโรอะซิติก (trichloroacetic acid)
3. สารละลายล้างสีย้อม (destaining reagent) ประกอบด้วยกรดอะซิติก 5 เปอร์เซ็นต์
4. สารละลาย clearing ประกอบด้วย
 - 4.1 กรดอะซิติก 30 ส่วน
 - 4.2 เมทานอล 70 ส่วน
 - 4.3 Clear aid (Helena Laboratories, U.S.A.)

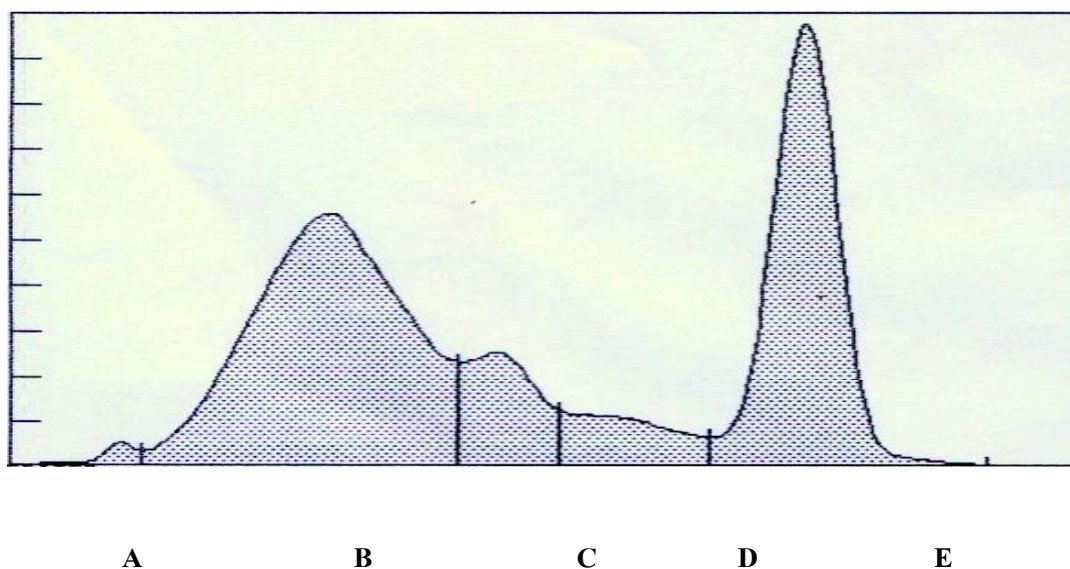
5. สารละลายมาตรฐานซีรัม (serum control; Helena Laboratories, U.S.A.)

วิธีการ

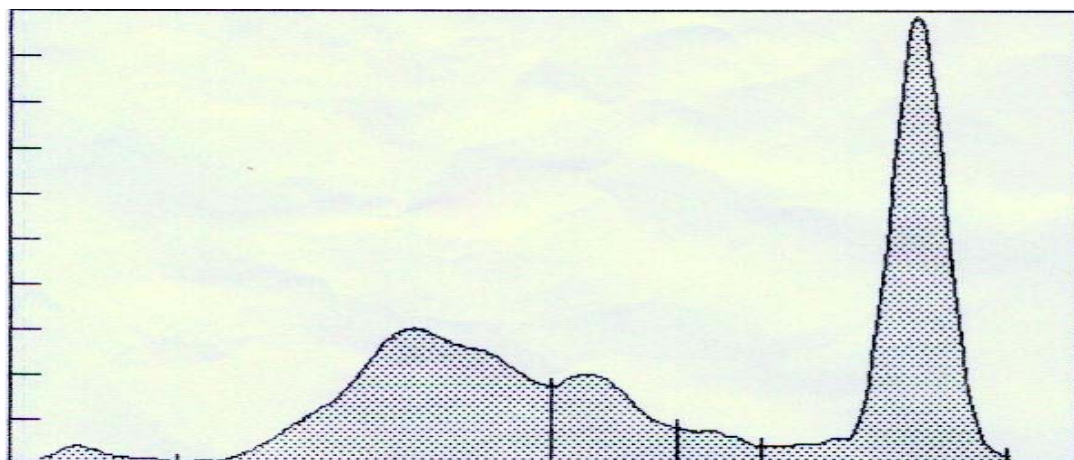
1. เตรียมสารละลาย Tris-barbital-sodium barbital buffer pH 8.8 โดยละลาย Tris-barbital-sodium barbital buffer จำนวน 18 กรัม ในน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 750 มิลลิลิตร นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตตมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 20 นาที
2. เทสารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในอ่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 ข้างของเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ใส่กระดาษกรอง (wick) ที่ชุ่มด้วยบัฟเฟอร์ลงในอ่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 ข้างเพื่อเป็นสะพานเชื่อมกระแสไฟฟ้า
3. บรรจุซีรัม ปริมาตร 8 ไมโครลิตรลงในช่องใส่สาร นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตตที่แช่ในบัฟเฟอร์มาซับด้วยกระดาษกรอง แล้วนำ applicator มากดในช่องที่ใส่ซีรัม 3-4 ครั้ง จากนั้นนำ applicator มากดลงแผ่นเซลล์โลส นาน 5 วินาที
4. นำแผ่นเซลล์โลสที่ใส่สารเรียบร้อยแล้วมาวางบนอ่างอิเล็กโทรด เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 180 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที
5. ย้อมสีโดยแช่แผ่นเซลล์โลสอะซิเตตในสารละลายสีย้อมฟองโซ เอส เป็นเวลา 5 นาที ล้างสีย้อมในกรดอะซิติก 2 ครั้งๆละ 2-3 นาที
6. นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตตมาแช่ลงในเมธานอล 2 ครั้งๆละ 2-3 นาที
7. นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตตมาแช่ในสารละลาย clearing เป็นเวลา 10 นาที
8. นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตตมาให้ความร้อน โดยอบที่อุณหภูมิ 50-60 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้แผ่นเซลล์โลสอะซิเตตเปลี่ยนจากแผ่นทึบแสงมาเป็นแผ่นโปร่งใสและแห้งสนิททั่วทั้งแผ่น

นำมาวิเคราะห์ด้วย เครื่องวิเคราะห์แผ่นเจล EDC (Electrophoresis Data Center; Helena Laboratories, U.S.A.)

