ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การรีดเก็บน้ำเชื้อกระบือปลักและเกณฑ์การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

การรีดเก็บน้ำเชื้อกระบือปลักและเกณฑ์การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

1. การรีดเก็บน้ำเชื้อกระบือ (semen collection)

1.1 การคัดเลือกพ่อกระบือ

กระบือปลักเพศผู้เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุ 20 เดือน ในกระบือพ่อพันธุ์ที่มีกรรมพันธุ์ดี ถ้าได้รับการเลี้ยงและให้อาหารอย่างดี จะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วขึ้น ก่อนจะทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จะต้องทำการคัดเลือกกระบือพ่อพันธุ์ก่อน แต่เดิมการคัดเลือกพ่อกระบือสำหรับเป็นพ่อพันธุ์หรือใช้ในการผสมเทียมขึ้นกับ การคัดเลือกโดยดูรูปร่างลักษณะภายนอก หรือคัดจากพ่อกระบือที่ชนะการประกวด แต่ปัจจุบันกระบือที่คัดเลือกเป็นพ่อพันธุ์ คือกระบือที่ผ่านการทดสอบสมรรถภาพกระบือของกรมปศุสัตว์ (ปาริฉัตร สุขโต, 2544)

1.2 การฝึกหัดพ่อกระบือ

พ่อกระบือควรเริ่มการฝึกรีดน้ำเชื้อเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ที่อายุประมาณ 20 เดือนเป็นต้นไป การฝึกหัดพ่อกระบือเพื่อทำการรีดน้ำเชื้อควรดำเนินการทุกวันตอนเช้าตรู่ ก่อนที่จะฝึกรีดเก็บน้ำเชื้อ ควรนำพ่อกระบือมาแยกขังเดี่ยว ฝึกการจับจูงให้เชื่องและคุ้นเคยกับคนเลี้ยงก่อน ในระยะแรกของการฝึกรีดเก็บน้ำเชื้อ จะใช้แม่กระบือเป็นสัดเป็นตัวล่อ สำหรับพ่อกระบือที่โตเต็มที่และผ่านการฝึกดีแล้วสามารถใช้กระบือผู้ตอน หรือกระบือเมียที่ไม่เป็นสัดมาเป็นตัวล่อ (ปาริฉัตร สุขโต, 2544)

1.3 การรีดเก็บน้ำเชื้อ

การรีดเก็บน้ำเชื้อในกระบือสามารถรีดเก็บโดยใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina : AV) ซึ่งประกอบด้วย

- ท่อนอกและยางใน ท่อนอกทำด้วยยางชนิดแข็งรูปทรงกระบอก ตัวท่อจะมีช่องเจาะเพื่อใส่วาล์วหรือท่อสำหรับเติมน้ำและอากาศให้เป็นตัวปรับอุณหภูมิและแรงดันภายในให้เหมาะสมกับพ่อพันธุ์แต่ละตัวได้อย่างสะดวก สำหรับยางในทำด้วยยางธรรมชาติหรือยางสังเคราะห์อ่อนนิ่ม และต้องยาวกว่าท่อนอก
- ท่อกรวยรองน้ำเชื้อ
- หลอดเก็บน้ำเชื้อ
- ถุงหุ้มกันแสงและอุณหภูมิ

ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ พ่อกระบือจะถูกนำไปยังตัวล่อซึ่งถูกบังคับอยู่ในซอง ตัวล่ออาจเป็นแม่กระบือหรือพ่อกระบือ และมักรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อกระบือแต่ละตัว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยทำการรีดเก็บ 2 ครั้ง ห่างกันประมาณ 10 นาที (ปาริฉัตร สุขโต, 2544)

ภาพที่ 23 แสดงช่องคลอดเทียม (artificial vagina, AV)

1.4 คุณลักษณะของน้ำเชื้อกระบือปลัก

- ปริมาตร

ปาริฉัตร สุขโต และคณะ (2527) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำเชื้อพ่อกระบือปลักในฤดูต่าง ๆ พบว่าฤดูกาลไม่มีอิทธิพลต่อปริมาตรและความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ค่าเฉลี่ยของปริมาตร น้ำเชื้อเท่ากับ 2.44 มิลลิลิตร

- สีและความหนืด

น้ำเชื้อกระบือมีสีขาวเหมือนน้ำนม จนถึงสีครีม น้ำเชื้อที่มีความหนืดและความหนาแน่นดีจะมีสีครีมและมีลักษณะข้น แสดงถึงความเข้มข้น หรือมีจำนวนอสุจิมาก

- พีเอช ของน้ำเชื้อ

ค่าพีเอช ของน้ำเชื้อกระบือปลักประมาณ 6.9

- การเคลื่อนไหวรายตัวและการเคลื่อนไหวหมู่ของตัวอสุจิ

การเคลื่อนไหวรายตัวของตัวอสุจิที่มีชีวิตในน้ำเชื้อกระบือปลัก ตรวจสอบทันทีหลังการรีดเก็บน้ำเชื้อ มีค่าเฉลี่ย 81.31% (ปาริฉัตร สุขโต และคณะ, 2527) และจากการศึกษาของ

Chongthammakun *et al.* (1987) (อ้างถึงในปาริฉัตร สุขโต, 2544) พบว่าการเคลื่อนไหวรายตัวของอสุจิมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 80.06% และในน้ำเชื้อของพ่อกระบือที่โตเต็มที่และมีสุขภาพสมบูรณ์ การเคลื่อนไหวหมู่จะเคลื่อนไหวหมุนเป็นลูกคลื่นอย่างรวดเร็ว

- ความเข้มข้นของตัวอสุจิ

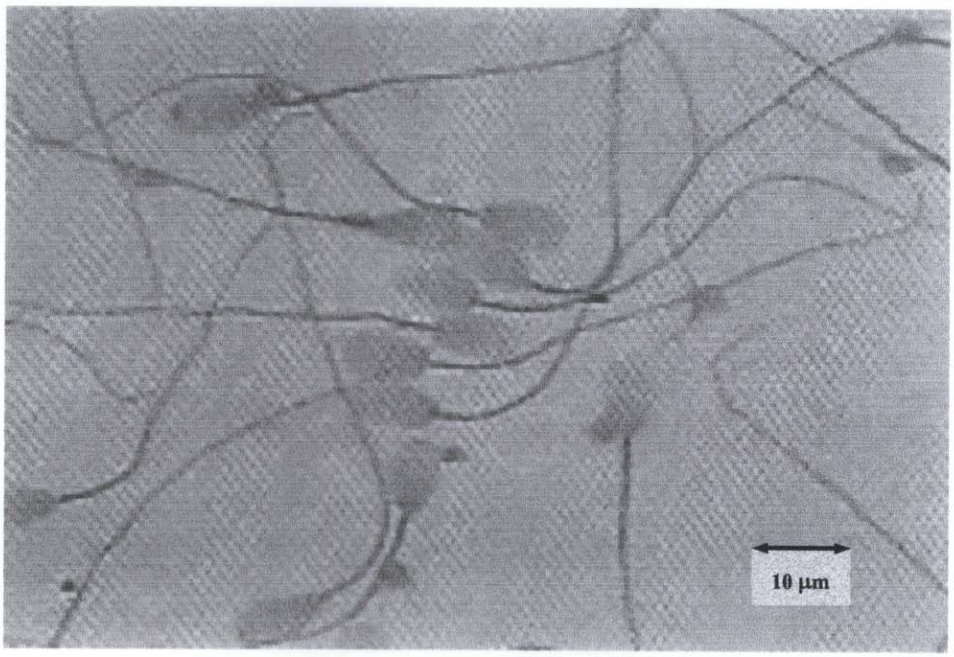
น้ำเชื้อกระบือปลักจะมีความเข้มข้นของตัวอสุจิประมาณ 800 – 1,000 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

