

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง

3.1 น้ำยาและสารเคมี

3.1.1 Bicinochonic acid (BCA) assay kit (Pierce, Rockford, USA)

3.1.2 IEF pH gradient strip 7.3 cm. pH 3-10 (GE Healthcare, Sweden)

3.1.3 น้ำยาและสารเคมีอื่น ๆ ใช้ของบริษัทต่าง ๆ คือ Sigma (USA), Fluka (USA), GE Healthcare (Sweden), Carlo Erba (Italy), Merck (Germany)

3.2 ฐานทางจระเข้

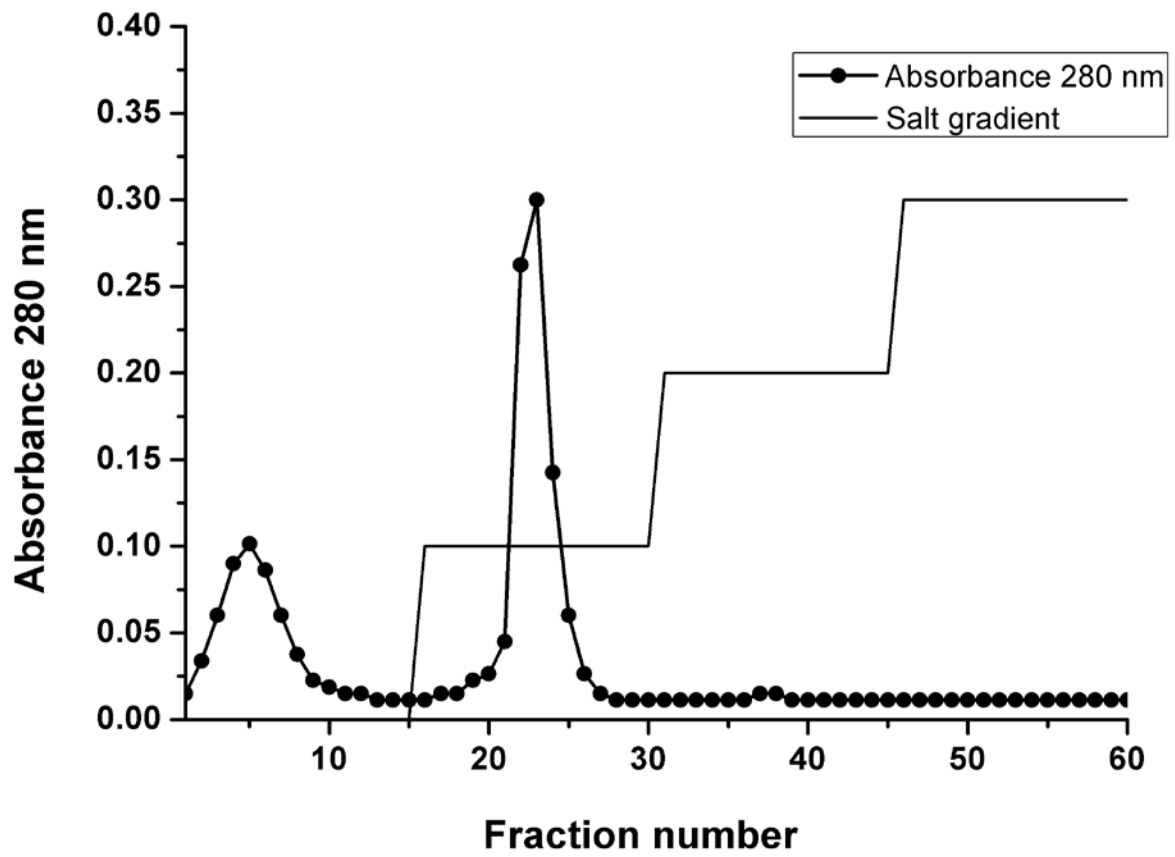
ฐานทางจระเข้ได้จากใบของพืชที่ปลูกในเขตอำเภอเมือง จ.นครราชสีมา