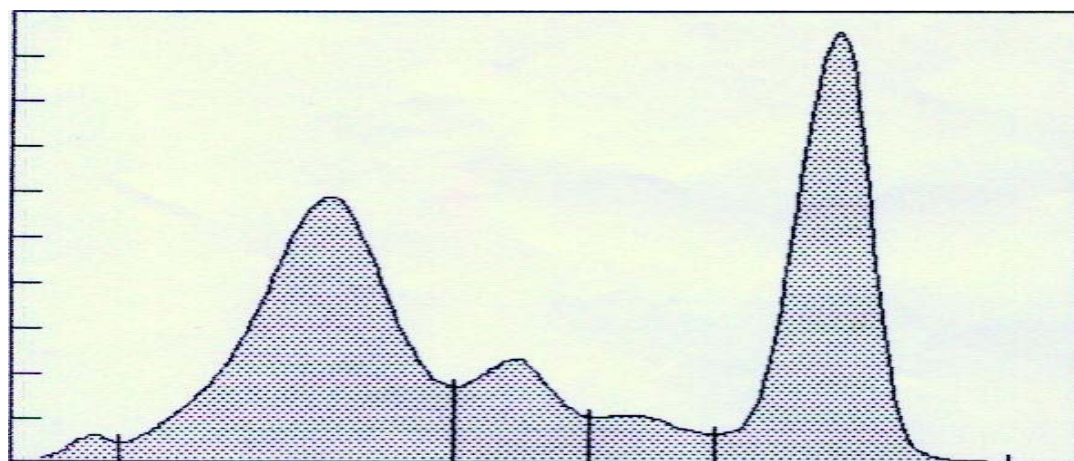
จากผลการวิเคราะห์ พบว่ารูปแบบของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่มีลักษณะสอดคล้องกับ Patterson *et al.* (1962) รายงานว่าพบแถบของโปรตีนในซีรัมลูกไก่ และไก่ไข่ ดังแสดงภาพผนวกที่ 16 โดยโปรตีนที่เคลื่อนที่ได้ไวที่สุด คือ อัลบูมิน และโปรตีนที่เคลื่อนที่ช้าที่สุด คือ แกมมา-กลอบูลิน และส่วนของโปรตีนที่เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าอัลบูมิน คือ อัลฟา₁-กลอบูลิน อัลฟา₂-กลอบูลิน และบีตา-กลอบูลิน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบโปรตีนซีรัมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ผลการทดลองดังกล่าวพบว่าแตกต่างจากรายงานของ Keneko *et al.* (1997) ซึ่งพบ 프리-อัลบูมิน (Pre-albumin) ในซีรัมไก่และไก่ทอง ดังแสดงในภาพผนวกที่ 17 โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสของวิธีการทดลองที่แตกต่างกัน ส่งผลให้พบรูปแบบของโปรตีนในซีรัมที่แตกต่างกัน Keneko *et al.* (1997)



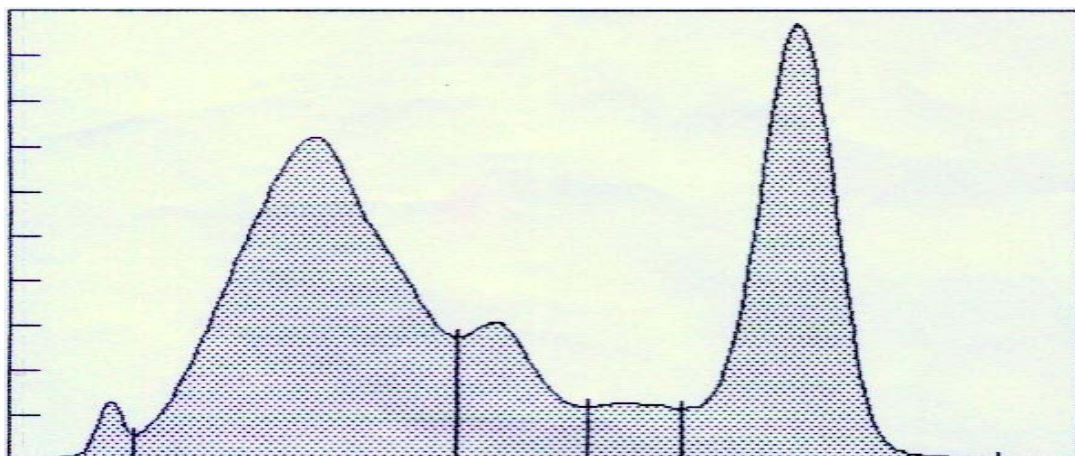
ภาพผนวกที่ 1 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่ทั่วไป โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที) A แกมมา-กลอบูลิน, B บีตา-กลอบูลิน, C อัลฟา₂-กลอบูลิน, D อัลฟา₁-กลอบูลิน, E อัลบูมิน



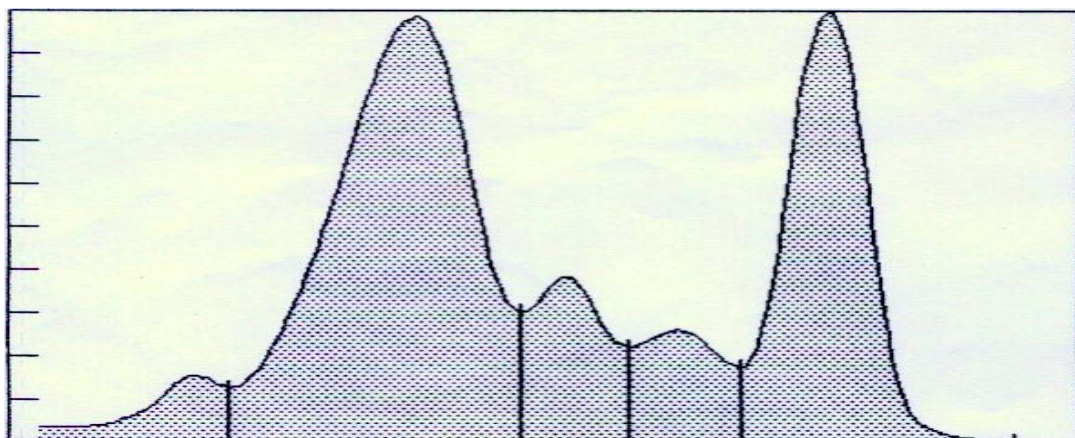
ภาพผนวกที่ 2 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 32 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหาร โปรตีน 14 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีเซลล์ลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