- ตัวอสุจิที่มีชีวิต

น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีควรมีตัวอสุจิที่มีชีวิตในการหลั่งแต่ละครั้งอย่างน้อย 70 – 80% ของตัวอสุจิที่มีชีวิต

- รูปร่างตัวอสุจิ

ส่วนหัวของตัวอสุจิของกระบือจะค่อนข้างกว้าง กลม และป่องออก ขนาดตัวอสุจิเฉลี่ยมีความยาว 8 ไมครอน กว้าง 5.3 ไมครอน



ภาพที่ 24 แสดงรูปร่างตัวอสุจิกระบือปลัก (ที่มา : ปาริฉัตร สุขโต, 2544)

ตารางที่ 5 คุณลักษณะของน้ำเชื้อกระบือปลักและกระบือแม่น้ำ

คุณลักษณะ	กระบือปลัก	กระบือแม่น้ำ
อายุเมื่อรีดเก็บน้ำเชื้อครั้งแรก (เดือน)	24 – 72	24 – 72
ปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดได้ (มิลลิลิตร)	2 – 4	3 – 5
การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ (%)	60 – 80	70 – 90
การเคลื่อนไหวตัวอสุจิไปข้างหน้า (%)	60 – 70	65 – 85
ตัวอสุจิที่มีชีวิต (%)	60 – 70	70 – 85
ตัวอสุจิที่อะโครโซมปกติ (%)	80 – 90	80 – 95
ความเข้มข้นของตัวอสุจิ (x 10^9/มล.)	0.3 – 1.5	0.6 – 1.5
ตัวอสุจิที่ผิดปกติ (%)	6 – 15	2 – 14

ที่มา : ปาริฉัตร สุขโต (2544)

2. เกณฑ์การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

2.1 การวัดปริมาตร

ปริมาตรของน้ำเชื้อที่หลั่งออกมาในแต่ละครั้ง มีความผันแปรไปมากน้อยขึ้นอยู่กับความผันแปรของปัจจัยหลายอย่าง เช่น อาหาร อายุ ความถี่ของการรีด เป็นต้น ปริมาตรของน้ำเชื้อประกอบด้วยส่วนของตัวอสุจิและพลาสมาของน้ำอสุจิ วิธีวัดปริมาตรของน้ำเชื้อที่ได้มาโดยการเทลงในกระบอกตวง แล้วอ่านค่าที่ข้างกระบอกตวงออกมาเป็นมิลลิลิตร

2.2 พีเอช

ปกติพีเอชของน้ำเชื้อจะอยู่ระหว่าง 6.8 – 7.8 ความผันแปรนี้ขึ้นอยู่กับการใช้น้ำตาลฟรุกโตสของอสุจิ ซึ่งผลพลอยได้จะเกิดกรดแลกติกทำให้เกิดความเป็นกรด วิธีการวัดโดยใช้กระดาษลิตมัสจุ่มลงไปในน้ำเชื้อ กระดาษจะเกิดการเปลี่ยนสี แล้วนำไปเทียบกับสีข้างกล่องที่ระบุถึงช่วงค่าพีเอชว่าสีที่เปลี่ยนไปใกล้เคียงกับสีใด เป็นวิธีสะดวกและรวดเร็ว

2.3 สีของน้ำเชื้อ

สีของน้ำเชื้อที่รีดมาจะมีสีขาวขุ่นตั้งแต่สีคล้ายน้ำนมจนจางลงเรื่อย ๆ เกือบใส การดูสีของน้ำเชื้อจะทราบถึงความเข้มข้นของตัวอสุจิ น้ำเชื้อที่มีความเข้มข้นของตัวอสุจิมากจะมีสีขุ่น แต่ถ้าสีจางจะมีความเข้มข้นของตัวอสุจิน้อย วิธีการวัดสีของน้ำเชื้ออาจจะแบ่งออกเป็นระดับตามความขุ่นของสีน้ำเชื้อดังนี้

ระดับ 0 หรือเกรดดี สีของน้ำเชื้อจะใสคล้ายน้ำ แสดงว่าไม่มีตัวอสุจิอยู่เลย

ระดับ 1 หรือเกรดซี น้ำเชื้อมีสีขาวข้นขึ้น น้ำเชื้อระดับนี้มีตัวอสุจิอยู่น้อย ความเข้มข้นอยู่ประมาณ 100 – 200 ล้านตัว

ระดับ 2 หรือเกรดบี สีของน้ำเชื้อใกล้กับสีของน้ำนม ความเข้มข้นของตัวอสุจิในน้ำเชื้อจะมีมากประมาณ 300 – 400 ล้านตัว

ระดับ 3 หรือเกรดเอ สีของน้ำเชื้อออกสีขาวขุ่นเหมือนน้ำครีม มีความเหนียวหนืดมาก มีความเข้มข้นของตัวอสุจิมากกว่า 500 ล้านตัว

2.4 การวัดการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ

การวัดการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิที่มีชีวิต แสดงออกมาเป็นร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่หรือมีชีวิต ซึ่งจะบอกถึงความสมบูรณ์ของพ่อพันธุ์ การตรวจสอบการเคลื่อนไหวของอสุจิอาจจะทำได้ 2 แบบ คือ

2.4.1 ตรวจการเคลื่อนที่แบบกลุ่ม ส่วนใหญ่จะใช้สำหรับการตรวจน้ำเชื้อสดที่เพิ่งรีดเก็บใหม่ ๆ วิธีนี้สามารถตรวจการเคลื่อนไหวได้อย่างหยาบ ๆ การประมาณการเคลื่อนที่แบบกลุ่มแบ่งระดับการเคลื่อนไหวออกเป็นค่าคะแนน 0 – 5 ดังนี้

ระดับ 5 คะแนน น้ำเชื้อดีเลิศ น้ำเชื้อมีความเข้มข้นสูง มีการเคลื่อนไหวอย่างเร็วเห็นได้ชัด มองเห็นเป็นคลื่นหมุนวนคล้ายกลุ่มเมฆ ตัวอสุจิมีการเคลื่อนไหวร้อยละ 90