3.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

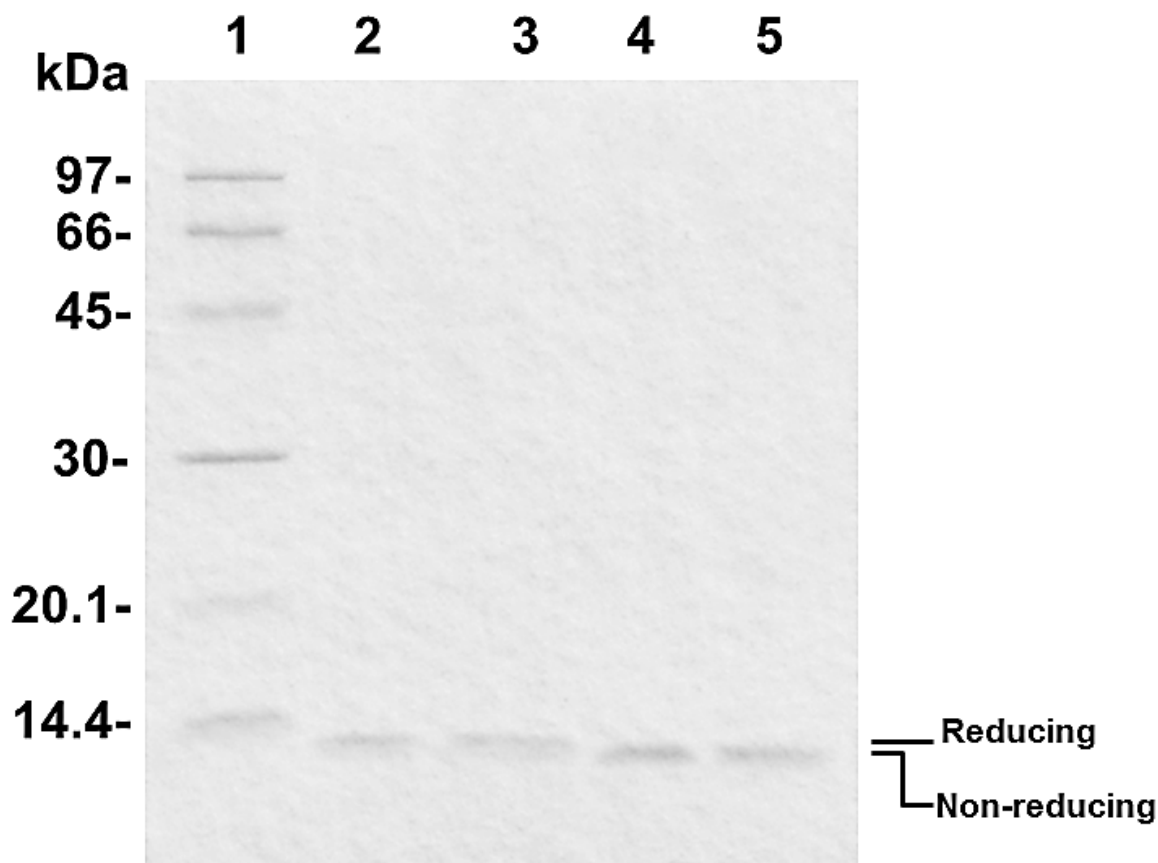
นำฐานที่ได้จากส่วนใบมาคั้นเอาน้ำ และกรองด้วยผ้าขาว ปั่นด้วย centrifuge (13,000xg) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ นำส่วนน้ำที่ได้มา dialysis ด้วย 25 mM sodium acetate buffer (NaOAc) pH 4.5 แล้วนำไปปั่นด้วย high speed centrifuge จะได้ส่วนตะกอนแยกออกจากส่วนน้ำใส นำส่วนใสไปทำให้บริสุทธิ์ (purify) ด้วย cation exchange chromatography (SP sepharose) โดยใช้ step gradient salt elution ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0-0.3 M NaCl ใน 25 mM sodium acetate buffer (NaOAc) pH 4.5 ด้วย flow rate 1 ml/min เก็บ fraction ละ 2 ml ติดตาม peak ของโปรตีนโดยวัดค่า OD ที่ 280 nm พบว่าโปรตีนที่ออกฤทธิ์เป็นทั้ง fibrinogenolytic และ fibrinolytic inhibitory activity (AVPI-12) จะถูกชะออกมาในช่วง 0.1 M NaCl (ดังรูปที่ 2) โปรตีนดังกล่าวมีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 14 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE (รูปที่ 3) หลังจากนั้น fraction ของโปรตีนที่ออกฤทธิ์จะ pool รวมกัน และ dialysis ด้วย 25 mM Tris-HCl pH 8.0 และนำไปใช้ในการทดสอบ activity ต่าง ๆ ในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้พบว่าโปรตีนที่ออกฤทธิ์เมื่อวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE จะเห็นแถบโปรตีน ในสภาวะ reducing ด้วย 2-mercaptoethanol จะเคลื่อนที่บนเจลได้ช้ากว่าในสภาวะที่ไม่มี 2-mercaptoethanol (non-reducing) ทั้งในสภาวะที่มีการต้มและไม่ต้มตัวอย่างที่ 95°C ก่อนที่จะแยกด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 3)

3.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยน้ำยา BCA assay kit ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ นำสารละลายโปรตีน 0.1 ml ผสมกับสารละลาย BCA working reagent 2 ml นำไป incubate ที่ 37 °C นาน 30 นาที หาความเข้มข้นโดยวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 562 nm โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 2 Chromatogram ของการทำ AVPI-12 ให้บริสุทธิ์ด้วย cation exchange column chromatography ชนิด SP sepharose



รูปที่ 3 SDS-PAGE (12.5%) แสดงความบริสุทธิ์ของโปรตีน AVPI-12 เปรียบเทียบระหว่างแถบโปรตีนในสถานะที่มี 2-mercaptoethanol เป็น reducing agent (lane 2 และ 3) และ สถานะที่ไม่มี 2-mercaptoethanol หรือ non-reducing condition (lane 4 และ 5) รวมทั้งในสถานะที่ไม่ต้ม (lane 2 and 4) และ ต้ม ตัวอย่าง (lane 3 และ 5) ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ก่อนแยกด้วย SDS-PAGE และ lane 1 คือ standard molecular weight protein markers

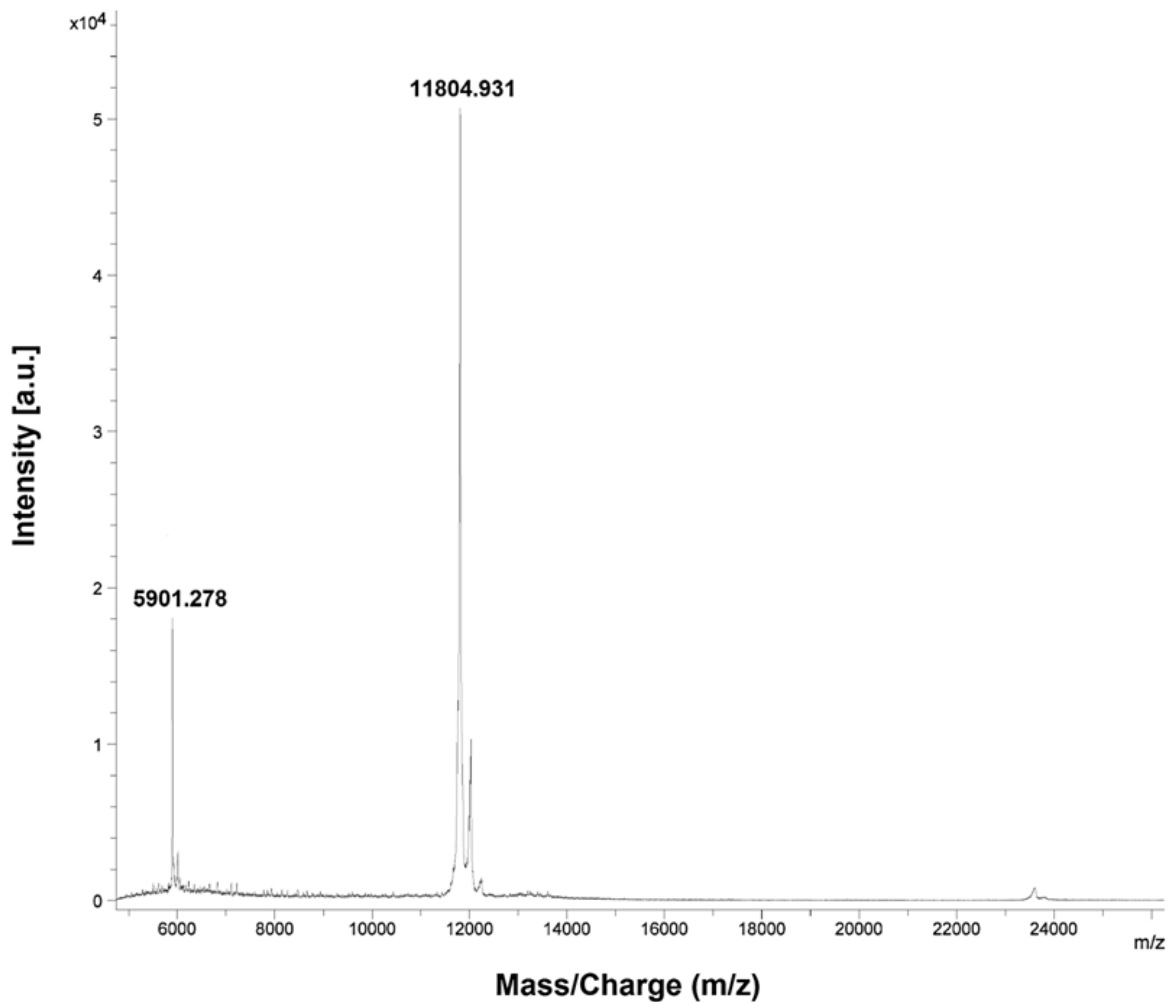
3.3 การหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค N-terminal sequencing

โปรตีน spot ของ AVPI-12 ที่ได้จาก 2D gel electrophoresis ที่ได้รับการ blot ลง PVDF membrane แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 นำไปหาลำดับกรดอะมิโนแบบ N-terminal sequencing ด้วย Edman degradation method ผลการทดลองพบว่าโปรตีนดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโน 10 ตัวแรกจากปลาย N ของ polypeptide chain ดังนี้

R-D-W-A-E-P-N-D-G-Y

3.4 การหาขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค Mass spectrophotometry

ขนาดของโปรตีน AVPI-12 วิเคราะห์ด้วย matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry โดยใช้ sinapinic acid (SA) เป็น MALDI matrix โดยทำการวิเคราะห์ ณ หน่วยบริการของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ผลการทดลองพบว่า intact mass ของ AVPI-12 มีขนาด 11,804.931 Da (รูปที่ 4)

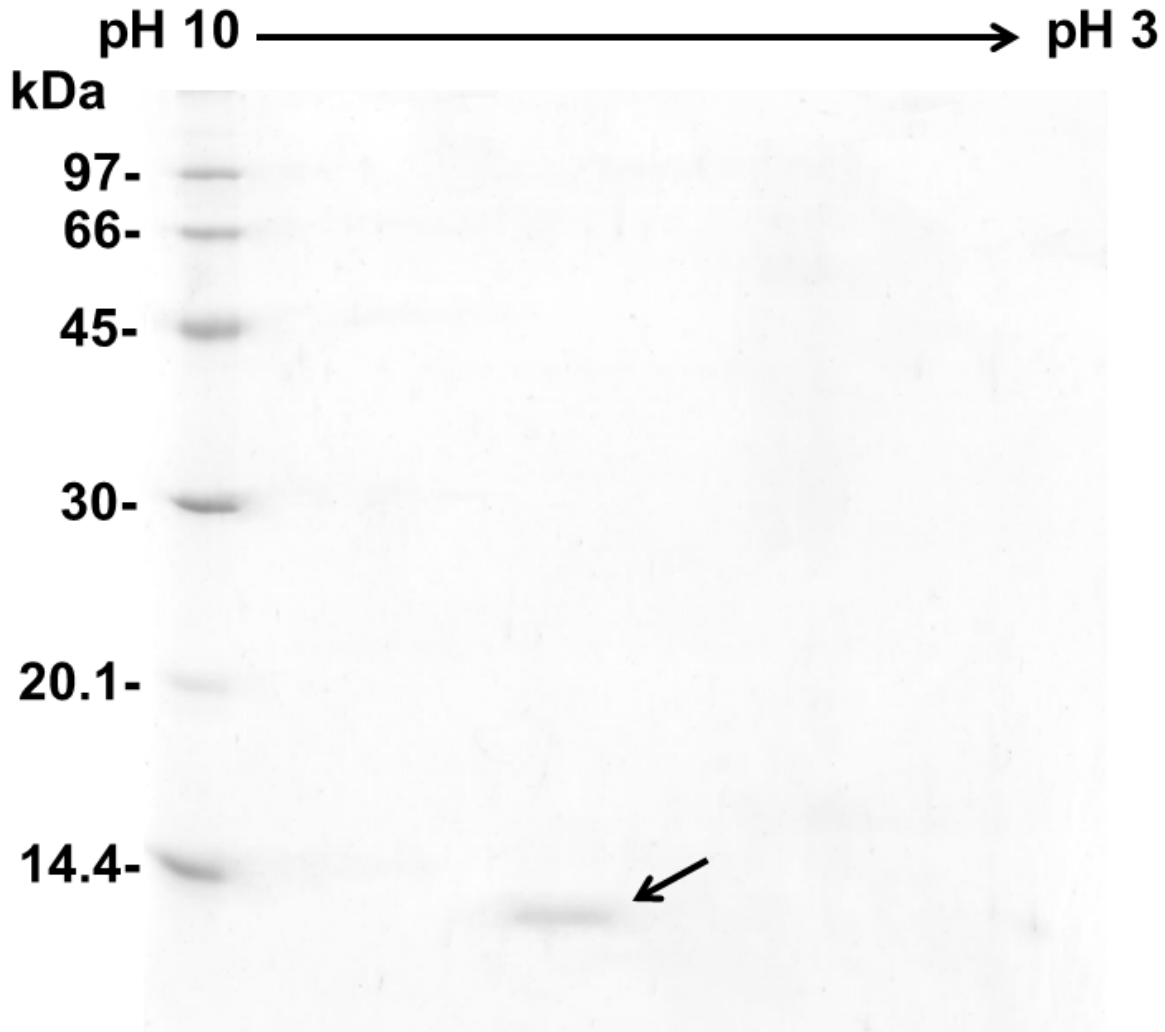


รูปที่ 4 Intact mass ของ AVPI-12 วิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry

3.5 Two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS-PAGE)

โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 μg นำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตามประจุใน first dimension โดยใช้ pH gradient strip pH 3-10 ยาว 7 cm และทำการแยกโปรตีนตามขนาด molecular weight อีกครั้งใน second dimension ด้วย 12.5% gel SDS-PAGE แล้วย้อมโปรตีนด้วย colloidal Coomassie brilliant blue G-250 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum software (GE Healthcare,

Uppsala, Sweden) พบว่าโปรตีนที่ขนาด molecular weight ประมาณ 12 kDa มีเพียงหนึ่ง subunit และมีค่า isoelectric point (pI) ประมาณ 7.43 (แสดงดังรูปที่ 5)



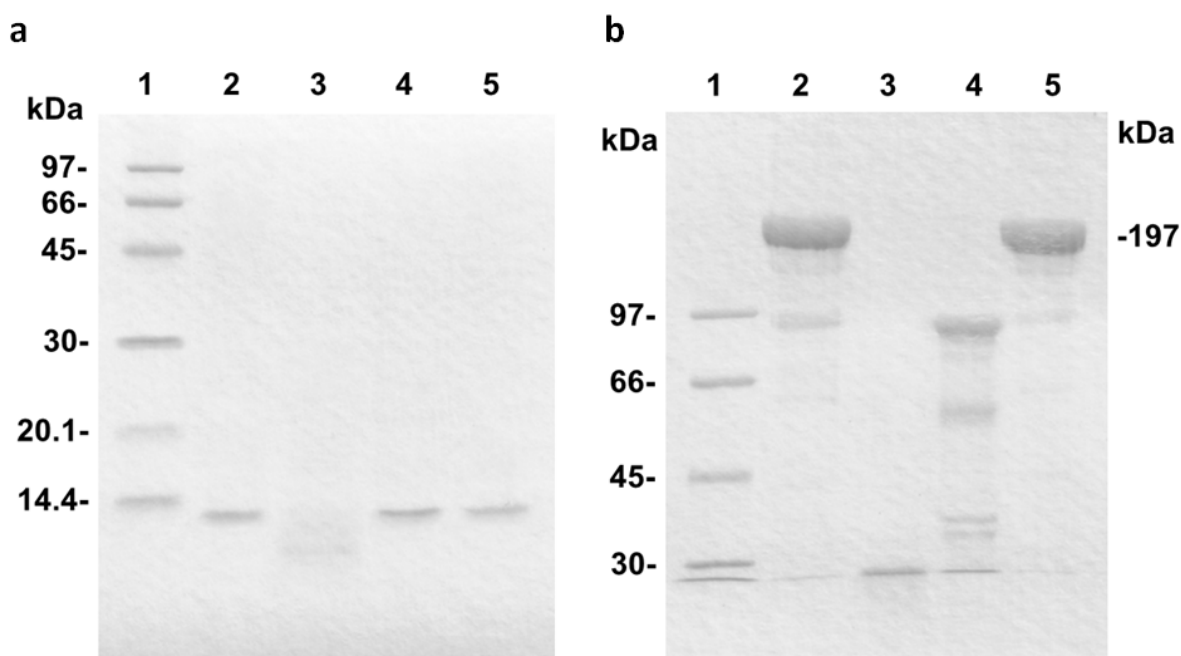
รูปที่ 5 ผล 2D gel electrophoresis ของโปรตีน AVPI-12 ที่ทำให้บริสุทธิ์ มีค่า pI ประมาณ 7.43 (ดังลูกศรชี้)

3.6 ความต้านทานต่อการถูกย่อยด้วย proteases

ความต้านทานของโปรตีน AVPI-12 ต่อการถูกย่อยด้วย proteases ต่าง ๆ ทดสอบโดยการผสมโปรตีน (10 μ g) กับ โปรติเอส (2 μ g) แต่ละชนิด คือ human plasmin, papain และ bovine trypsin และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม SDS-PAGE sample buffer ต้มที่ 95 °C เป็นเวลา 5

นาที่ แล้ววิเคราะห์ผลด้วย 12.5% SDS-PAGE ตัวควบคุมของการทดสอบคือ ส่วนผสมที่ไม่มีเอนไซม์แต่ใช้ 25 mM Tris-HCl pH 80 แทน ผลการทดลองทำเปรียบเทียบกับ human plasma α_2 -macroglobulin ซึ่งเป็น protease inhibitor ที่พบได้ในเลือดของมนุษย์

ผลการทดลองพบว่า AVPI-12 สามารถทนต่อการย่อยด้วย human plasmin และ bovine trypsin และถูกย่อยเกือบหมดด้วยเอนไซม์ papain (รูปที่ 6a) ซึ่งต่างจาก α_2 -macroglobulin โดย α_2 -macroglobulin ทนทานต่อการย่อยด้วย human plasmin แต่ถูกย่อยเกือบหมดด้วย bovine trypsin และย่อยจนหมดด้วย papain (รูปที่ 6b)



รูปที่ 6 ความคงทนต่อการถูกย่อยด้วย proteases ของ AVPI-12 (a) และ α_2 -macroglobulin (b)

แต่ละ inhibitor จะผสมกับ protease แต่ละชนิดคือ human plasmin (lane 2), papain (lane 3), bovine trypsin (lane 4) และ control ที่ปราศจาก protease (เติม 25 mM Tris-HCl pH 8.0 แทน) (lane 5) และ lane 1 คือ standard molecular weight protein markers

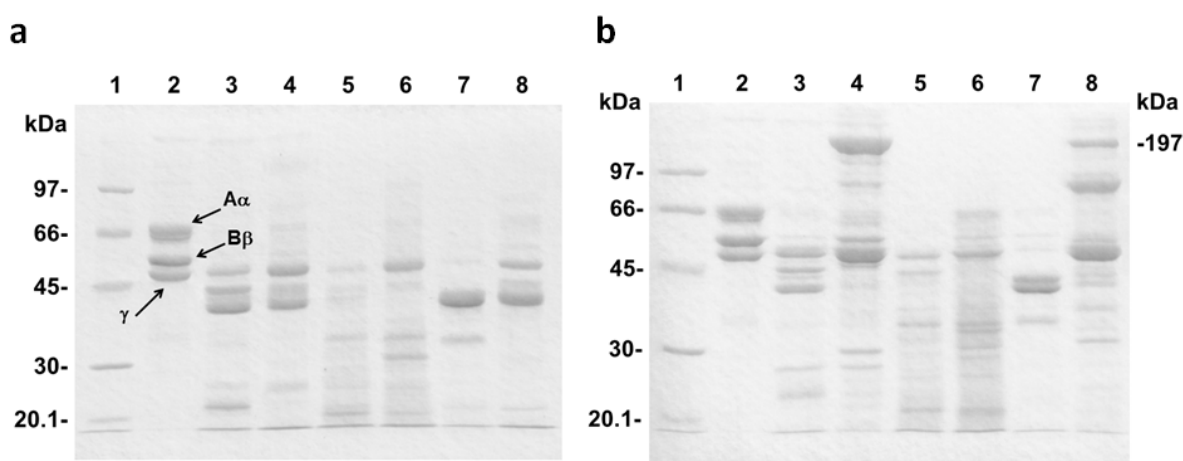
3.7 การทดสอบ fibrinogenolytic inhibitory activity

3.7.1 Fibrinogenolytic inhibitory pattern

รูปแบบการยับยั้งการย่อย human fibrinogen ด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ คือ human plasmin, papain และ bovine trypsin 12 ศึกษาโดยการดัดแปลงจากวิธีของ Rajesh และคณะ (2006) ทำการทดสอบโดยนำแต่ละ protease (2 μ g) ผสมกับ AVPI-12 (10 μ g) ใน total volume 20 μ l และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นส่วนผสมระหว่าง AVPI-12 และเอนไซม์แต่ละชนิด จะเติมลงในหลอดทดลองที่มี 50 μ g

ของ human fibrinogen โดยใช้ 25 mM Tris-HCl pH 8.0 เป็นตัวทำละลาย ให้ได้ total volume 40 μ l และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 120 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย denaturing buffer (ประกอบด้วย 1M urea, 4% SDS และ 4% 2-mercaptoethanol) วิเคราะห์ผลด้วย 10% SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 ผลการทดลองที่ได้จะศึกษาเปรียบเทียบกับความเป็น fibrinogenolytic inhibitory activity ของ α_2 -macroglobulin

ผลการทดลองพบว่าทั้ง AVPI-12 และ α_2 -macroglobulin สามารถป้องกัน γ -subunit ของ human fibrinogen จากการย่อยด้วย human plasmin และ bovine trypsin ได้ดังแสดงในรูปที่ 7 นอกจากนี้ยังพบว่า AVPI-12 สามารถยับยั้ง γ -subunit ของ human fibrinogen จากการย่อยด้วย papain (รูปที่ 7a) แต่ α_2 -macroglobulin ไม่สามารถยับยั้งได้ (รูปที่ 7b)



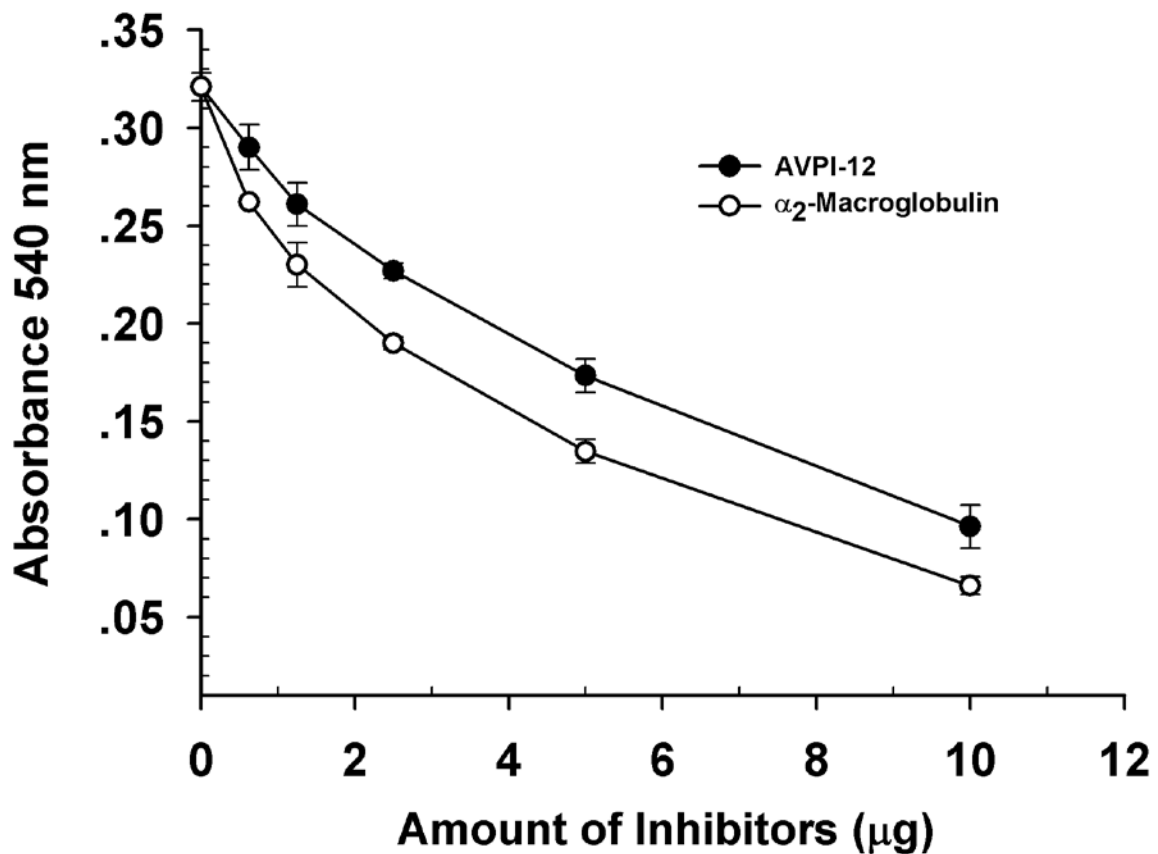
รูปที่ 7 Human fibrinogenolytic inhibitory patterns ของ AVPI-12 (a) และ α_2 -macroglobulin (b) ต่อ เอนไซม์ plasmin (lane 4), papain (lane 6) และ trypsin (lane 8) ผลการทดลองเปรียบเทียบกับ human fibrinogen (lane 2) และ human fibrinogen ที่ถูกย่อยด้วย plasmin (lane 3), papain (lane 5) และ trypsin (lane 7) lane 1 แสดง standard protein molecular weight markers

3.7.2 Human plasmin fibrinogenolytic inhibitory activity

การออกฤทธิ์ยับยั้งการย่อย human fibrinogen ด้วย human plasmin ของ AVPI-12 ศึกษาโดยการ คัดแปลงจากวิธีของ Satake และคณะ (1963) ทำการทดสอบโดยการผสม human plasmin (2 μ g) กับ AVPI-12 ปริมาณต่าง ๆ (0-10 μ g) ใน total volume 40 μ l และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำส่วนผสมระหว่างเอนไซม์และตัวยับยั้งเติมลงในหลอดทดลองที่มี 10 mg/ml human fibrinogen ที่มี 25 mM Tris-HCl pH 8.0 เป็นตัวทำละลาย (40 μ l) และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 40 μ l และปั่นที่ 10,000xg นาน 20 นาที นำส่วนใสที่มี digested peptide ปริมาณ 25 μ l มาวัดความเข้มข้นด้วย BCA assay

kit (ดังแสดงในข้อ 3.2) ปฏิบัติการยับยั้งศึกษาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ที่ลดลง Blank ของการทดลองคือหลอดที่ไม่มีส่วนผสมของเอนไซม์และ human fibrinogen แต่ละการทำลองทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และ positive control คือ ปฏิบัติการที่มี α_2 -macroglobulin

ผลการทดลองพบว่าเมื่อปริมาณของ AVPI-12 หรือตัวยับยั้งเพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งการทำงานของ human plasmin ได้มากขึ้นโดยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ลดลงมากขึ้น (รูปที่ 8) หรือแสดงถึงว่าเอนไซม์ plasmin สามารถย่อย human fibrinogen ได้น้อยลงทำให้ได้ digested peptide products ลดลง ผลการทดลองสอดคล้องกับ positive control คือ α_2 -macroglobulin (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 Fibrinogenolytic inhibitory activity ของ AVPI-12 แบบ dose dependence ต่อ human plasmin โดยใช้ α_2 -macroglobulin เป็น positive control

3.8 การทดสอบ fibrinolytic inhibitory activity

3.8.1 ศึกษา fibrinolytic inhibitory activity ด้วย colorimetric detection

เตรียม fibrin clot โดยการดัดแปลงวิธีของ Rajesh และคณะ (2006) ทำได้โดยผสม 31 μl ของ human fibrinogen ที่มีความเข้มข้น 20 mg/ml ด้วย 3 μl ของ 0.5 M CaCl_2 และ 6 μl ของ 0.25 NIH units human thrombin และตั้งทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้น fibrin clot จะนำไปใส่ในหลอดทดลองที่มี plasmin 4 μg และ AVPI-12 12 μg ปริมาตรทั้งหมด 40 μl ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นให้ส่วนผสมทั้งหมดทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 150 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% TCA ปริมาตร 40 μl และนำไปปั่นที่ 10,000xg นาน 20 นาที วัดความเข้มข้นของ digested peptides ด้วย BCA assay kit (ดังแสดงในข้อ 3.2) ปฏิกิริยาการยับยั้งศึกษาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ที่ลดลง Blank ของการทดลองคือหลอดที่ไม่มีส่วนผสมของเอนไซม์และ human fibrinogen แต่ละ การทดลองทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และ positive control คือ ปฏิกิริยาที่มี α_2 -macroglobulin สามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์ fibrinolytic inhibition ได้ดังสมการข้างล่าง

$$\text{Fibrinolytic inhibition (\%)} = \frac{(E - I)}{E} \times 100$$

โดย E คือ activity ของ plasmin ในสถานะที่ไม่มี inhibitor

I คือ activity ของ plasmin ในสถานะที่มี inhibitor

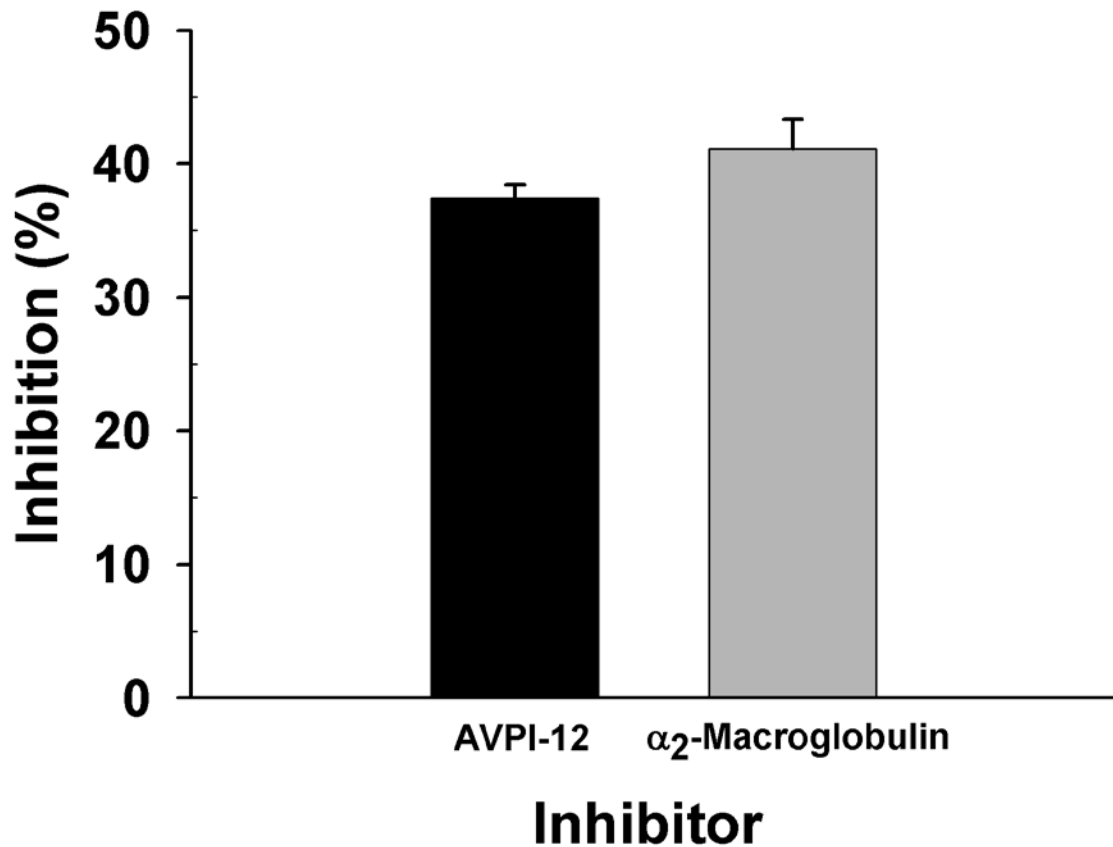
ผลการทดลองพบว่า fibrinolytic inhibitory activity ของ AVPI-12 และ α_2 -macroglobulin ต่อการทำงานของ plasmin มีค่าเท่ากับ $37.4 \pm 1.0\%$ และ $41.1 \pm 2.1\%$ ตามลำดับ (แสดงในรูปที่ 9)

3.8.2 ศึกษา fibrinolytic inhibitory activity ด้วย small -angle X-ray scattering (SAXS)

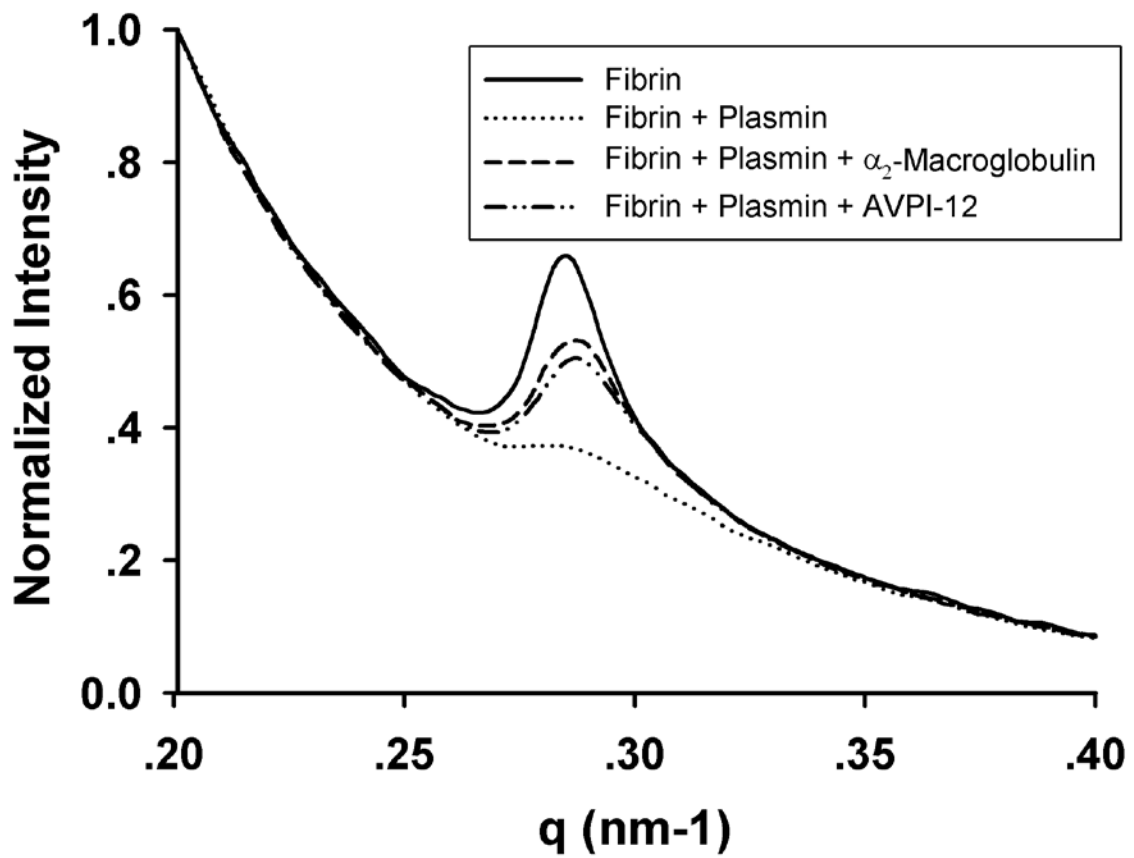
Small-angle X-ray scattering (SAXS) ใช้ในการทดสอบการเป็น fibrinolytic inhibitory activity โดยทำการทดลอง ณ ระบบลำแสงที่ BL-2.2 ของสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) จ. นครราชสีมา fibrin clot เตรียมโดยการผสม 77 μl ของ human fibrinogen (20 mg/ml) ด้วย 8 μl ของ 0.5 M CaCl_2 และ 15 μl ของ 0.25 NIH units thrombin ลงใน sample holder ที่ทั้งสองข้างปิดด้วย kapton tapes ที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นเติม 80 μl ของสารผสมระหว่าง plasmin 8 μg และ AVPI-12 24 μg ที่ได้ทำปฏิกิริยากันแล้วที่อุณหภูมิ 37 °C 60 min ตั้งส่วนผสมทั้งหมดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที แล้วนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ fibrin clot ด้วย SAXS วิเคราะห์ผลข้อมูลด้วยโปรแกรม SAXSIT version 3.61 α_2 -macroglobulin ใช้เป็น positive control ของการทดลอง

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 10 พบว่า peak position ของ fibrin clot ไม่ว่าในสถานะที่มี inhibitors ทั้ง AVPI-12 และ α_2 -macroglobulin หรือในสถานะที่มีแต่ plasmin และ fibrin clot เปล่า ๆ พบว่าตำแหน่ง

ของ peak หรือ ค่า q และ fibrin periodicity มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่ความสูงของ peak ซึ่งแสดงถึงปริมาณของ fibrin clot ลดลง หรือมีการเปลี่ยนจากภาวะ solid state ไปเป็น liquid state พบว่าในภาวะที่มี fibrin clot และ plasmin ความสูงของ peak จะต่ำสุด และเมื่อมีตัวยับยั้งหรือ inhibitor ทั้ง AVPI-12 และ α_2 -macroglobulin ความสูงของ peak จะต่ำกว่า peak ของ fibrin clot ในสภาวะที่ไม่มีทั้งเอนไซม์และ inhibitor เล็กน้อย



รูปที่ 9 ผลของ AVPI-12 ต่อ fibrinolytic activity ของ human plasmin การทดลองใช้ α_2 -macroglobulin เป็น positive control



รูปที่ 10 SAXS spectra แสดง fibrinolytic inhibitory activity ของ AVPI-12 ต่อ human plasmin โดยใช้ α_2 -macroglobulin เป็น positive control