บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

พืชผักและน้ำสกัดพืชผัก

เลือกพืชผักที่มีรายงานว่าน่าจะสามารถลดคอเลสเตอรอลในเส้นเลือดได้มาไม่น้อยกว่า 7 ชนิด เช่น กระเทียม ขึ้นฉ่าย ถั่วพู ถั่วฝักยาว มะเขือพวง เป็นต้น จากนั้นสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 100 g แช่ใน 25 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ซึ่งประกอบด้วยเกลือ 0.5 M sodium chloride และ 5 mM 2-mercaptoethanol ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 °C ทำให้เป็นเนื้อละเอียดโดยการนำไปปั่นแล้วกรองเอาเฉพาะน้ำโดยใช้ผ้าขาวบาง จะได้น้ำสกัดพืชผัก

การตรวจฤทธิ์ลดคอเลสเตอรอลในหนูทดลอง

เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิด hypercholesterolemia ในหนูทดลอง หนูจะได้รับอาหารที่มี saturated fat (milk fat 21% wt/wt) และ cholesterol (0.15% wt/wt) จากนั้น หนูจะถูกเจาะเลือดและวัดปริมาณคอเลสเตอรอลเป็นระยะ ๆ

การตรวจปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดหนูทดลอง

คอเลสเตอรอลรวมในสิ่งส่งตรวจที่อยู่ในรูปของคอเลสเทอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) จะถูกย่อยโดยเอนไซม์คอเลสเทอรอลเอสเทอเรส (cholesterol esterase; CE) ได้เป็นคอเลสเทอรอล และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) หลังจากนั้นคอเลสเทอรอลจะถูกออกซิไดส์โดยเอนไซม์คลอเลสเทอรอล ออกซิเดส (cholesterol oxidase; CO) ได้ผลิตผลส่วนหนึ่งเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) ไปรวมกับ hydroxybenzoic acid (HBA) และ 4-aminoantipyrine (4AAP) โดยการทำงานของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ได้สารประกอบที่มีสีเรียกว่า quinoneimine วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ความเข้มสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของคอเลสเทอรอลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงสมการข้างล่างนี้

$$\text{Cholesterol esters} \xrightarrow{CE} \text{Cholesterol} + \text{Free fatty acid}$$

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{CO} \text{Cholest-4-en-3-one} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{Phenol} + 4\text{AP} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Quinoneimine dye} + 4H_2O$$

วิธีการวัด

1. เติมน้ำยาหลอดละ 1 มล.ในหลอดที่เป็น blank, standard, control, unknown และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ. 5 นาที
2. เติมสารต่างๆ ตามตารางข้างล่างนี้

สารที่เติม (ไมโครลิตร)	Blank	Standard	Control	Unknown
Standard	-	10	-	-
Control	-	-	10	-
Unknown	-	-	-	10
Distilled water (ไมโครลิตร)	10	-	-	-

3. นำทุกหลอดไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 6 นาที
4. เมื่อครบเวลานำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้หลอด blank ปรับ 0
5. บันทึกค่า A และนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล

$$\text{ความเข้มข้นคอเลสเทอรอล (มก.\%)} = \frac{A_{unk}}{A_{std}} \times C_{std}$$

โดยที่ A_{unk} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ unknown
A_{std} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน
C_{std} หมายถึง ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมตัวอย่างโดยผสมกับ 2xSDS sample buffer (125 mM Tris pH 6.8, 25% glycerol, 4% SDS, 0.008% BPB, 10% 2-mercaptoethanol) ปริมาณเท่ากัน จากนั้น นำไป load ลงบน polyacrylamide gel ที่มี running buffer จากนั้นให้ไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์คงที่ที่ 80 โวลต์ แล้วย้อม gel ด้วย coomassie blue staining หรือ silver Stain

2-Dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

นำตัวอย่างราว 80 µg มาผสมกับ rehydration solution (7 M Urea, 2 M Thiourea, 2 % CHAPS, DTT 7 mg/2.5 ml, 2 % IPG buffer และ 1% bromophenol blue) เพื่อให้ได้ volume 125 µl แล้ว apply บน IPG dry strips (pH 3-11 NL; GE Healthcare). ภายหลัง rehydration เป็นเวลา 12 ชั่วโมง run IEF ด้วยกระแสไฟฟ้า 500 V นาน 30 นาที; 1000 V นาน 30 นาที และ 5000 V ราว 1.40 ชม. ที่ 50 mA ต่อ strip จากนั้น soak strip นาน 15 นาที ใน reduction solution ตามด้วย alkylation solution 15 นาที ส่วน second dimension นั้น run SDS-PAGE ด้วย 13% (w/v) polyacrylamide gel ที่ constant current 20 mA ภายหลังย้อมเจล ทำการวิเคราะห์ผลด้วย ImageMaster 2D Platinum (Amersham Bioscience) และตัด spot ส่งไปวิเคราะห์ Peptide mass fingerprint ด้วย mass spectroscopy และวิเคราะห์

ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนด้วย liquid chromatography tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS) ที่สถาบันจีโนม สวทช. ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์พยาธิสภาพของเซลล์ตับด้วยการย้อม hematoxylin and eosin (H&E)

H & E เป็นวิธี*การย้อมสีชิ้นเนื้อ*เพื่อส่องกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจดู โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ที่เจริญไปเป็นมะเร็ง ขั้นตอนการย้อมสีมีดังนี้

- จุ่มสไลด์ชิ้นเนื้อในสี Mayer's hematoxylin นาน 5-7 นาที
- ล้างสไลด์ชิ้นเนื้อในน้ำไหลผ่านนานอย่างน้อย 15 นาที
- จุ่มสไลด์ชิ้นเนื้อในสี eosin นาน ½-1 นาที
- ทำ Dehydration โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อใน ethanol ดังนี้
- 95% ethanol 3 ครั้ง นาน 5 นาที 2 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
- 100% ethanol 3 ครั้ง นาน 5 นาที 2 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
- กำจัด ethanol โดยแช่ใน xylene 3 ครั้ง นาน 5 นาที 2 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
- ปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วย cover slip โดยหยดน้ำยา mounting medium ประมาณ 1-2 หยด

การแปลผล : nucleus : ติดสีน้ำเงิน cytoplasm : ติดสีชมพูอ่อนจนถึงเข้ม