ระดับ 4 คะแนน น้ำเชื้อดีมาก มีการเคลื่อนไหวของอสุจิที่ไม่รุนแรงเหมือนระดับ 5 และมองเห็นอสุจิจับกันเป็นกลุ่ม ระดับนี้อสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 70 – 85

ระดับ 3 คะแนน น้ำเชื้อดี มองเห็นอสุจิเกาะกันเป็นกลุ่มมากขึ้นแต่ยังมีการเคลื่อนไหว ในระดับนี้มีตัวอสุจิเคลื่อนไหวร้อยละ 45 – 65

ระดับ 2 คะแนน น้ำเชื้อพอใช้ ไม่มีการเคลื่อนไหวให้เห็นในระดับนี้ มีตัวอสุจิเคลื่อนไหวร้อยละ 20 – 40

ระดับ 1 คะแนน น้ำเชื้อเลว จะพบตัวอสุจิพลิกตัวกลับไปมากับที่และมีแนวโน้มจะไม่เคลื่อนไหว อัตราการเคลื่อนไหวต่ำร้อยละ 10

ระดับ 0 คะแนน น้ำเชื้อตายหมด ตัวอสุจิทั้งหมดตาย ไม่มีการเคลื่อนไหวเลย

2.4.2 การเคลื่อนไหวรายตัว ใช้ในกรณีของน้ำเชื้อที่ทำการเจือจางแล้วหรือภายหลังการแช่แข็งและทำให้นิ่มตัวลง สามารถจำแนกการเคลื่อนไหวรายตัวออกได้ดังนี้

2.4.2.1 การเคลื่อนไหวแบบพุ่งไปข้างหน้า พบว่าเป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีจะมีการเคลื่อนที่ของอสุจิแบบพุ่งไปข้างหน้าจำนวนมาก

2.4.2.2 การเคลื่อนที่แบบหมุนเป็นวงกลม หรือเคลื่อนไหวกลับหลัง การเคลื่อนไหวแบบนี้เกิดจากความผิดปกติที่บริเวณส่วนหางของอสุจิ

2.4.2.3 การเคลื่อนไหวอยู่กับที่ จะพบตัวอสุจิอยู่กับที่ แต่มีการส่ายของหาง อาจเนื่องจากตัวอสุจิได้รับอุณหภูมิที่เย็นเกินไป

2.4.2.4 อสุจิไม่เคลื่อนไหวเลย อสุจิทุกตัวตายหมด

2.5 ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

ในการตรวจความเข้มข้นของอสุจิสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่การใช้ ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) การใช้คัลเลอริมิเตอร์ หรือโฟโตอิเลคตริก คัลเลอริมิเตอร์ และการใช้อิเลคโทรนิคพาติเคิล เคาร์เตอร์ แต่ในการทดลองครั้งนี้ใช้การตรวจความเข้มข้นแบบแรก โดยใช้นิวเบเออร์ฮีโมไซโตมิเตอร์ แบบไบรท์ไลน์ ซึ่งนิยมใช้มากในปัจจุบัน ตารางที่อยู่บนแชมเบอร์จะประกอบด้วย สี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่จะแบ่งออกจากกันโดยเส้นเล็ก ๆ สามเส้น สี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ทั้ง 25 ช่อง จะมีพื้นที่เท่ากับ 1 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ จะประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก 16 ช่อง ในแต่ละช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กจะมีพื้นที่เท่ากับ 1/400 ตารางมิลลิเมตร (1/16 x 1/25) เมื่อปิดแผ่นกระจกบาง ๆ จะทำให้ความสูงของบริเวณช่องที่นับสูง 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรของแต่ละตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก 1 ช่อง จะมีค่าเท่ากับ 1/400 x 0.1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1/4000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

การเจือจางน้ำเชื้อเพื่อหาความเข้มข้นของตัวอสุจิโดยใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อจำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดแอปเพนดอร์ฟ จากนั้นดูดน้ำยาเจือจาง จำนวน 1000 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดแอปเพนดอร์ฟที่มีน้ำเชื้ออยู่แล้วซึ่งจะได้การเจือจาง 1:200 ทำการปิดฝาหลอดแอปเพนดอร์ฟแล้วเขย่าให้น้ำเชื้อและน้ำยาเจือจางผสมเข้ากัน นำส่วนผสมไปหยดลงในตารางสำหรับตรวจนับตัวอสุจิต่อไป

การเตรียมน้ำเชื้อที่จะนับจำนวนอสุจิ ทำโดยวางเคาร์ติงแชมเบอร์ที่ทำความสะอาดแล้วไว้บนโต๊ะ วางแผ่นกระจกบาง ๆ ปิดทับตารางบริเวณที่จะนับ ดูดส่วนผสมของน้ำเชื้อและน้ำยาเจือจางในหลอดแอปเพนดอร์ฟโดยใช้ไมโครปิเปตแล้วนำไปหยดลงบนตาราง เสร็จแล้วทิ้งไว้ 1 นาที จึงนำไปตรวจนับ หลังจากนับครั้งแรกเสร็จ ควรทำความสะอาดตารางที่นับด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง ก่อนเริ่มนับครั้งต่อไป ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยาย 40X ทำการสุ่ม

นับช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสหมายเลขใดก็ได้จำนวน 5 ช่อง เพื่อความถูกต้องในการนับ ควรนับจำนวน 4 ครั้ง โดยจะนับจำนวน 2 ครั้งด้านหนึ่งก่อนแล้วย้ายกลับมานับอีกด้านอีกจำนวน 2 ครั้งเช่นกัน เช่น ด้านแรกนับช่องใหญ่ หมายเลข 1, 6, 11, 16 และ 21 ครั้งที่สองนับช่องหมายเลข 3, 9, 15, 19 และ 24 หรืออาจเป็นหมายเลขอื่นก็ได้ อีกด้านหนึ่งก็นับเช่นเดียวกัน สมมติด้านแรกนับได้ 27 และ 29 ตัว (ไม่ควรมีค่าความแตกต่างกันเกิน 10) และอีกด้านนับได้ 28 และ 30 นำตัวเลขที่ได้มารวมกันแล้วหาร 4 ออกมาเป็นค่าเฉลี่ย การนับอสุจิเมื่อปรับโฟกัสให้เห็นภาพที่ชัดที่สุดแล้ว โดยสังเกตเส้นแบ่งช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่สามเส้น ปรับให้ชัดที่สุด นับอสุจิที่อยู่ด้านบนและด้านขวามือจะนับรวม เข้าช่องที่นับอยู่ ตัวอสุจิที่ทับอยู่ด้านบนเส้นแบ่งช่องจะยึดส่วนหัวของตัวอสุจิเป็นหลักจะนับรวมเข้าอยู่ในตารางนั้นและถ้าหัวอสุจิทับอยู่เส้นแบ่งช่องสี่เหลี่ยมซึ่งจะมีเส้นเล็กสามเส้นจะใช้หัวอสุจิที่ทับอยู่เส้นกลางเป็นหลักว่านับเข้า

วิธีการคำนวณ

ช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง มีพื้นที่ทั้งหมดเท่ากับ 1 ตารางมิลลิเมตร ใน 1 ช่องใหญ่จะมี 16 ช่องเล็ก ช่องใหญ่ 25 ช่องจึงมีช่องเล็กทั้งหมด 400 ช่อง สี่เหลี่ยมเล็กมีพื้นที่เท่ากับ 1/400 ตารางมิลลิเมตร แต่ที่นับมี 5 ช่องใหญ่ หรือ 80 ช่องเล็ก ดังนั้นมีพื้นที่ 80 x 1/400 ตารางมิลลิเมตร เมื่อปิดกระจกบางทำให้มีความสูงขึ้น 0.1 มิลลิเมตร

ดังนั้นในสี่เหลี่ยมที่นับทั้งหมดมีปริมาตร 80 x 1/400 x 0.1 = 1/50 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

สมมติว่า 1/50 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีตัวอสุจิที่นับได้ = N ตัว

ใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จะมีตัวอสุจิที่นับได้ = 50 x N

ในการนับมีการเจือจางน้ำเชื้อ 1: 200

ดังนั้น จำนวนอสุจิ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรจะมี = N x 50 x 200 ตัว

ทำให้เป็นลูกบาศก์มิลลิเมตร = N x 50 x 200 x 1,000

= 10,000,000 x N ตัว

ถ้าให้ C = จำนวนของตัวอสุจิใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

N = จำนวนอสุจิที่นับได้

เพราะฉะนั้นจึงได้สมการ $C = N \times 10^7$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

1. การล้างทำความสะอาดน้ำเชื้อกระบือปลัก

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4, ปริมาตรรวม (total volume, TV) 1 Liter

NaCl	8	g
$Na_2HPO_4.7H_2O$	2.16	g
KCl	0.2	g
KH_2PO_4	0.2	g
TV dH_2O	1	Liter

นำสารที่ชั่งทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 700 ml จากนั้นปรับพีเอชให้ได้ 7.4 แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 Liter จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ

2. การเตรียมส่วนผสมสำหรับการย่อยพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักด้วย *N*-glycanase

นำพลาสมาของน้ำอสุจิจำนวน 40 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยการเติม

- 0.55 M Na_2HPO_4 pH 8.6 จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เป็น 0.2 M Na_2HPO_4 pH 8.6 (v/v) คือ เติม 0.55 M Na_2HPO_4 pH 8.6 ลงไปจำนวน 14.55 ไมโครลิตร
- 1.25% Nonidet P-40 คือ เติม Nonidet P-40 จำนวน 0.5 ไมโครลิตร
- 0.5% (w/v) Sodium dodecyl sulphate (SDS) คือ เติม SDS 0.2 มิลลิกรัม
- 2.5% β-mercaptoethanol คือ เติม β-mercaptoethanol จำนวน 1 ไมโครลิตร
- จากนั้นเติม *N*-glycanase ลงไป 10 ยูนิต/มิลลิลิตร คือ เติม *N*-glycanase จำนวน 0.4 ยูนิต

หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง

3. การเตรียมส่วนผสมสำหรับการย่อยพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักด้วยนิวรามินิเดส

การเตรียม Citrate buffer pH 5.1, TV 200 ml

ทำการชั่ง Citric acid 3.84 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร

4. สารละลายสำหรับการทำ Dialysis จากโปรตีนที่สกัดแล้ว

2% $NaHCO_3$, TV 100 ml

$NaHCO_3$	2	g
dH_2O	100	ml

1 mM EDTA, TV 500 ml

EDTA	0.184	g
dH_2O	500	ml

10 mM Na_2HPO_4 pH 5.5, TV 500 ml

Na_2HPO_4	0.7098	g
dH_2O	500	ml

0.02% (w/v) NaN_3

Solution 100 ml มี NaN_3 อยู่ 0.02 g

Solution 500 ml มี NaN_3 อยู่ (0.02 X 500)/100 = 0.1 g

5. การตรวจหาจำนวนไอโซฟอร์มด้วยวิธี Isoelectric focusing (IEF)

5.1 สารละลายสำหรับคอลัมน์ IEF ขนาด 40 มิลลิลิตร

Cathode Solution, TV 20 ml

Ethanolamine	0.3	ml
Sucrose	12	g
TV dH_2O	20	ml

Anode Solution, TV 10 ml

85 % H_3PO_4	236	µl
TV dH_2O	10	ml

Dense Solution, TV 14 ml

Sucrose	7	g
Ampholytes	0.5	ml
TV dH_2O	14	ml

Light Solution, TV 14 ml

Sucrose	0.7	g

Ampholytes	0.2	ml
TV dH_2O	14	ml

5.2 การตรวจหากิจกรรมของ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (Enzyme activity)

0.1 M Phosphate Buffer (PB) pH 7.0, TV 200 ml

$Na_2HPO_4.12H_2O$	4.369	g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	1.398	g
TV dH_2O	200	ml

1 mM 4 Mu-Fuc

4 Mu-Fuc	2.025	g
Phosphate buffer	6.25	ml

เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Glycine Buffer pH 9.75, Stock 500 ml

Glycine	9.4	g
Na_2CO_3	13.25	g
TV dH_2O	500	ml

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Glycine Buffer pH 9.75 (dilution for stop reaction), TV 500 ml สำหรับใช้หยุดปฏิกิริยา

Stock glycine buffer	170 ml
TV dH_2O	500 ml

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีดำเนินการ

- เตรียมส่วนผสมสำหรับการวัดกิจกรรมของ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ดังนี้

Sample	25	µl
Phosphate buffer	25	µl
4 Mu-Fuc	50	µl

- นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน Water bath เป็นเวลา 10 – 30 นาที (เขย่าตลอดเวลา)
- หยด glycine buffer pH 9.75 (dilution for stop reaction) ลงไป 1 ml
- นำส่วนผสมทั้งหมดมาทำการตรวจวัดค่าที่ excitation 360 nm และ emission 430 nm โดยใช้เครื่อง Fluorometer

6. การศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western analysis

10% Sodium dodecyl sulphate (SDS) stock, TV 100 ml

Sodium dodecyl suphate	10	g
TV dH_2O	100	ml

10% Ammonium persulphate (APS) , TV 100 ml

Ammonium persulphate	10	g
TV dH_2O	100	ml

10X Electrophoresis buffer, TV 100 ml

Glycine	14.40	g
Tris base	3.03	g
TV dH_2O	100	ml

1X Electrophoresis buffer for running gel, TV 500 ml

10X Electrophoresis buffer	50	ml
10% SDS	5	ml
TV dH_2O	500	ml

4X Sample buffer

0.5 M Trid-HCl pH 6.8*	4	ml
Glycerol	3.2	ml
SDS	0.64	g
β-merceptoethanol	1.6	ml
0.4% (w/v) Bromophenol Blue	250	µl

* การเตรียม 0.5 M Trid-HCl pH 6.8 stock 50 ml

ชั่ง Tris base มา 3 g แล้วเติม dH_2O ลงไปประมาณ 40 ml จากนั้นจึงนำไป stirrer ให้ละลายจนหมด ปรับพีเอชด้วย HCl เข้มข้น (12 Normal) จนได้พีเอชตามที่ต้องการแล้วนำไปปรับปริมาตรรวม (TV) ให้ได้ 50 ml ด้วย dH_2O เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10X Separating gel buffer, TV 100 ml

Tris base	45.38	g
12 N HCl	5	ml
TV dH_2O	100	ml

10X Stacking gel buffer, TV 100 ml

Tris base	15.12	g
12 N HCl	10	ml
TV dH_2O	100	ml

10% Separating gel, TV 16.688 ml

30% Acrylamide	5.57	ml
10X separating buffer	1.67	ml
10% SDS	0.167	ml
dH_2O	9.19	ml
TEMED	8.33	µl
10% APS	83.33	µl

4% Stacking gel, TV 3.996 ml

30% Acrylamide	0.54	ml
10X stacking buffer	0.4	ml

10% SDS	40	µl
dH_2O	2.98	ml
TEMED	2	µl
10% APS	34	µl

Standard molecular weight marker (Amersham)

- 1 ขวด Low molecular weight calibration kit for SDS (Amersham) นำไปเติมด้วย 200 µl 1X Sample buffer แล้วผสมให้เข้ากัน

*หมายเหตุ

1. ถ้าย้อมด้วย coomassie blue ให้ load ประมาณ 3 µl
2. ถ้าย้อมด้วย Silver staining ให้นำ Stock ให้เจือจาง 50 เท่า ด้วย 1X sample buffer แล้วนำไป load ประมาณ 5 µl

Protein marker ประกอบด้วย

Phosphorylase b	97,000 Da
Albumin	66,000 Da
Ovalbumin	45,000 Da
Carbonic anhydase	30,000 Da
Trypsin inhbitor	20,100 Da
α Lactalbumin	14,400 Da

10X Transfer buffer, TV 250 ml

Tris base	7.5	g
Glycine	36	g
TV dH_2O	250	ml

1X Transfer buffer, TV 200 ml

10X Transfer buffer	20	ml
100% Methanol	40	ml
TV dH_2O	200	ml

Marker stain, TV 100 ml

0.1% coomassie brilliant blue R-250		
100% Methanol	50	ml
Glacial acetic acid	10	ml
dH_2O	40	ml

Marker destain, TV 100 ml

100% Methanol	50	ml
Glacial acetic acid	10	ml
dH_2O	40	ml

Super Tris-buffered saline (STBST) pH 7.4 (ที่มี 0.1% Tween 20)

NaCl	9	g
Tris base	2.42	g
Tween 20	1	ml
TV dH_2O,	1	Liter
pH 7.4		

2% advance ECL blocking agent

- เขย่าผง advance ECL blocking agent ในภาชนะให้เข้ากัน
- ชั่งผง advance ECL blocking agent 2 g (2% w/v) ละลายใน 100 ml STBST (0.1%Tween 20)
- เขย่าแรง ๆ (ปิดภาชนะด้วย parafilm)
- นำไป stirrer ประมาณ 15 นาที จนกระทั่งผงสารละลายหมด
- เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 24 ชั่วโมง

Developer, TV 500 ml

GBX Developer	100	ml
dH_2O	400	ml

Fixer, TV 500 ml

GBX Fixer	100	ml
dH_2O	400	ml

การเจือจาง Antibody

Primary antibody (Goat anti human liver α-L-Fucosidase antibody)

เตรียม Stock 1 : 100 (ใน STBST, 0.1% Tween 20) นำมาใช้

1 : 10,000 ใช้ 1 : 100 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

1 : 25,000 ใช้ 1 : 250 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

1 : 50,000 ใช้ 1 : 500 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

1 : 75,000 ใช้ 1 : 750 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

1: 100,000 ใช้ 1 : 1000 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

Secondary antibody (Rabbit anti goat horseradish peroxidase conjugated (HRP))

เตรียม Stock 1 : 1,000 (ใน STBST, 0.1% Tween 20) นำมาใช้

1 : 50,000 ใช้ 1 : 50 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

1 : 100,000 ใช้ 1 : 100 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

1 : 250,000 ใช้ 1 : 250 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

1 : 500,000 ใช้ 1 : 500 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

ตัวอย่าง

ต้องการเตรียม Primary antibody 1 : 50,000 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL ปริมาตร 15 ml

วิธีการ จากสัดส่วน Primary antibody 1 : 50,000 ใช้ 1 : 500 ใน STBST 2% Blocking agent advance ECL

นั่นคือ ถ้าเตรียม STBST 2% Blocking agent advance ECL ปริมาตร 500 µl ต้องดูด Primary antibody stock 1 : 100 มา 1 µl

ถ้าเตรียม STBST 2% Blocking agent advance ECL ปริมาตร 15,000 µl (15ml) ต้องดูด Primary antibody stock 1 : 100 มา (15,000 x 1) / 500 = 30 µl

วิธีดำเนินการ

การเตรียม gel cassette sandwich

- ทำความสะอาดแผ่นกระจกและอุปกรณ์ต่างๆ โดยใช้น้ำกลั่น และเช็ดให้แห้งด้วยกระดาษ
- วางกระจกแผ่นสั้นลงบนกระจกแผ่นยาว โดยหันด้านที่มี spacers เข้าหากระจกแผ่นสั้น
- เลื่อนชุดกระจกใส่ใน กรอบพลาสติก (casting frame) โดยให้กระจกแผ่นสั้นอยู่ด้านหน้า
- ให้ขอบกระจกด้านล่างของทั้งสองแผ่นเสมอกัน แล้วกดตัวล็อคกระจกทั้งสองด้าน
- นำชุดกระจกไปวางบนตัวยึด (casting stand) โดยด้านล่างจะมีแผ่นคล้ายฟองน้ำเพื่อกันไม่ให้เจลรั่ว แล้วใช้สปริงกดด้านบน

การเทเจล ลงในกระจก (การทดลองนี้ใช้แบบ discontinuous polyacrylamide gels)

- ใส่หวี (comb) ในชุดเจลแล้วทำเครื่องหมายที่กระจกห่างจากปลายหวี 1 เซนติเมตร ตำแหน่งนี้เป็น ระดับที่จะใส่ separating gel แล้วดึงหวีออก
- เตรียม 10% separating gel (ใส่ APS และ TEMED หลังสุด)
- ใส่สารละลายเจลเบา ๆ ลงในชุดกระจกให้ถึงระดับที่ขีดไว้ เติมน้ำกลั่นลงบนเจลเบา ๆ ระวังอย่าให้ผสมกับสารละลายเจล (ห้ามใช้ butanol เพราะจะทำให้ชุดกระจกเสียหาย)
- ทิ้งให้เจลแข็งตัว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาทีถึง 1 ชั่วโมง ล้างผิวเจลด้านบนด้วยน้ำกลั่น
- เตรียมสารละลาย 4% stacking gel โดยใส่ APS และ TEMED หลังสุด ใช้กระดาษกรองซับน้ำ บริเวณกระจกด้านในออกให้หมดระวังอย่าให้ถูกผิวเจลใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจลใส่ในกระจกจนเกือบเต็ม
- ใส่หวีระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศโดยเริ่มตั้งแต่ช่องใส่ตัวอย่าง ที่ 1, 2, และ 3 ตามลำดับ จัดตำแหน่งให้หวีอยู่กึ่งกลาง
- ทิ้งให้เจลแข็งตัวซึ่งใช้เวลา 30-45 นาที (ในขั้นตอนนี้สามารถเก็บเจลไว้ได้ ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้กระดาษชุบน้ำหมาด ๆ ห่อหุ้มชุดเจล แล้วหุ้มด้วยพลาสติก)
- ค่อย ๆ ดึงหวีออกและล้างช่องใส่ตัวอย่าง ด้วยน้ำกลั่นหรือ running buffer

การประกอบชุด run gel

- นำเอาชุดกระจกออกจากตัวยึด ปลดตัวยึดกระจกโดยการดึงเข้าด้านใน
- ใส่ชุดกระจกที่มีเจล (2 ชุด) ในแต่ละด้านของ electrode assembly โดยให้กระจกแผ่นสั้นหันหน้าเข้าด้านในติดกับ U-shape gaskets
- ยกชุดเจลใส่ในกรอบ (clamping frame)
- ใช้มือกด electrode assembly เบา ๆ พร้อม ๆ กับล็อคชุดกระจก โดยดูให้แน่ใจว่ากระจกแผ่นสั้น สัมผัสกับ gasket เพื่อป้องกันการรั่ว

- ใส่อุปกรณ์ทั้งหมดลงใน mini tank ใส่ 1X Electrophoresis buffer ประมาณ 125 มิลลิลิตร ลงใน inner chamber จนกระทั่งถึงกึ่งกลางระหว่างด้านบนของกระจกแผ่นสูงและแผ่นต่ำ

หมายเหตุ ห้ามใส่ 1X Electrophoresis buffer สูงกว่าระดับนี้ เพราะอาจทำให้เกิดการลักน้ำ เป็นผลทำให้สูญเสียบัฟเฟอร์

- เติม 1X Electrophoresis buffer ประมาณ 200 มิลลิลิตร ลงใน mini tank (lower buffer chamber)

การใส่ตัวอย่างลงในช่องใส่ตัวอย่าง (sample loading)

- ใส่ตัวอย่างในช่องใส่ตัวอย่าง โดยใช้ gel loading tips
- สามารถใช้ Bio-rad sample loading guide วางระหว่างชุดกระจกทั้ง 2
- ใส่ sample ช้า ๆ เพื่อให้ sample อยู่ที่ก้นช่องใส่ตัวอย่าง ระวังอย่าให้ปลายเข็มหรือ pipette tip ทิ่มที่ก้น

การประกอบชุด mini tank

- ปิดฝาครอบ mini tank โดยให้สีของขั้ว electrode กับสายไฟตรงกัน โดยสีแดงจะเป็นขั้วบวก (anode) และสีดำเป็นขั้วลบ (cathode)
- ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง power supply ให้ตรงขั้ว ตั้งค่าความต่างศักย์ที่ 80 โวลต์ สำหรับ Stacking gel และ 200 โวลต์ สำหรับ separating gel

การนำแผ่นเจลออกจากชุดกระจก

- เมื่อสิ้นสุดอิเล็กโทรโฟเรซิส ปิดสวิทช์เครื่อง power supply และ ดึงสายไฟฟ้าออก
- ดึงฝาครอบออกจาก inner chamber อย่างระมัดระวัง และเท 1X Electrophoresis buffer ทิ้ง

หมายเหตุ ควรเท Buffer ออกก่อนที่จะปลดตัวล็อคกระจกเพื่อป้องกันบัฟเฟอร์หก

- ปลดตัวล็อคกระจกแล้วดึงเอา electrode assembly ออกจาก clamping frame จากนั้นจึงสามารถนำกระจกออกได้
- เอาเจลออกจากกระจกโดยใช้แผ่นพลาสติกงัดระหว่างกระจกสองแผ่นอย่างระมัดระวัง
- นำเจลออกจากแผ่นกระจก และนำไปใส่ในภาชนะที่เตรียมไว้

การกระตุ้น (activate) แผ่น PVDF membrane ก่อนการย้ายโปรตีน (transfer protein)

- ให้นำแผ่น PVDF membrane มากระตุ้นด้วย 100% methanol ประมาณ 10 วินาที
- จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่น นาน 10 นาที
- แช่ต่อใน 1X Transfer buffer เพื่อป้องกันไม่ให้แผ่นเมมเบรนแห้ง

การย้ายโปรตีน

- แช่กระดาษกรอง และแผ่น PVDF membrane ที่กระตุ้นแล้ว ใน 1X Transfer buffer

- ใช้ 1X Transfer buffer ที่แช่เย็นไว้ นำไปพรมเครื่อง transfer ให้ชุ่มเล็กน้อย

- จากนั้นจึงวางกระดาษกรองแผ่นแรกไว้ที่ชั้นล่างสุดของเครื่อง transfer ตามด้วยแผ่น PVDF membrane จากนั้นเป็นแผ่นเจล และต่อมาจึงเป็นกระดาษกรองอีกแผ่นวางทับเป็นชั้นสุดท้าย

- วางฝาครอบเครื่อง transfer ปิดทับลงไป

- ต่อเครื่อง Transfer เข้ากับเครื่อง power supply แล้วทำการย้ายโปรตีน โดยใช้กระแสไฟฟ้า 155 มิลลิแอม ใช้เวลานานประมาณ 1 ชั่วโมง 10 นาที

- ตัดบริเวณแบน (band) ที่เป็นโปรตีนมาตรฐานบนแผ่น PVDF membrane ออก แล้วนำไปย้อมด้วย Marker stain นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วย Marker destain จนเห็นแบนของโปรตีนมาตรฐานชัดเจน

- ให้ล้างแผ่น PVDF membrane ที่เหลือด้วย Super Tris-buffered saline (STBST) พีเอช 7.4 (ที่มี 0.1% Tween 20)

<u>การวิเคราะห์โปรตีนที่สนใจด้วยวิธี Western analysis</u>

- นำแผ่น PVDF membrane ไปบล็อก (block) ปฏิกิริยาด้วย 2% advance ECL blocking (ใน STBST (0.1% Tween 20)) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- นำแผ่น PVDF membrane ที่บล็อกปฏิกิริยาด้วย 2% advance ECL blocking ไปล้างด้วย STBST 4 ครั้ง*

ครั้งที่ 1 ใช้เวลาล้าง 15 นาที

ครั้งที่ 2 – 4 ใช้เวลาล้างครั้งละ 5 นาที

- ใส่แอนติบอดีปฐมภูมิ (Goat anti human liver α-L-fucosidase antibody) ในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 50,000 (ใน STBST (0.1% Tween 20) 2% advance ECL blocking) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- จากนั้นจึงล้างแอนติบอดีปฐมภูมิ ออกด้วย STBST 4 ครั้ง*

- ใส่แอนติบอดีทุติยภูมิ [Rabbit anti goat horseradish peroxidase conjugated (HRP)] ในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 250,000 (ใน STBST (0.1% Tween 20) 2% advance ECL blocking) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- จากนั้นจึงล้างแอนติบอดีทุติยภูมิ ออกด้วย STBST 4 ครั้ง*

- นำแผ่น PVDF membrane ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้วไปตรวจสอบแถบโปรตีน

<u>การตรวจสอบโปรตีนบนแผ่นฟิล์ม x - ray</u>

- เตรียม advance ECL ขวดที่ 1 และ 2 ใส่ไว้ในหลอดที่เตรียมไว้ หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร (ใส่อย่างละหลอด)

- วางแผ่น PVDF membrane ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้วทับบนแผ่นพลาสติกใส จากนั้นผสม advance ECL ในหลอดที่ 1 และ 2 เข้าด้วยกัน แล้วใช้ไมโครปิเปตราดให้ทั่วแผ่น PVDF membrane ใช้เวลาประมาณ 1 นาที
- เท advance ECL ออกโดยใช้กระดาษทิชชูซับ แล้วปิดทับด้วยแผ่นพลาสติกใสอีกครั้ง
- นำแผ่นฟิล์ม X – ray ทาบลงบนแผ่น PVDF membrane ทันที
- ล้างแผ่นฟิล์ม X – ray ด้วย GBX Developer นานประมาณ 1 นาที แล้วล้างต่อด้วย GBX Fixer อีกประมาณ 2 – 5 นาที
- จากนั้นจึงนำแผ่นฟิล์ม x – ray ไปล้างด้วยน้ำเปล่า
- ตรวจสอบแถบโปรตีนที่สนใจบนแผ่นฟิล์ม x – ray

การย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining (ใช้วิธีของ Rosenberg, 1996)

Gel fixing, TV 100 ml

100% Methanol	50	ml
Glacial acetic acid	12	ml
dH_2O	38	ml

$Na_2S_2O_3.5H_2O$ (0.2 g/L), TV 1 Liter

$Na_2S_2O_3.5H_2O$	0.2	g
TV dH_2O	1	Liter

Silver nitrate solution, TV 1 liter

Ag_2NO_3	2	g
37% Formaldehyde	0.75	ml
TV dH_2O	1	Liter

เก็บในขวดสีชา

Developing solution, TV 1 Liter

Na_2CO_3	60	g
37% Formaldehyde	0.5	ml
$Na_2S_2O_3.5H_2O$	4	mg
TV dH_2O	1	Liter

3% Glycerol, TV 100 ml

Glycerol	3	ml
dH_2O	97	ml

วิธีดำเนินการ

- นำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย Gel fixing เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 50% Ethanol เป็นเวลา 20 นาที และ ตามด้วย 30% Ethanol เป็นเวลา 20 นาที ตามลำดับ
- แช่เจลต่อในสารละลาย $Na_2S_2O_3.H_2O$ เข้มข้น 0.2 g/L เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 20 วินาที เทน้ำทิ้ง
- จากนั้นแช่ต่อในสารละลาย Silver nitrate เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วนน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 20 วินาที เทน้ำทิ้ง
- นำเจลไปแช่ต่อในสารละลาย Developing ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเขย่าไปมาจนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน
- เมื่อเห็นแถบโปรตีนชัดเจนแล้วให้รีบเทสารละลาย Developing ทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที จากนั้นนำไปแช่ต่อในสารละลาย Gel fixing ประมาณ 20 นาที
- นำไปแช่ต่อใน 50% Methanol เป็นเวลา 20 นาที และตามด้วย 30% Methanol เป็นเวลา 20 นาที ตามลำดับ
- แช่เจลต่อใน 3% Glycerol เป็นเวลามากกว่า 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปทำให้แห้งต่อไป

การทำแผ่นเจลให้แห้ง

นำแผ่นเซลโลเฟนมาตัดให้ได้ขนาดแผ่นเจลไปแช่ในน้ำประมาณ 30 นาที แล้ววางบนแผ่นพลาสติกสำหรับตากเจล จากนั้นวางแผ่นเจลบนแผ่นเซลโลเฟน นำแผ่นเซลโลเฟนอีกแผ่นที่แช่ไว้มาวางทับข้างบน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศขึ้น แล้วจึงประกบแผ่นพลาสติกไว้ข้างบนอีกครั้ง ใช้คลิปหนีบแผ่นพลาสติกไว้ด้วยกัน ตากไว้ในที่ร่ม ใช้เวลาประมาณ 3 วันแผ่นเจลจึงแห้งดี

การย้อมแผ่น PVDF membrane ที่มี Marker proteins ด้วยสี coomassie blue

นำแผ่น PVDF membrane ที่มี Marker proteins ที่ผ่านการย้ายโปรตีนแล้ว นำมาย้อมใน Marker stain ที่มี 0.1% coomassie brilliant blue R-250 ประมาณ 5 นาที แล้วจึงล้างสีส่วนเกิดออกด้วย Marker destain จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จากนั้นไปทำให้แห้งต่อไป

การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนที่ได้จากวิธี SDS-PAGE และ Western analysis

- นำค่า Rf ของโปรตีนมาตรฐานในเจลแต่ละแผ่นกับค่า Log ของน้ำหนักโมเลกุลมาสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่า Rf อยู่บนแกน X และค่า Log ของน้ำหนักโมเลกุลอยู่บนแกน Y
- สร้างสมการเส้นตรงของโปรตีนมาตรฐานโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Microsoft Excel)
- วัดค่า Rf ของแถบโปรตีนที่สนใจ (X) มาแทนค่าในสมการเส้นตรงจะได้ค่า Y ออกมา แล้วแก้ anti-log ซึ่งจะได้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนออกมาแล้วหาเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน จากวิธี SDS-PAGE และ Western analysis

Band	MW (Da)	Log MW	a (cm.) เฉลี่ย	b (cm.) เฉลี่ย	Rf (cm.) เฉลี่ย	สมการจากกราฟ	คำนวณ MW (Da)
1	97000	4.987	5.28	55	0.096	4.9304	85199.7656
2	60000	4.820	10.50	55	0.191	4.8379	68841.6705
3	45000	4.653	18.75	55	0.341	4.6917	49165.6064
4	30000	4.477	29.50	55	0.536	4.5016	31740.5465
5	20100	4.303	40.18	55	0.731	3.3116	20491.2004
6	14400	4.158	50.75	55	0.923	4.1244	13318.1591

หมายเหตุ

1 = Phosphorylase b

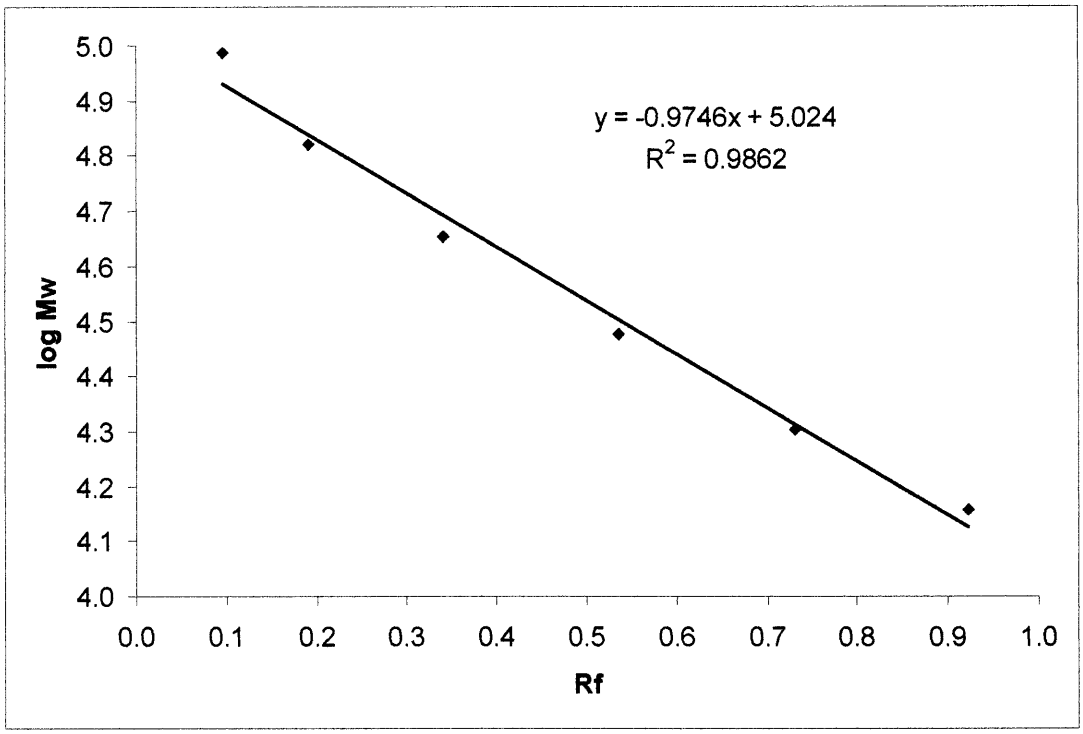
2 = Albumin

3 = Ovalbumin

4 = Carbonic anhydase

5 = Trypsin inhbitor

6 = α Lactalbumin



ภาพที่ 25 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานจากวิธี SDS-PAGE และ Western analysis

7. สารละลายสำหรับการทำ Gel filtration

Start buffer pH 7.2

$Na_2HPO_4.2H_2O$	0.05	M
NaCl	0.15	M

หมายเหตุ ก่อนใช้ต้องกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ใช้สำหรับสอบเทียบคอลัมน์

Elution buffer pH 7.0

$Na_2HPO_4.2H_2O$	0.05	M
NaCl	0.15	M
NaN_3	0.02%	

หมายเหตุ ก่อนใช้ต้องกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน

วิธีดำเนินการ

การสอบเทียบคอลัมน์

สำหรับ Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 ให้ใช้น้ำกลั่นจำนวน 60 มิลลิลิตร ชะผ่านคอลัมน์โดยใช้เครื่องปั๊มสารละลายที่ความเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากนั้นให้เปลี่ยนเป็น Start buffer pH 7.2 จำนวน 240 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที

การสร้าง Standard curve ของโปรตีนมาตรฐาน

ทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานแต่ละตัว ได้แก่ Blue Dextran Thyroglobulin Ferritin Catalase และ Adolase โดยเริ่มทำจาก Blue Dextran ซึ่งแต่ละครั้งต้องกรองโปรตีนมาตรฐานด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนใส่ลงในคอลัมน์ แล้วใช้ Elution buffer pH 7.0 ชะที่ความเร็ว 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ Fraction collector เก็บ fraction มาจำนวน 200 หลอด ๆ ละ 20 หยด (ประมาณ 0.9 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อหา fraction ที่มีโปรตีนสูงสุด จากนั้นวัดปริมาณรวมตั้งแต่ fraction แรกไปจนถึง fraction ที่มีโปรตีนสูงสุดจะได้ค่า elution Volume (V_e) ของโปรตีนนั้น แต่สำหรับ Blue Dextran กำหนดให้เรียกเป็นค่า V_{void} ส่วนโปรตีนมาตรฐานตัวอื่นให้ดำเนินการเช่นเดียวกันจะได้ค่า V_e ของโปรตีนแต่ละตัวออกมา หลังจากนั้นให้สร้าง Standard curve ของโปรตีนมาตรฐาน Thyroglobulin Ferritin Catalase และ Adolase โดยให้แกน x เป็นค่า $V_e - V_{void}$ ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด ส่วนแกน y เป็นค่า Log Molecular weight ของโปรตีนแต่ละตัว

การแยกโปรตีนผ่านคอลัมน์ Gel filtration

นำพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักจำนวน 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการทำ Dialysis มากรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนใส่ลงในคอลัมน์ แล้วใช้ Elution buffer pH 7.0 ชะที่ความเร็ว 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ Fraction collector เก็บ fraction มาจำนวน 200 หลอด ๆ ละ 20 หยด (ประมาณ 0.9 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจสอบกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเพื่อหา fraction ที่มีกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสสูงสุด จากนั้นวัดปริมาณรวมตั้งแต่ fraction แรกไปจนถึง fraction ที่มีกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสสูงสุดจะได้ค่า elution Volume (V_e) ของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส จากนั้นนำไปแทนค่า ค่า X ในสมการเส้นตรงของโปรตีนมาตรฐาน แล้วแก้ anti-log เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส