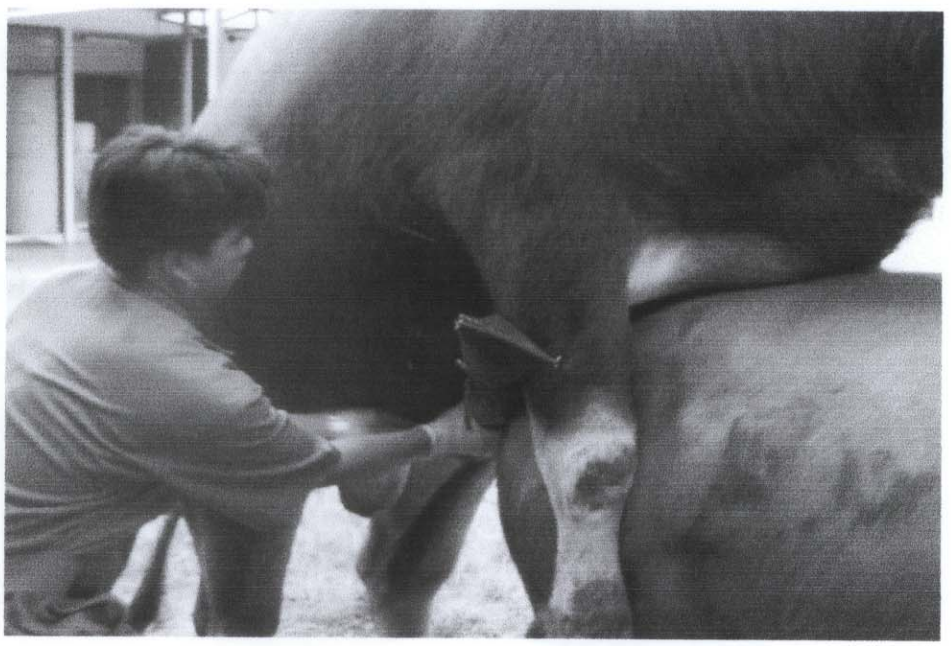
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อสดจากกระบือปลัก

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อสดจากพ่อพันธุ์กระบือปลัก จำนวน 5 ตัว ได้แก่ กระบือปลักหมายเลข SB2/30, SB2/36, SB 5/1, SB 6 และบุญเลิศ โดยใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina, AV) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น



ภาพที่ 7 แสดงการใช้ช่องคลอดเทียมในการรีดเก็บน้ำเชื้อกระบือปลัก

2. การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น

2.1 การวัดปริมาตร โดยการนำน้ำเชื้อสดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีมาตรวัดปริมาตรอ่านค่าออกมาเป็นมิลลิลิตร

2.2 การวัดพีเอช ตรวจวัดพีเอชของน้ำเชื้อโดยใช้กระดาษวัดพีเอช

2.3 การตรวจสอบสีของน้ำเชื้อ โดยการดูสีของน้ำเชื้อด้วยสายตา ตามระดับความขุ่นตั้งแต่สีคล้ายน้ำนมจนจางลงเรื่อย ๆ เกือบใส แล้วให้คะแนนตั้งแต่ระดับ 3 – 0

2.4 การวัดการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิแบบกลุ่ม เป็นการตรวจวัดการเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อสดโดยรวม ซึ่งจะมีลักษณะการเคลื่อนไหวเป็นคลื่นหมุนวนคล้ายกลุ่มเมฆ จนถึงไม่มีการเคลื่อนไหวเลย แล้วให้คะแนนตามระดับ ตั้งแต่ระดับ 5 – 0

2.5 การตรวจนับจำนวนความเข้มข้นของน้ำเชื้อ โดยใช้ นิวเบเออร์ ฮีโมไซโตมิเตอร์

3. การแยกส่วนพลาสมาของน้ำอสุจิออกจากน้ำเชื้อสดกระบือปลัก

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพเบื้องต้นแล้วมาแยกอสุจิออกจากส่วนของพลาสมาของน้ำอสุจิ (seminal plasma) โดยผสมกับ PBS (phosphate buffered saline) พีเอช 7.4 ในอัตราส่วน 1 : 2 แล้วผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที แยกของเหลวที่อยู่ด้านบน (supernatant) ซึ่งเป็นส่วนพลาสมาของน้ำอสุจิ ออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20°C เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

4. การตรวจวัดกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส

ทำการตรวจวัดกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (Enzyme activity) โดยใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์ NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 พีเอช 7.0 เป็นบัฟเฟอร์ จำนวน 25 ไมโครลิตร ตัวอย่างแต่ละโปรตีนจาก fraction จำนวน 25 ไมโครลิตร และใช้ 1 มิลลิโมลาร์ 4-methylumbelliferyl α-L-fucopyranoside (4-MU-Fuc) เป็นซับสเตรท จำนวน 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาทันทีด้วย glycine buffer พีเอช 9.75 โดยหยดลงไป 1 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดมาทำการตรวจวัดค่าที่ excitation 360 nm และ emission 430 nm โดยใช้เครื่อง Fluorometer

5. การทำ Dialysis โปรตีน

ทำการกระตุ้น(activate) ถุง Spectra/Por 2 Regenerated Cellulose (RC) Dialysis membranes ด้วยการตัดถุง Dialysis ให้ได้ความยาวตามต้องการแล้วต้มถุง Dialysis ใน 2% $NaHCO_3$ 1 mM EDTA เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ระวังอย่าให้ถุง Dialysis ลอย โดยให้จมอยู่ตลอดเวลา จากนั้นเก็บถุง Dialysis ที่ต้มแล้วใน 2% $NaHCO_3$ 1 mM EDTA (ที่มี 0.02% (w/v) NaN_3) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการDialysis โปรตีนโดยนำตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทำ Dialysis ใส่ลงในถุง Dialysis ที่ต้มแล้ว จากนั้นผูกบริเวณหัวและท้ายของถุงหรืออาจใช้คลิปผูก นำถุง Dialysis ที่มีตัวอย่างโปรตีนใส่ลงในสารละลาย buffer 10 mM Sodium phosphate pH 5.5 (ที่มี 0.02% (w/v) NaN_3) ที่มีปริมาตร 100 เท่า ของสารละลายโปรตีน ทำการปั่นด้วย stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นให้เปลี่ยน buffer 3 ครั้ง ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เมื่อทำการเปลี่ยน buffer

ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกที่ 10,000 g (~ 12,000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน (supernatant) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

6. การศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก

6.1 การทดสอบด้วยวิธี *N*-glycanase treatment

นำตัวอย่างพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมาเจือจางด้วย 0.55 M Na_2HPO_4 pH 8.6 จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เป็น 0.2 M Na_2HPO_4 pH 8.6 (v/v) ที่มี 1.25% Nonidet P-40 0.5% (w/v) Sodium dodecyl sulphate และ 2.5% β-mercaptoethanol จากนั้นเติม *N*-glycanase จำนวน 10 ยูนิต/มิลลิลิตร หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง

6.2 การทดสอบด้วยวิธี Neuraminidase treatment

นำพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักจำนวน 180 ไมโครลิตร มาผสมกับ 0.1 M Citrate buffer pH 5.1 จำนวน 180 ไมโครลิตร นำไปบ่มร่วมกับ SIGMA N-2133 Neuraminidase 1 ยูนิต (0.006 มิลลิกรัม) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.3 การตรวจสอบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Isoelectric focusing