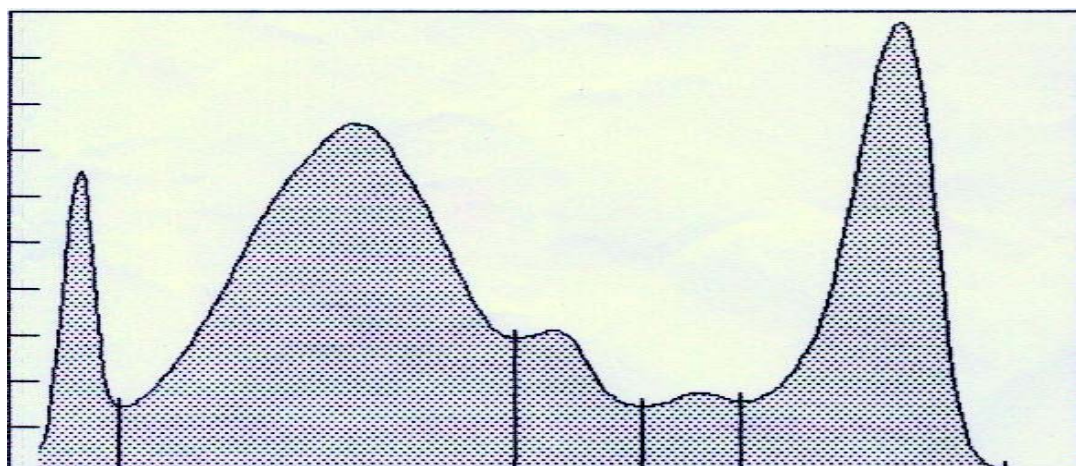
ภาพผนวกที่ 3 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 32 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหาร โปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีเซลล์ลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



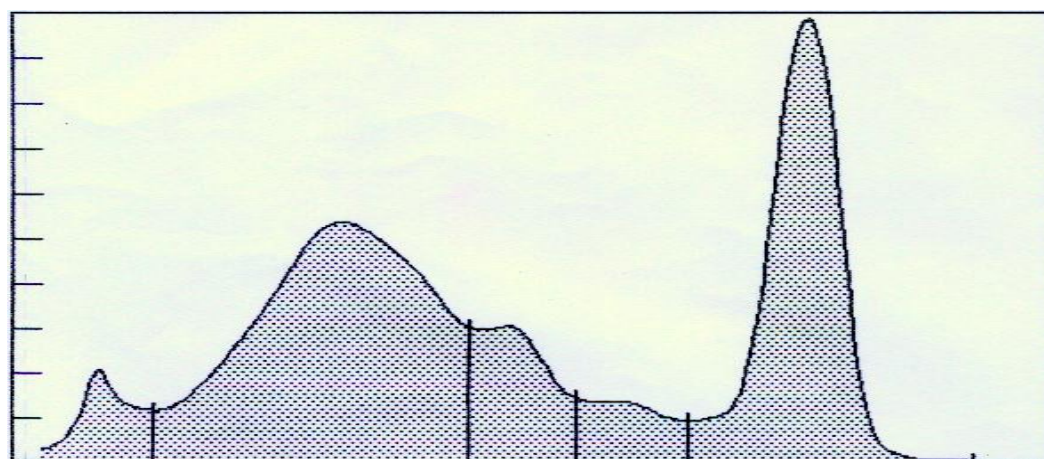
ภาพผนวกที่ 4 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 32 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหาร โปรตีน 18 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีเซลล์ลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟเรซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



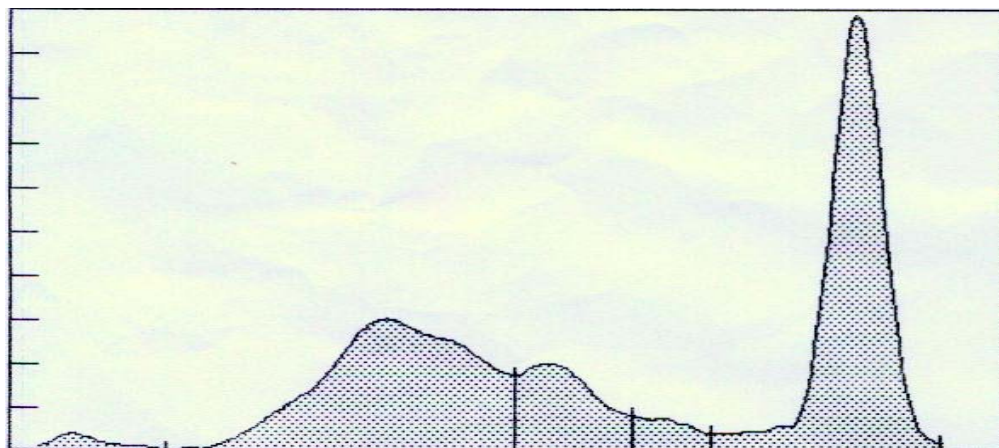
ภาพผนวกที่ 5 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 48 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหาร โปรตีน 14 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีเซลล์ลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟเรซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



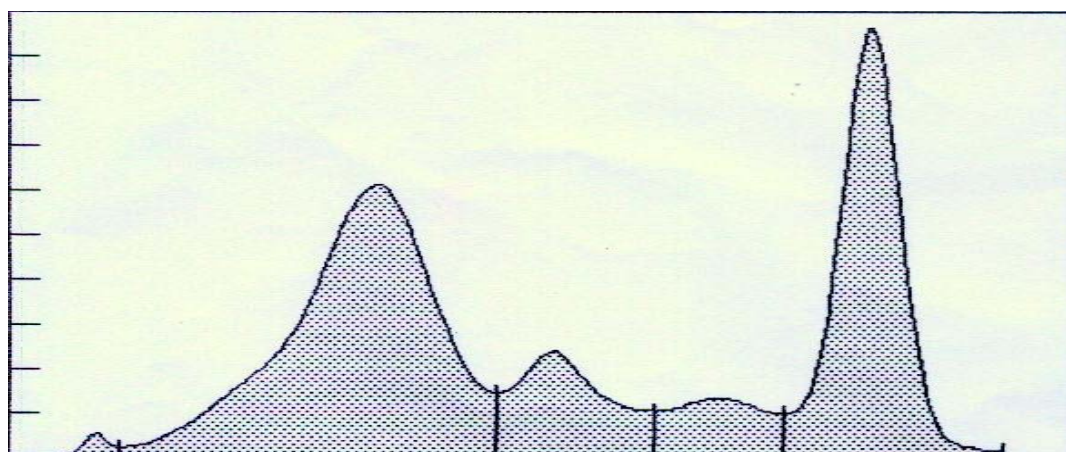
ภาพผนวกที่ 6 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัม"ไก่"ไข่อายุ 48 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารโปรตีน 16 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีเซลล์ลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



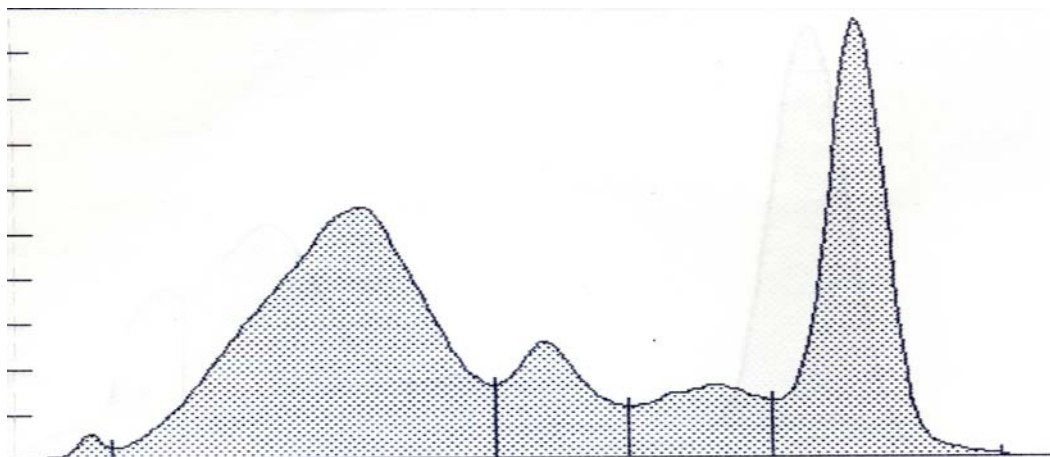
ภาพผนวกที่ 7 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัม"ไก่"ไข่อายุ 48 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารโปรตีน 18 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีเซลล์ลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



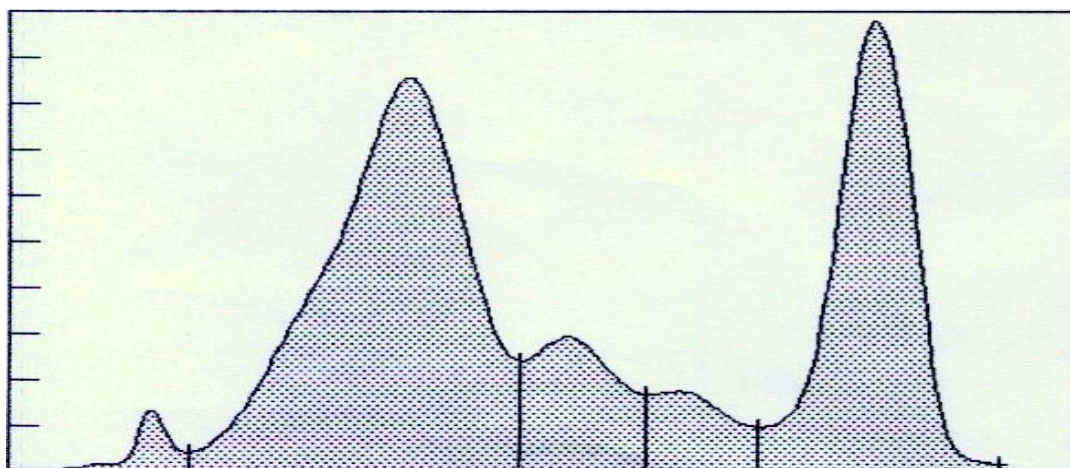
ภาพผนวกที่ 8 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 32 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารกรดอะมิโนเมทไธโอนีน 0.28 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



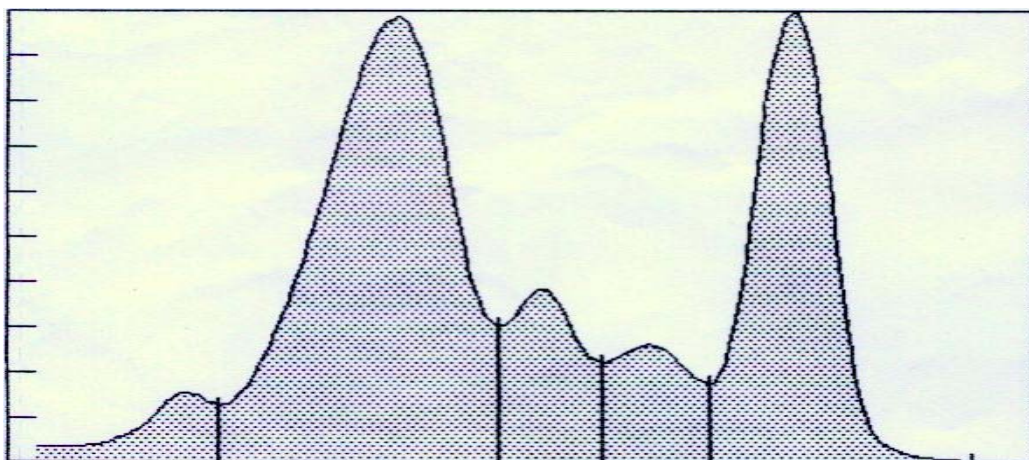
ภาพผนวกที่ 9 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 32 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารกรดอะมิโนเมทไธโอนีน 0.30 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



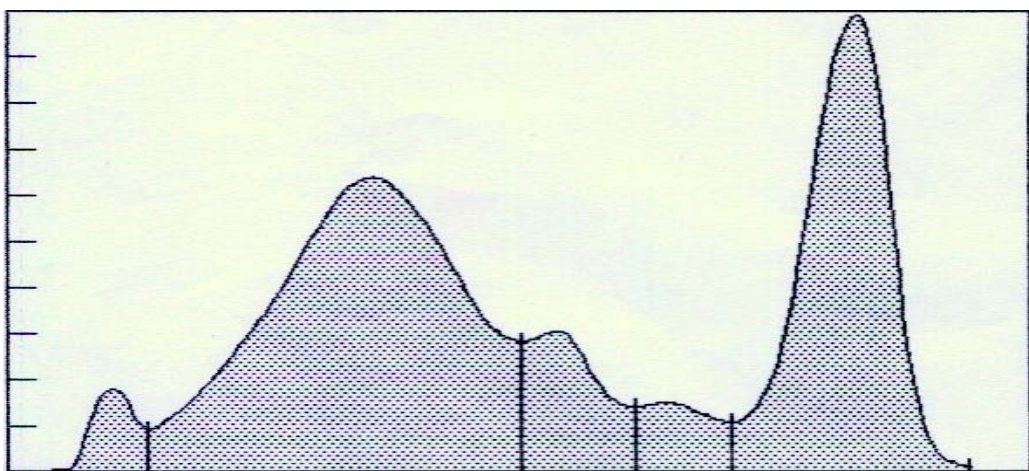
ภาพผนวกที่ 10 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 32 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารกรดอะมิโนเมทิลโฮนีน 0.38 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



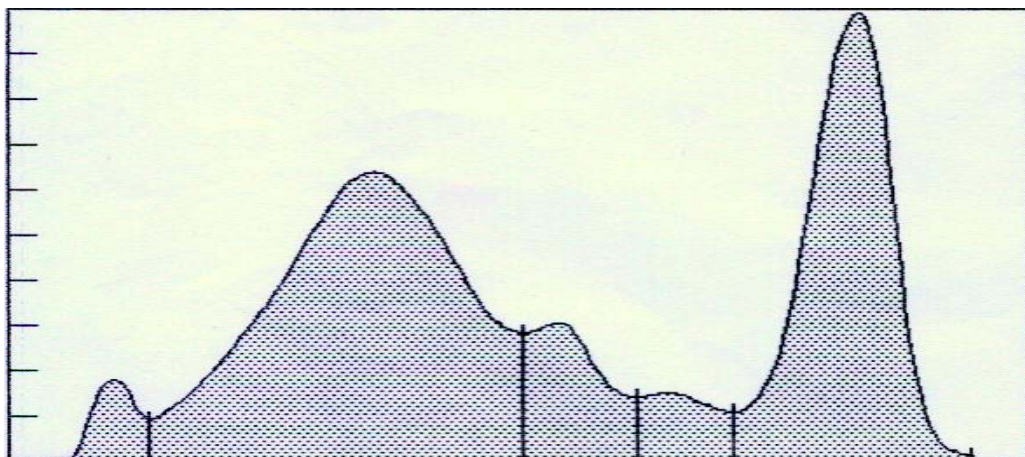
ภาพผนวกที่ 11 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 32 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารกรดอะมิโนเมทิลโฮนีน 0.44 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



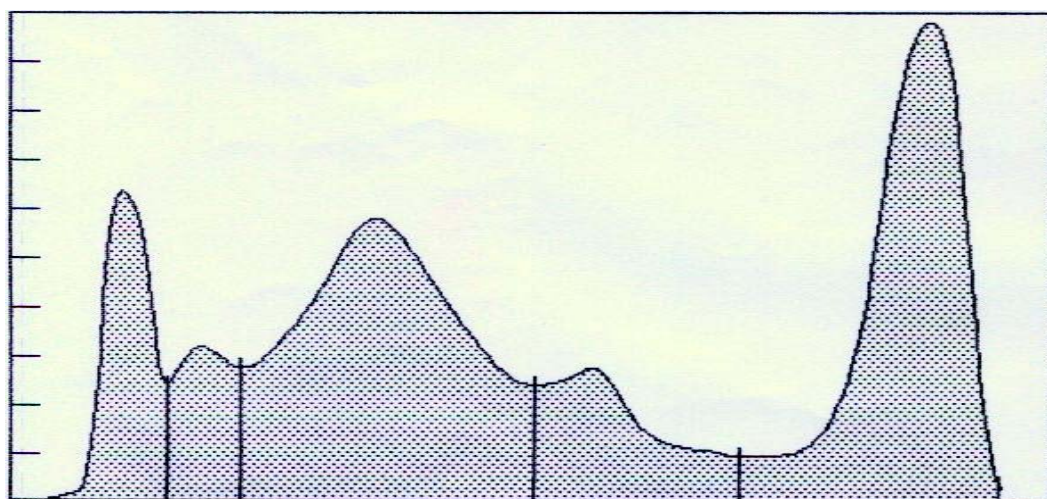
ภาพผนวกที่ 12 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 48 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารกรดอะมิโนเมทไธโอนีน 0.28 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



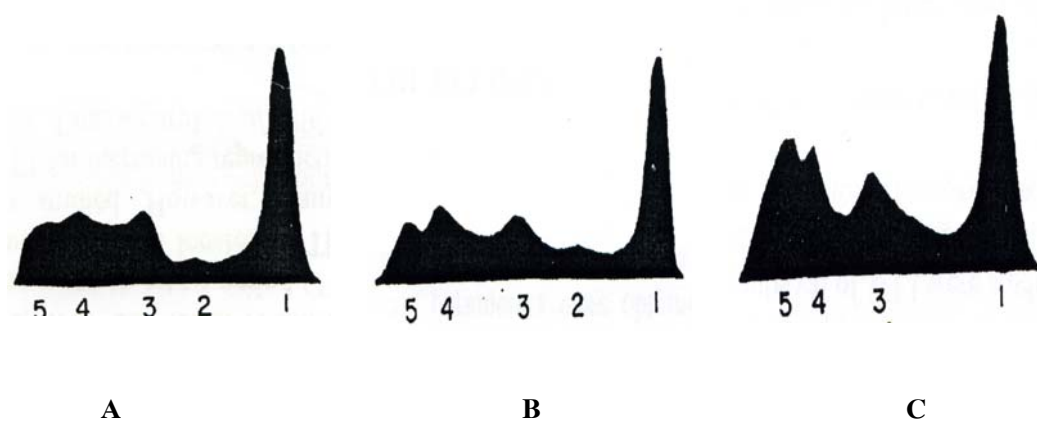
ภาพผนวกที่ 13 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 48 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารกรดอะมิโนเมทไธโอนีน 0.30 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



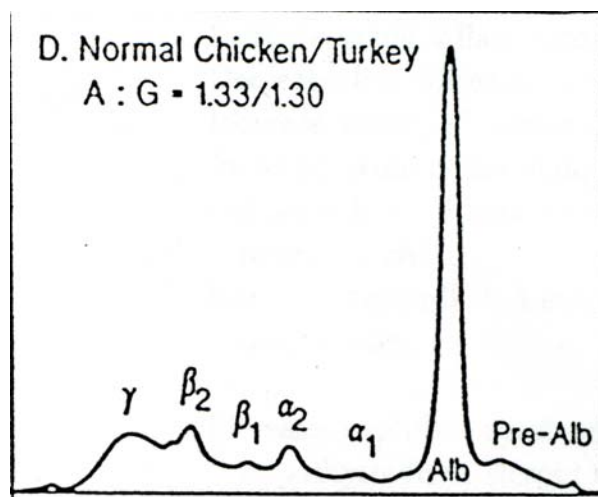
ภาพผนวกที่ 14 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 48 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารกรดอะมิโนเมทไทโอนีน 0.38 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



ภาพผนวกที่ 15 แสดง cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ไข่อายุ 48 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารกรดอะมิโนเมทไทโอนีน 0.44 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ pH 8.8 (180 โวลต์ 15 นาที)



ภาพผนวกที่ 16 แสดง paper electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่พันธุ์ไวท์ เล็กฮอร์น. A ลูก
ไก่อายุ 58 วัน, B ลูกไก่อายุ 32 วัน, C ไก่ไข่
ที่มา: Patterson *et al.* (1962)



ภาพผนวกที่ 17 cellulose acetate electrophoretogram ของโปรตีนในซีรัมไก่ และไก่วง
ที่มา: Keneko *et al.* (1997)

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระในซีรัมตามวิธี A New-salting out technique for colorimetric free fatty acid assays (Smith, 1975)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 10 ซีซี ชนิดมีฝาปิด
2. หลอดทดลองขนาด 5 ซีซี
3. Vortex mixer
4. Centrifuge
5. Micropipette
6. Pipet
7. ลูกยาง
8. นาฬิกาจับเวลา
9. Spectrophotometer
10. ปีกเกอร์
11. กระบอกตวง
12. volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. Methanol
2. Heptane
3. Chloroform
4. HCl 0.035 N
5. Na_2SO_4
6. Li_2SO_4
7. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
8. น้ำกลั่น
9. Triethanolamine
10. 1-nitroso-2-naphthol

11. Ethanol

12. Oleic acid

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิก (Oleic acid standard solution) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล/ลิตร โดยละลายกรดโอเลอิก (Oleic acid) 158.7 ไมโครลิตร ใน Heptane 5 มิลลิลิตร ปิดหลอดทดลองให้แน่นเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิกความเข้มข้น 10 ไมโครโมล/ลิตร โดยละลายสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 (Oleic acid standard solution 100 ไมโครโมล/ลิตร) 0.5 มิลลิลิตร และเติม Heptane ลงไป จนสารละลายมีปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิกความเข้มข้น 1000 ไมโครโมล/ลิตร โดยละลายสารละลายมาตรฐานในข้อ 2 (Oleic acid standard solution 10 ไมโครโมล/ลิตร) 0.5 มิลลิลิตร และเติม Heptane ลงไป จนสารละลายมีปริมาตร 5 มิลลิลิตร

4. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิกความเข้มข้น 500 ไมโครโมล/ลิตร โดยละลายสารละลายมาตรฐานในข้อ 3 (Oleic acid standard solution 1000 ไมโครโมล/ลิตร) 1.0 มิลลิลิตร และเติม Heptane ลงไป จนสารละลายมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

5. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิกความเข้มข้น 250 ไมโครโมล/ลิตร โดยละลายสารละลายมาตรฐานในข้อ 4 (Oleic acid standard solution 500 ไมโครโมล/ลิตร) 1.0 มิลลิลิตร และเติม Heptane ลงไป จนสารละลายมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

6. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิกความเข้มข้น 125 ไมโครโมล/ลิตร โดยละลายสารละลายมาตรฐานในข้อ 5 (Oleic acid standard solution 250 ไมโครโมล/ลิตร) 1.0 มิลลิลิตร และเติม Heptane ลงไป จนสารละลายมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

7. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิกความเข้มข้น 62.5 ไมโครโมล/ลิตร โดยละลายสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 (Oleic acid standard solution 125 ไมโครโมล/ลิตร) 1.0 มิลลิลิตร และเติม Heptane ลงไป จนสารละลายมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

8. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิกความเข้มข้น 750 ไมโครโมล/ลิตร โดยละลายสารละลายมาตรฐานในข้อ 3 (Oleic acid standard solution 1000 ไมโครโมล/ลิตร) 3.0 มิลลิลิตร และเติม Heptane ลงไป จนสารละลายมีปริมาตร 4 มิลลิลิตร

9. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโอเลอิกความเข้มข้น 1250 ไมโครโมล/ลิตร โดยละลายสารละลายมาตรฐานในข้อ 2 (Oleic acid standard solution 10 ไมโครโมล/ลิตร) 0.5 มิลลิลิตร และเติม Heptane ลงไป จนสารละลายมีปริมาตร 4 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม Stock salt solution

1. ชั่ง Na_2SO_4 จำนวน 200 กรัม Li_2SO_4 จำนวน 100 กรัม และ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 40 กรัม
2. ละลายสารที่ชั่งในข้อ 1 ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วย volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม Stock salt reagent

เตรียม Stock salt reagent โดยการเติม Triethanolamine 8 มิลลิลิตร ต่อ Stock salt solution 100 มิลลิลิตร โดยเตรียมก่อนใช้อย่างน้อย 15 นาที

วิธีการเตรียม Indicator solution

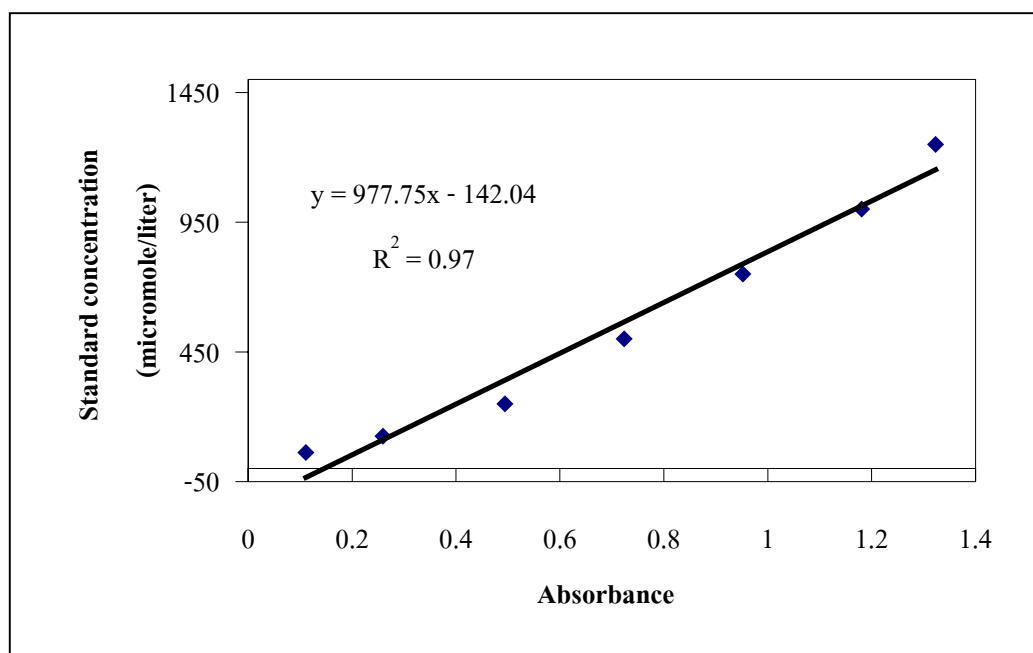
ละลาย 1-nitroso-2-naphthol จำนวน 0.2 กรัม ด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ลิตร สารละลายนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน โดยบรรจุใส่ขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน

1. คูดสารละลายซึ่งมีส่วนผสมของ Chloroform-Heptane-Methanol ในอัตราส่วน 4:3:2 ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด จำนวน 4 มิลลิลิตร และคูดสารละลายมาตรฐานหรือซีรัมลงไป 100 ไมโครลิตร ปิดฝาให้แน่นเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย
2. เติมสารละลาย HCl 0.035N จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,200 รอบต่อนาที (rpm) นาน 3 นาที
3. คูดสารละลายส่วนบนทิ้ง โดยพยายามอย่าให้รบกวนสารละลายด้านล่างและชั้นของโปรตีนที่เคลือบอยู่บนผิว
4. เติม **Stock salt reagent** ลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าหลอดนาน 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที (rpm) นาน 5 นาที
5. คูดสารละลายส่วนบน 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่สะอาด และเติม Indicator ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ทิ้งให้เกิดสีประมาณ 20 นาที จากนั้นนำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 435 นาโนเมตร

ตารางผนวกที่ 1 ค่าความเข้มข้นของสารละลายกรดโอเลอิก และค่าการดูดกลืนแสง

Concentration (micromole/liter)	O.D.
62.5	0.111
125	0.259
250	0.494
500	0.724
750	0.952
1000	1.181
1250	1.323



ภาพผนวกที่ 18 ความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดไขมัน โอเลอิกใน
ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ: A = Absorbance ที่ 435 nm.

จากรูปผนวกที่ 18 ค่า linear regression มีสมการเป็นดังนี้

$$[\text{FFA}] = 977.75 A - 142.04$$

โดย [FFA] คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ มีหน่วยเป็น micromole / liter

A คือ ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 435 นาโนเมตร

การศึกษาารูปแบบของไลโปโปรตีนในซีรัม (serum lipoprotein pattern) โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีการของ Helena Laboratories, U.S.A

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือเซลลูโลสอะซิเตทอิเล็กโตรโฟรีซิส และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Helena Laboratories, U.S.A.)
2. แผ่นเซลลูโลสอะซิเตท (TITAN III Lipo) ขนาด 76 x 60 มิลลิเมตร
3. จานแก้ว
4. ตู้อบ (Mettmert, Germany)
5. Desitometer (BIO-RAD, Model GS-670)
6. กระจกกรอง
7. กระจกสไลด์
8. Micropipette
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง
10. Micro tube

สารเคมี

1. Tris-barbital sodium barbital buffer
2. สีย้อม oil red O.
3. สารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N
4. เมททานอล
5. กลีเซอริน (Glycerine)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย Tris-barbital-sodium barbital buffer pH 8.8 โดยละลาย Tris-barbital-sodium barbital buffer จำนวน 18 กรัม ในน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 650 มิลลิลิตร นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ 100

มิลลิลิตร ลงในอ่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 ข้างของเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ใส่กระดาษกรอง (wick) ที่ชุ่มด้วยบัฟเฟอร์ลงในอ่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 ข้างเพื่อเป็นสะพานเชื่อมกระแสไฟฟ้า ปิดฝาเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อป้องกันการระเหยของสารละลายบัฟเฟอร์

2. บรรจุซีรัม ปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงในช่องใส่สาร นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดที่แช่ในบัฟเฟอร์มาซับด้วยกระดาษกรอง หายแผ่นขึ้นแล้วนำ applicator มากดในช่องที่ใส่ซีรัม 3-4 ครั้ง จากนั้นนำ applicator มากดลงแผ่นเซลล์โลส นาน 5 วินาที

3. นำแผ่นเซลล์โลสที่ใส่สารเรียบร้อยแล้วมาวางคว่ำบนอ่างอิเล็กโทรด เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟที่ 180 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที

4. นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดออกมาย้อมสี ด้วยสารละลายสีย้อม oil red O. โดยวางแผ่นหงายขึ้น ทำการย้อมสีเป็นเวลา 25 นาที ระหว่างย้อมสีให้ทำการเขย่าสารละลายไปมาเบา ๆ เมื่อสิ้นสุดเวลา ย้อมสีจะปรากฏแถบของไลโปโปรตีนขึ้นบนแผ่นเซลล์โลสอะซิเตด

เตรียมสารละลายสีย้อม oil red O. โดยละลายสีย้อม oil red O ในเมทานอล ให้มีความเข้มข้น 0.2% (W/V) จากนั้นนำสารละลายนี้จำนวน 30 มิลลิลิตร ไปผสมกับ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N จำนวน 10 มิลลิลิตร สารละลายผสมนี้ให้เตรียมล่วงหน้าก่อนใช้

5. นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดขึ้นจากสารละลายสีย้อม และนำไปล้างด้วยน้ำเปล่า ใช้กระดาษกรองซับแผ่นเซลล์โลสอะซิเตด นำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดไปอ่าน ขนาดและความเข้มของแถบไลโปโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่อง densitometer ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร บันทึกค่าที่อ่านได้ จากนั้นนำแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดมาแช่ลงในสารละลาย glycerine (กลีเซอริน 3 ส่วน กับ เมทานอล 1 ส่วน) เพื่อเก็บรักษาแผ่นเซลล์โลสอะซิเตดนี้ไว้

การแยกซีรัมไลโปโปรตีน โดยเทคนิคการตกตะกอนด้วย เด็กซ์แทรนซัลเฟต ตามวิธีการของ
Glascock *et al.* (1966)

สารเคมี

1. เด็กซ์แทรนซัลเฟต (Dextran sulfate) ความเข้มข้น 10% W/V
2. เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 5% W/V
3. เกลือแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ความเข้มข้น 1 M และ 0.1 M
4. เกลือโซเดียม ซิเตรท (Sodium citrate) ความเข้มข้น 3.4% W/V

เตรียม สารละลาย dextran sulfate reagent โดยใช้ สารละลาย dextran sulfate ความเข้มข้น 10% W/V ผสมกับ สารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 1 M ในอัตราส่วน 1:5 (V:V)

วิธีการ

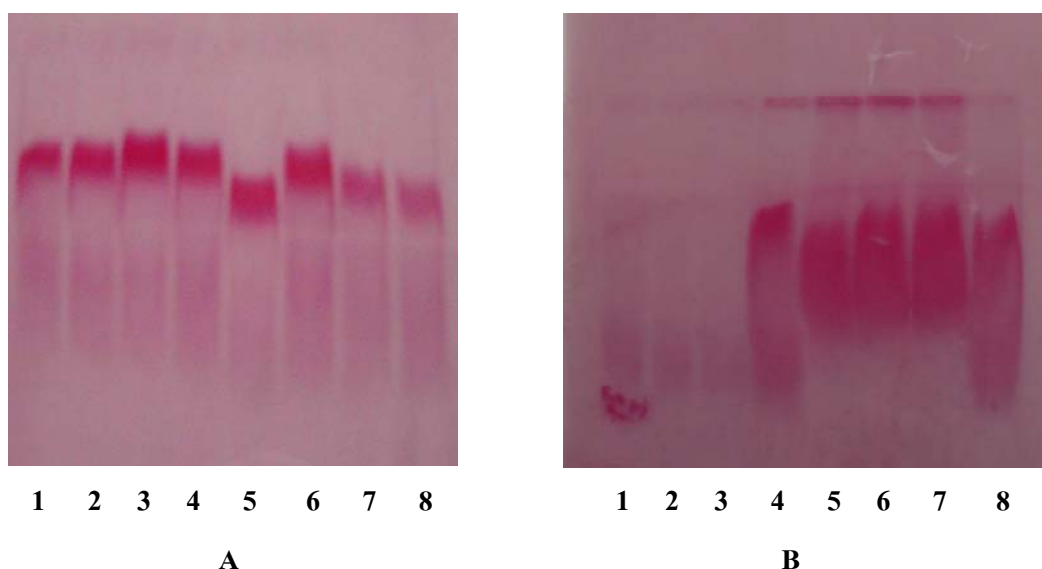
1. นำตัวอย่างซีรัมที่ต้องการแยกไลโปโปรตีนมาผสมกับ dextran sulfate reagent ในอัตราส่วน ซีรัม 1 มิลลิลิตร ต่อ dextran sulfate reagent 0.14 มิลลิลิตร
2. ตั้งสารละลายทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 2,800 x g ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. นำส่วนที่เป็นสารละลายใสด้านบน (supernatant) ซึ่งเป็นไลโปโปรตีนชนิด HDL แยกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
4. นำตะกอนที่เหลือมาละลายใหม่ โดยใช้สารละลาย NaCl 5% W/V ในอัตราส่วน 1:20 ของปริมาตรซีรัมเมื่อเริ่มต้น เขย่าหลอดทดลอง แล้วแยกสารละลายที่ละลายได้ออก จดบันทึกปริมาตรสารละลายที่แยกได้

5. นำสารละลายที่แยกออกมา ไปทำการตกตะกอนอีกครั้ง ด้วยสารละลาย CaCl_2 0.1 M โดยใช้ในอัตราส่วน 10 เท่าของปริมาตรสารละลายที่แยกได้ นำสารละลายผสมนี้ตั้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ½ ชั่วโมง

6. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 2,800 x g ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังจากการปั่นสารละลายจะตกตะกอน ส่วนที่เป็นตะกอนจะเป็นส่วนของไลโปโปรตีนชนิด LDL ทำการดูดสารละลายใสด้านบนออกทิ้งไป นำส่วนตะกอนมาละลาย กับสารละลาย sodium citrate 3.4% W/V ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ ปริมาตรของซีรัมเมื่อเริ่มต้น สารละลายส่วนนี้จะเป็นสารละลายของไลโปโปรตีน ชนิด LDL

การเปรียบเทียบตำแหน่งแถบซีรัมไลโปโปรตีนที่เกิดขึ้นบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท

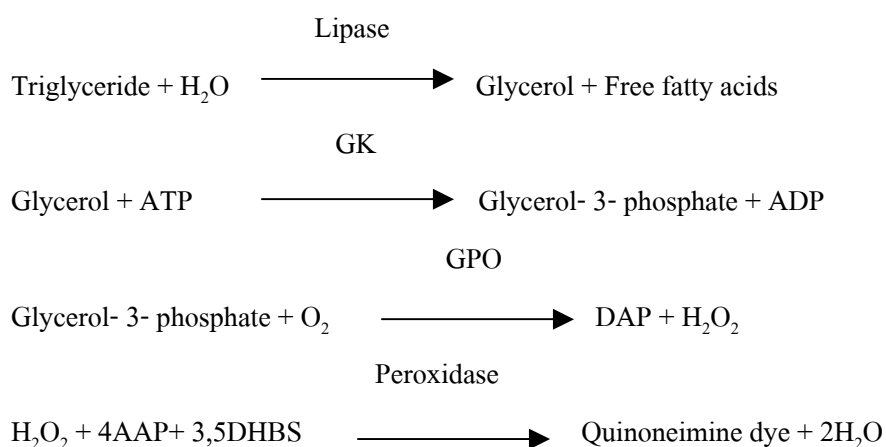
นำตัวอย่างซีรัมไลโปโปรตีนที่แยกโดยวิธีการตกตะกอนและซีรัมปกติ ไปทำการแยกซีรัมไลโปโปรตีนบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท ตามวิธีของ Helena lipoprotein electrophoresis procedure (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) เพื่อเปรียบเทียบแถบที่เกิดขึ้นบนแผ่น เซลลูโลสอะซิเตท วิธีนี้ทำให้สามารถระบุตำแหน่งของซีรัมไลโปโปรตีนแต่ละชนิดได้ ดังแสดงในภาพผนวกที่ 19



ภาพผนวกที่ 19 รูปแบบของซีรัมไลโปโปรตีนบนแผ่นเซลลูโลส-อะซิเตท **A1-A4** รูปแบบของซีรัมไลโปโปรตีนในซีรัมไก่ไข่ที่ได้รับอาหารโปรตีน 14 เปอร์เซ็นต์ กรดอะมิโนเมทไธโอนีน 0.28-0.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **A5, A8, B4, B8** รูปแบบของซีรัมไลโปโปรตีนในซีรัมไก่ไข่ทั่วไป **A6,A8** รูปแบบของซีรัมไลโปโปรตีนในซีรัมไก่ไข่ที่ได้รับอาหารโปรตีน 16 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **B1-B3** ไลโปโปรตีนชนิด HDL **B5-B7** ไลโปโปรตีน ชนิด LDL

การวิเคราะห์หาไตรกลีเซอไรด์ด้วย **Enzymatic colorimetric Method** โดยใช้ชุดทดสอบของบริษัท **Erba diagnostic Mannheim GmbH**

หลักการ



GK = Glycerol Kinase

GPO = Glycerol Phosphate Oxidase

DAP = Dihydroxyacetone Phosphate

ATP = Adenosine triphosphate

4-AAP = 4- Aminoantipyrine

3,5- DHBS = 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzene sulfonate

สารเคมี (Working reagent)

1. ATP 2.5 mmol/l
2. Mg^{2+} 2.5 mmol/l
3. 4- Aminoantipyrine 0.8 mmol/l
4. 3,5- DHBS 1 mmol/l
5. Peroxidase > 2,000 U/l
6. Glycerol Kinase > 550 U/l
7. Glycerol Phosphate Oxidase > 8,000 U/l
8. Lipoprotein Lipase > 3,500 U/l
9. Buffer (pH 7.0 ± 0.1 ที่ 20 องศาเซลเซียส) 53 mmol/l

อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. ไมโครปิเปตขนาดที่สามารถดูดสารละลายปริมาตร 10 และ 1,000 ไมโครลิตร
3. ปิเปตขนาด 50 มิลลิลิตร
4. Water bath ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 37 ± 2 องศาเซลเซียส
5. เครื่อง Vortex mixer
6. เครื่อง Spectrophotometer ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

วิธีการวิเคราะห์

1. นำสารเคมีต่าง ๆ และตัวอย่างมาไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนทำการวิเคราะห์ (15-28 องศาเซลเซียส)
2. เขียนฉลากติดหลอดทดลอง blank standard และ sample
3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอด blank เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง standard และเติมน้ำกลั่นลงในหลอด sample 10 ไมโครลิตร
4. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง blank standard และ sample
5. เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer นาน 1 นาที
6. นำไปตั้งไว้ใน Water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

การคำนวณ

$$\text{ไตรกลีเซอไรด์ (mg/dl)} = \left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน}} \right) \times \text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (mg/dl)}$$