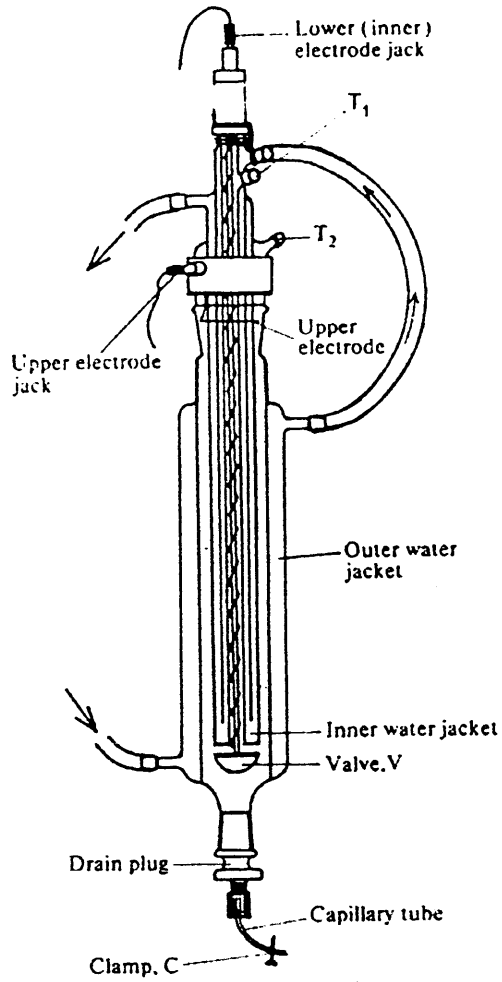
นำพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมาตรวจหาจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส โดยใช้คอลัมน์ Isoelectric focusing ขนาด 40 มิลลิลิตร และ ampholine ampholytes ที่มีช่วงพีเอช 5 – 8 ทำความสะอาดคอลัมน์ อย่างน้อย 2 ครั้ง แล้วเปิด compressor จากเครื่อง Circulator โดยใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้มีน้ำเย็นไหลผ่านคอลัมน์ตลอดเวลา ทำการเตรียมสารละลายสำหรับคอลัมน์ IEF 11 หลอด ๆ ละ 2.5 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 3

จากนั้นให้ปิดช่อง cathode ของคอลัมน์ แล้วล้าง 2 ครั้ง ด้วย cathode solution โดยให้ใช้ประมาณ 3 – 4 มิลลิลิตร แล้วจึงเปิดช่อง cathode ของคอลัมน์ แล้วใส่ cathode solution ปริมาตร 6.25 มิลลิลิตร เข้าไปในช่อง cathode โดยการใช้เครื่องปั๊มสารละลายที่ความเร็ว 0.6 มิลลิลิตร/นาที ค่อย ๆ เติมสารละลายสำหรับคอลัมน์ IEF ทั้ง 11 หลอด เริ่มตั้งแต่หลอดที่ 1 จนถึงหลอดที่ 11 ตามลำดับ ใส่สารละลายเข้าไปในช่องด้านนอกของคอลัมน์ โดยการใช้เครื่องปั๊มสารละลายที่ความเร็ว 0.6 มิลลิลิตร/นาที ตามด้วยการใส่ anode solution เข้าไปช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายท่วมสายลวดของขั้วบวกที่อยู่ด้านใน ต่อสายไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง power supply โดยใช้ความต่างศักย์ 600 V (1.4 – 1.5 mA) เวลาประมาณ 10 – 15 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ตรวจดูกระแสไฟฟ้าจากเครื่อง power supply โดยควรอ่านค่าได้ประมาณ 0.4 mA ทำการปิดเครื่อง power supply และปิดช่อง

cathode จากนั้นให้เก็บ fraction ประมาณ 150 หลอด (ให้ racks แช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลาขณะเก็บ fraction) โดยทำการเก็บ fraction ประมาณ 12 หยด/หลอด ในแถวแรก (ประมาณ 10 หลอด) จากนั้นจึงเก็บ fraction ประมาณ 9 หยด/หลอด ในหลอดต่อไปจนครบ 150 หลอด นำ fraction ที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละหลอด ไปทำการวัดและจดบันทึกค่าพีเอช จากนั้นนำไปตรวจวัดกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (Enzyme activity) แล้วสร้างกราฟเพื่อตรวจสอบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส

ตารางที่ 3 ปริมาตรสารละลายสำหรับคอลัมน์ IEF

หลอด	สารละลาย (มิลลิลิตร)			
	Dense solution	Light solution	Sample	Ampholytes
1	2.50	0.00	-	-
2	2.25	0.25	-	-
3	2.00	0.50	-	-
4	1.75	0.75	-	-
5	1.50	0.77	0.18	0.05
6	1.25	1.02	0.18	0.05
7	1.00	1.50	-	-
8	0.75	1.75	-	-
9	0.50	2.00	-	-
10	0.25	2.25	-	-
11	0.00	2.50	-	-



ภาพที่ 8 คอลัมน์ IEF ขนาด 40 มิลลิลิตร (ที่มา: Andrews, 1986)

6.4 การตรวจสอบเปรียบเทียบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสก่อนและหลังการทดสอบด้วย *N*-glycanase treatment โดยวิธี Isoelectric focusing

นำพลาสมาของน้ำอสุจิที่ผ่านการย่อยด้วย *N*-glycanase ตามวิธี *N*-glycanase treatment มาตรวจสอบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยใช้วิธี Isoelectric focusing เพื่อเปรียบเทียบกับไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนการย่อยด้วย *N*-glycanase

6.5 การตรวจสอบเปรียบเทียบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสก่อนและหลังการทดสอบด้วย Neuraminidase treatment โดยวิธี Isoelectric focusing

นำพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ผ่านการย่อยด้วยนิวรามินิเดสตามวิธี Neuraminidase treatment มาตรวจสอบจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยใช้วิธี Isoelectric focusing เพื่อเปรียบเทียบกับไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักก่อนการย่อยด้วยนิวรามินิเดส

6.6 การศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western analysis

ศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western analysis โดยใช้ชุดเจล mini-protean®3 ซึ่งขนาดของเจลมีความหนา 0.75 มิลลิเมตร และมีช่องใส่ตัวอย่าง (wells) 10 ช่อง ซึ่งแต่ละช่องสามารถใส่ตัวอย่างได้สูงสุด 33 ไมโครลิตร เตรียม polyacrylamide gel โดยใช้ 4% stacking gel และ 10% separating gel ซึ่งมีส่วนประกอบของ 0.1% SDS เตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนพลาสมาของน้ำอสุจิ มาละลายใน sample buffer ประกอบชุดเจล mini-protean®3 แล้วใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐานและตัวอย่างโปรตีน ลงในช่องใส่ตัวอย่าง นำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 V ใน 4% stacking gel เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปลี่ยนความต่างศักย์เป็น 200 V ใน 10% separating gel เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่นเจลชุดหนึ่งไปย้อมด้วย Silver staining ตามวิธีของ Rosenberg (1996) แล้วทำแผ่นเจลให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปศึกษาแบบแผนโปรตีน ส่วนแผ่นเจลอีกชุดหนึ่งนำไปทำ Western analysis โดยย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงในแผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) ด้วยกระแสไฟฟ้า 155 mA เป็นเวลา 1.10 ชั่วโมง ตัดแผ่นเมมเบรนที่เป็นโปรตีนมาตรฐานมาย้อมด้วย coomassie blue จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่เหลือมาบล็อกด้วย 2% advance ECL blocking เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย Super Tris-buffered saline (STBST) ใส่แอนติบอดีปฐมภูมิในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 50,000 (ใน STBST (0.1% Tween 20) 2% advance ECL blocking) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีปฐมภูมิออกด้วย STBST ทำการบ่มต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 250,000 (ใน STBST (0.1% Tween 20) 2% advance ECL blocking) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีทุติยภูมิออกด้วย STBST นำแผ่นเมมเบรนที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้วไปตรวจสอบแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยใช้ advance enhanced chemiluminescence (advance ECL) เป็นเวลา 1 นาที แล้วใช้แผ่นฟิล์มเอกซ์ เรย์ทาบลงบนแผ่นเมมเบรน นำแผ่นฟิล์มไปล้างเพื่อตรวจสอบ

แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสแล้วนำแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ที่มีแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสไปคำนวณหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

6.7 การศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสด้วยวิธี Gel filtration chromatography

นำตัวอย่างพลาสมาของน้ำอสุจิที่ผ่านการทำ Dialysis มาศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสภาพธรรมชาติ (native state) ด้วยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้คอลัมน์ Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 High resolution ซึ่งเป็นการแยกโมเลกุลตามความแตกต่างของขนาดที่ผ่านเนื้อเจลภายในคอลัมน์ โดยใช้เครื่องปั๊มสารละลายที่ความเร็ว 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อช่วยในการดูดสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0.15 M NaCl 0.02% NaN_3 pH 7.0 ให้ทำการชะแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสผ่านคอลัมน์ แล้วทำการเก็บ fraction จำนวน 200 หลอด ๆ ละ 20 หยด (ประมาณ 0.9 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจวัดกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (Enzyme activity) โดยใช้เครื่อง Fluorometer เพื่อหา fraction ที่มีกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส สูงสุด หลังจากนั้นทำการวัดปริมาตรรวมของทุก fraction ตั้งแต่หลอดที่ 1 จนถึงหลอดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดกำหนดให้เป็นค่า elution Volume (Ve) แล้วนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสโดยแทนค่าในสมการเส้นตรงที่สร้างจากน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานซึ่งได้แก่ Blue Dextran (2,000 kDa, Sigma) Thyroglobulin (669 kDa, Sigma) Ferritin (440 kDa, Sigma) Catalase (232 kDa, Sigma) และ Adolase (158 kDa, Sigma) แล้วแก้ anti-iog เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสภาพธรรมชาติ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานจากวิธี Gel fitration chromatography

โปรตีน	V_e (ml)	V_e – Vvoid (ml) (ค่า X)	Log Mw (Da) (ค่าแกน Y)	Mw (Da)
Adolase	69.50	30.88	5.20	158,000
Catalase	56.88	23.93	5.37	232,000
Ferritin	57.29	17.54	5.64	440,000
Thyroglobulin	50.50	12.35	5.83	669,000
Blue Dextran (V_{void})	37.65	0	-	2,000,000

7. การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก

7.1 การทำให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเข้มข้น

นำแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ผ่านการทำ Dialysis และแยกด้วยวิธี Gel filtration chromatography มาทำให้เข้มข้นโดยการบรรจุลงในหลอดขนาดเล็กของ Centrifugal filter devices แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนพลาสมาของน้ำอสุจิที่เหลืออยู่ในหลอดเล็ก (retentate) ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อไป

7.2 การศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธี SDS-PAGE และ Western

นำแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากการทำ Dialysis แยกด้วยวิธี Gel filtration chromatography และทำให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเข้มข้น มาศึกษาแบบแผนโปรตีนและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western analysis โดยใช้ชุดเจล mini-protean®3 ซึ่งขนาดของเจลมีความหนา 0.75 มิลลิเมตร และมีช่องใส่ตัวอย่าง (wells) 10 ช่อง ซึ่งแต่ละช่องสามารถใส่ตัวอย่างได้สูงสุด 33 ไมโครลิตร เตรียม polyacrylamide gel โดยใช้ 4% stacking gel และ 10% separating gel ซึ่งมีส่วนประกอบของ 0.1% SDS เตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนพลาสมาของน้ำอสุจิ มาละลายใน sample buffer ประกอบชุดเจล mini-protean®3 แล้วใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐานและตัวอย่างโปรตีน ลงในช่องใส่ตัวอย่าง นำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 V ใน 4% stacking gel เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปลี่ยนความต่างศักย์เป็น 200 V ใน 10% separating gel เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่นเจลชุดหนึ่งไปย้อมด้วย Silver staining ตามวิธีของ Rosenberg (1996) แล้วทำแผ่นเจลให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปศึกษาแบบแผนโปรตีน ส่วนแผ่นเจลอีกชุดหนึ่งนำไปทำ Western analysis ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงในแผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 155 mA เป็นเวลา 1.10 ชั่วโมง ตัดแผ่นเมมเบรนที่เป็นโปรตีนมาตรฐานมาย้อมด้วย coomassie blue จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่เหลือมาบล็อกด้วย 2% advance EGL blocking เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย Super Tris-buffered saline (STBST) ใส่แอนติบอดีปฐมภูมิในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 50,000 (ใน STBST (0.1% Tween 20) 2% advance ECL blocking) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดี ปฐมภูมิ ออกด้วย STBST บ่มต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิในอัตราส่วนเจือจาง 1 : 250,000 (ใน STBST (0.1% Tween 20) 2% advance ECL

blocking) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีทุติยภูมิออกด้วย STBST นำแผ่นเมมเบรนที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้วไปตรวจสอบแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส โดยใช้ advance enhanced chemiluminescence (advance ECL) เป็นเวลา 1 นาที แล้วใช้แผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ทาบลงบนแผ่นเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นฟิลม์ไปล้างเพื่อตรวจสอบแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส หลังจากนั้นนำแผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์ที่มีแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสไปคำนวณหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน