



กระทรวงศึกษาธิการ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น



บทที่ 8

วิธีการดำเนินการวิจัย

8.1 ตัวทดลองที่ใช้และการแบ่งกลุ่ม

ลูกไก่พันธุ์ไข่ตัวผู้อายุ 1-2 วัน ซื้อจากฟาร์มในจังหวัดขอนแก่น ดังรูปที่ 3.1 นำมาทำการทดลองดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 3.1 ระหว่างการทดลองลูกไก่จะได้ดื่มน้ำและกินอาหารตามต้องการ

ตารางที่ 3.1 แสดงการแบ่งกลุ่มของลูกไก่

กลุ่มที่	การทดลองหรือสารที่ฉีดในลูกตา		ปริมาณของสารที่ฉีด (ไมโครโมล/ตา)
	ตาขวา	ตาซ้าย	
1.	ปิดตา	น้ำกลั่น	-
2.	กรดกลูตามิก	น้ำกลั่น	5
3.	กรดกลูตามิก	น้ำกลั่น	25
4.	กรดกลูตามิก	น้ำกลั่น	50
5.	กรดไคนิก	น้ำกลั่น	0.2
6.	NMDA	น้ำกลั่น	0.4

3.2 การปิดตาเพื่อทำให้เกิดภาวะสายตาสั้น

ไก่ถูกทำให้สลบด้วย diethyl ether แล้วนำมาครอบตาข้างขวาด้วยกรวย ซึ่งทำจากเทปทึบแสง กรวยถูกทำให้ติดโดยใช้กาว (ภาพที่ 3.1) ระหว่างการทดลองจะมีการตรวจสอบการปิดตาเป็นระยะ ๆ โดยการเพิ่มกาวให้ปิดสนิท

3.3 การฉีดสารเคมีเข้าไปในตาไก่

ไก่ถูกทำให้สลบด้วย diethyl ether แล้วนำมาฉีดสารเคมีต่าง ๆ เข้าสู่ลูกตา (intraocular injection) ตามกลุ่มที่แบ่งไว้ในข้อ 3.1 โดยใช้ microsyringe ขนาด 10 ไมโครลิตร (SGE, Australia) แทะทะลุผ่าน sclera ให้ปลายเข็มอยู่ในวุ้นตา (vitreous humour) ดังแสดงในภาพที่ 3.2 หลังจากฉีดสารเข้าไปแล้วจะทิ้งเข็มไว้ประมาณ 15 วินาที จึงดึงเข็มออก ส่วนตาซ้ายของสัตว์ทดลองถูกฉีดด้วยน้ำกลั่น (10 ไมโครลิตร) ด้วยวิธีเดียวกันเพื่อใช้เป็นข้างควบคุม

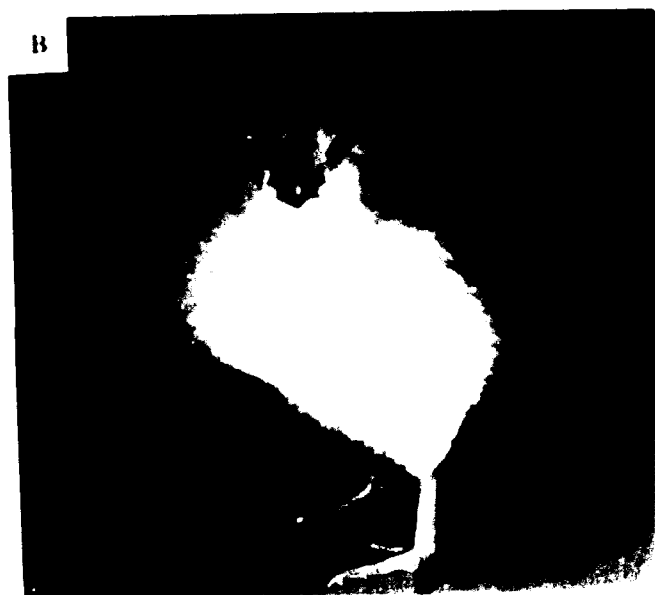
3.4 การหาขนาดของลูกตาไก่และการชั่งน้ำหนักลูกตาไก่

ลูกตาไก่ทุกกลุ่มถูกนำมาฆ่าหลังจากได้รับการฉีดสารเคมีนาน 3 สัปดาห์ โดยใช้ diethyl ether แล้วแยกเอาลูกตาออกมาทั้งข้างซ้ายและขวา จากนั้นนำมากำจัดกล้ามเนื้อภายนอกออกให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ แล้วชั่งน้ำหนักลูกตาโดยใช้เครื่องชั่งไฟฟ้า ซึ่งแสดงทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany) วัดสัดส่วนตามยาวของลูกตาไก่ ดังภาพที่ 3.3 ทั้งในแนวนอน (equatorial) และแนวตั้ง (axial) โดยใช้เวอร์เนียซึ่งอ่านค่าได้ถึง 0.1 มิลลิเมตร ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบภายในสัตว์ทดลองตัวเดียวกัน ซึ่งมีตาข้างซ้ายเป็นข้างควบคุม ผลการทดลองนำเสนอในรูปของเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างโดยให้ข้างควบคุมเป็น 100%

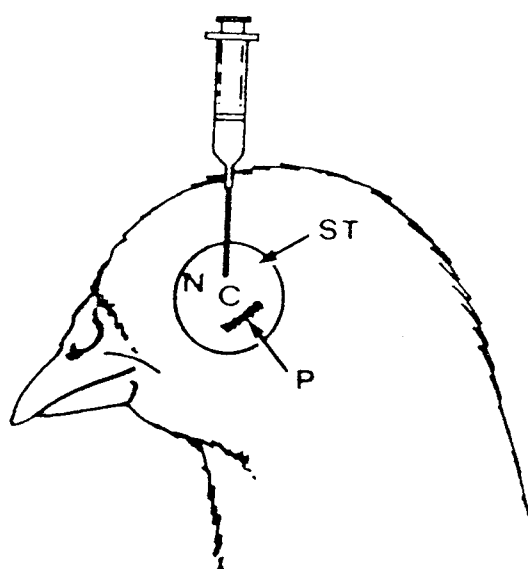
A



B



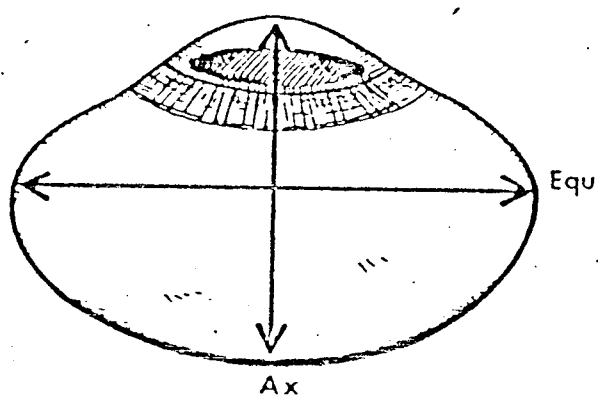
Route of intraocular injection



ภาพที่ 3.2 แสดงวิธีการฉีดเข้าสู่ลูกตา โดยแสดงบริเวณต่าง ๆ ของเรตินา

N = nasal region ; C = central region

ST = superior temporal region ; P = pecten



ภาพที่ 3.3 ไดอะแกรมแสดงการวัดความยาวในแนวนอน (Equ) และความยาวในแนวตั้ง (Ax) ของลูกตาไก่

3.5 การหาปริมาณ total sulfhydryl โดยวิธี spectrophotometry

ใช้วิธีของ Sedlak and Lindsay (1968)

สารเคมี

- (1) Tris-buffer 0.2 โมลาร์ pH 8.6 ซึ่งประกอบด้วย 0.02 โมลาร์ EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)
- (2) สารละลาย 0.01 โมลาร์ 5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid) (DTNB, sigma, U.S.A.)
- (3) Absolute methanol

อุปกรณ์

- (1) Spectrophotometer
- (2) Automatic micropipette ขนาด 200 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร
- (3) Hand Homogenizer
- (4) เครื่องชั่งละเอียดชนิดไฟฟ้า จุดทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- (5) เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ

วิธีการหาปริมาณ total sulfhydryl

- (1) นำเรตินาที่แยกได้จากลูกตาไก่ ใส่ในหลอดทดลองที่มี Tris-buffer 400 ไมโครลิตร ชั่งน้ำหนักเรตินา บันทึกผลการทดลอง จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง
- (2) ทำการ homogenized เรตินาด้วย hand homogenizer ให้ละเอียดแล้วล้างด้วย tris-buffer อีก 800 ไมโครลิตร เทสารละลายลงในหลอดทดลองเดิม
- (3) เติม DTNB 0.01 โมลาร์ จำนวน 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- (4) เติม Absolute methanol 1,600 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

(5) นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะด้วยความเร็วปานกลาง ประมาณ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

(6) นำ supernatant มาวัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร โดยใช้ spectrophotometer หลังจากนั้นนำค่า Absorbance ที่ได้มาคำนวณปริมาณ total sulfhydryl (umole)

$$\text{จากสูตร } \text{umole } (-\text{SH}) = \frac{10^6}{E} \times A \times \text{dilution factor} \times 2.88$$

E x 1000

โดยที่ E คือ ค่าคงที่มีค่าเท่ากับ 13,100

A คือ ค่า Absorbance ที่ 412 นาโนเมตร

2.88 คือ ปริมาตรรวมของสารละลาย (มิลลิลิตร)

3.6 การหาชนิดของโปรตีนในเรตินา และการหาแถบโปรตีนที่มี sulfhydryl group โดย gel electrophoresis

การหาแถบโปรตีนที่มี sulfhydryl group ใช้วิธีติดฉลากด้วย ^{14}C -iodoacetamide (Sattayasai and Panyim, 1982) ส่วนการแยกโปรตีนโดย gel electrophoresis ใช้ discontinuous buffer system.

สารเคมี

- (1) สารละลาย Acrylamide Bis
- (2) สารละลาย Tris-HCl 1.5 โมลาร์, pH 8.8
- (3) สารละลาย Tris-HCl 0.5 โมลาร์, pH 6.8
- (4) สารละลาย 10% sodium dodecyl sulphate (SDS)
- (5) สารละลาย 10% ammonium persulphate
- (6) β -mercaptoethanol
- (7) ^{14}C -iodoacetamide 0.01 โมลาร์
- (8) iodoacetamide 0.05 โมลาร์

- (9) N,N,N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)
- (10) solubilizing solution
- (11) Coomassie blue
- (12) fixative solution
- (13) destaining solution

อุปกรณ์

- (1) Automatic micropipette ขนาด 10, 50 และ 200 ไมโครลิตร
- (2) ชุดเครื่องมือสำหรับ gel electrophoresis

วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทำ gel electrophoresis

- (1) แยกเรตินาจากตาไก่บดจนละเอียดกับสารละลาย Tris-buffer 0.2 โมลาร์ pH 8.6 ซึ่งประกอบด้วย 0.02 โมลาร์ EDTA จากนั้น pipette สารละลายมา 100 ไมโครลิตร
- (2) ทำการปั่นแยกตะกอนและ supernatant ออกจากกัน
- (3) นำ supernatant ที่แยกได้มาเติม 14 C-iodoacetamide 0.01 โมลาร์ จำนวน 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 40 นาที
- (4) เติม cold iodoacetamide 0.05 โมลาร์ ใน supernatant จำนวน 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 40 นาที
- (5) เติม solubilizing solution เข้มข้น 3 เท่าลงใน supernatant จำนวน 1 ใน 3 ของปริมาตรของ supernatant และเติม β -mercaptoethanol 5% ของปริมาตรของสารละลายที่ได้
- (6) นำไปต้มบนน้ำเดือดนานประมาณ 2 นาที แล้วนำ supernatant มาใช้ทำการทดลอง

วิธีการเตรียม gel สำหรับ gel electrophoresis

- (1) เตรียม separating gel 9% จากนั้นตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง
- (2) เตรียม stacking gel 4% โดยเททับลงบน separating gel ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

(3) ทำการ load standard และ sample จากนั้น run gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์เท่ากับ 150 volts

(4) เมื่อแถบสีในสารตัวอย่าง เคลื่อนลงมาเกือบสุดความยาวของ gel เอา gel ออกแล้วใส่ใน fixative solution

(5) ทำการย้อมสีแผ่น gel ด้วย coomassie blue นานประมาณ 30 นาที จากนั้นทำการล้างสี (destain) แผ่น gel นาน 30 นาที ก็จะเห็น band protein บนแผ่น gel นำมาแปลผลการทดลองต่อไป

การหาแถบของโปรตีนที่มี sulfhydryl โดยวิธี autofluorograph

ใช้วิธีของ Chamberlain (1979)

สารเคมี

(1) sodium salicylate 1 โมลาร์

อุปกรณ์

(1) film x-ray

(2) เครื่องมือสำหรับ dry gel

วิธีการทำ autofluorograph

(1) นำแผ่น gel ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis แช่ในน้ำกลั่นนาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย sodium salicylate 1 โมลาร์ นาน 30 นาที แล้วทำการ dry gel ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

(2) นำแผ่น gel ที่ได้หลังจากทำให้แห้งมาทาบลงบนแผ่น film x-ray นาน 1 สัปดาห์

(3) นำ film x-ray ไปล้างก็จะเห็นแถบของโปรตีนที่มี sulfhydryl group ปรากฏอยู่

3.7 การหาไกลโคโปรตีน และ biotin-containing protein โดยวิธี Western-blotting

หลังจากแยกแถบโปรตีนโดยวิธี gel electrophoresis แล้วนำมาทำการเคลื่อนย้ายแถบโปรตีนดังกล่าวลงบนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี Western Transfer (Vaessen *et al.*, 1981) จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาไกลโคโปรตีน โดย concanavalin A (Furlan *et al.*, 1979)

สารเคมี

- (1) Concanavalin A-Biotin
- (2) Avidin-Alkaline phosphatase
- (3) Skim-milk
- (4) Tris-HCl 2 โมลาร์, pH 8.0
- (5) Sodium chloride
- (6) Tween 20
- (7) Nitro blue tetrazolium (NBT)
- (8) 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)
- (9) Towbin buffer (ดูรายละเอียดภาคผนวก หน้า 73)

อุปกรณ์

- (1) Nitrocellulose
- (2) ชุดเครื่องมือสำหรับย้ายแถบโปรตีน
- (3) Automatic micropipette ขนาด 200 และ 100 ไมโครลิตร

วิธีการเคลื่อนย้ายแถบโปรตีนลงบน nitrocellulose

1. ตัดกระดาษกรองและแผ่น nitrocellulose ให้มีความกว้าง-ยาว เท่ากับแผ่นเจล
2. นำกระดาษกรองจำนวน 4 แผ่นจุ่มลงใน Towbin buffer ให้ชุ่มนำไปวางบนแผ่นคาร์บอนของเครื่องสำหรับเคลื่อนย้ายแถบโปรตีน จากนั้นไล่ฟองอากาศออกให้หมด

3. วางแผ่นเจลที่แยกหาชนิดของโปรตีนเรียบร้อยแล้ว ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นวางแผ่น nitrocellulose ทับบนเจลอีกที แล้วไล่ฟองอากาศออกให้หมด

4. วางกระดาษกรองที่จุ่มใน Towbin buffer จนชุ่ม จำนวน 6 แผ่น บนแผ่น nitrocellulose จากนั้นไล่ฟองอากาศออกให้หมด ทำการเคลื่อนย้ายแถบโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า 160 mA และเวลานาน 1 ชั่วโมง 20 นาที

5. แผ่น nitrocellulose หลังจากการเคลื่อนย้ายแถบโปรตีนนำมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติต่าง ๆ ของโปรตีนต่อไป

วิธีการหาไกลโคโปรตีน

(1) นำกระดาษ nitrocellulose ที่ได้จากการย้ายแถบโปรตีนแล้วแช่ในสารละลาย 5% skim-milk in Tris-buffer saline ที่ใส่ไว้ข้างคั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(2) แช่กระดาษ nitrocellulose ใน concanavalin A-biotin เข้มข้น 100 ไมโครกรัม ใน 5% skim-milk นาน 2 ชั่วโมง

(3) เขย่ากับ Tris-buffer saline 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

(4) จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose มาแช่ใน avidin-alkaline phosphatase ใน 5% skim-milk ในอัตราส่วน 1:500 นาน 1 ชั่วโมง

(5) เขย่ากับ Tris-buffer saline 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

(6) ใส่ substrate buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 30 วินาที

(7) ใส่ NBT และ BCIP เขย่าโดยพยายามไม่ให้โดนแสงจัด จนกระทั่งเห็นแถบสีเกิดขึ้น

การหา biotin-containing protein

1. แผ่น nitrocellulose ที่ได้จากการเคลื่อนย้ายโปรตีนเรียบร้อยแล้ว นำมาแช่ ในสารละลาย 5% skim-milk in Tris-buffer saline ที่ใส่ไว้ข้างคั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose มาแช่ใน avidin-alkaline phosphatase ใน 5% skim-milk ในอัตราส่วน 1:500 นาน 1 ชั่วโมง

3. เขย่ากับ Tris-buffer saline 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

4. เขย่ากับ substrate buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 30 วินาที

5. ใส่ NBT และ BCIP เขย่าโดยพยายามไม่ให้โดยแสงจัดจนกระทั่งเห็นแถบสีเกิดขึ้น

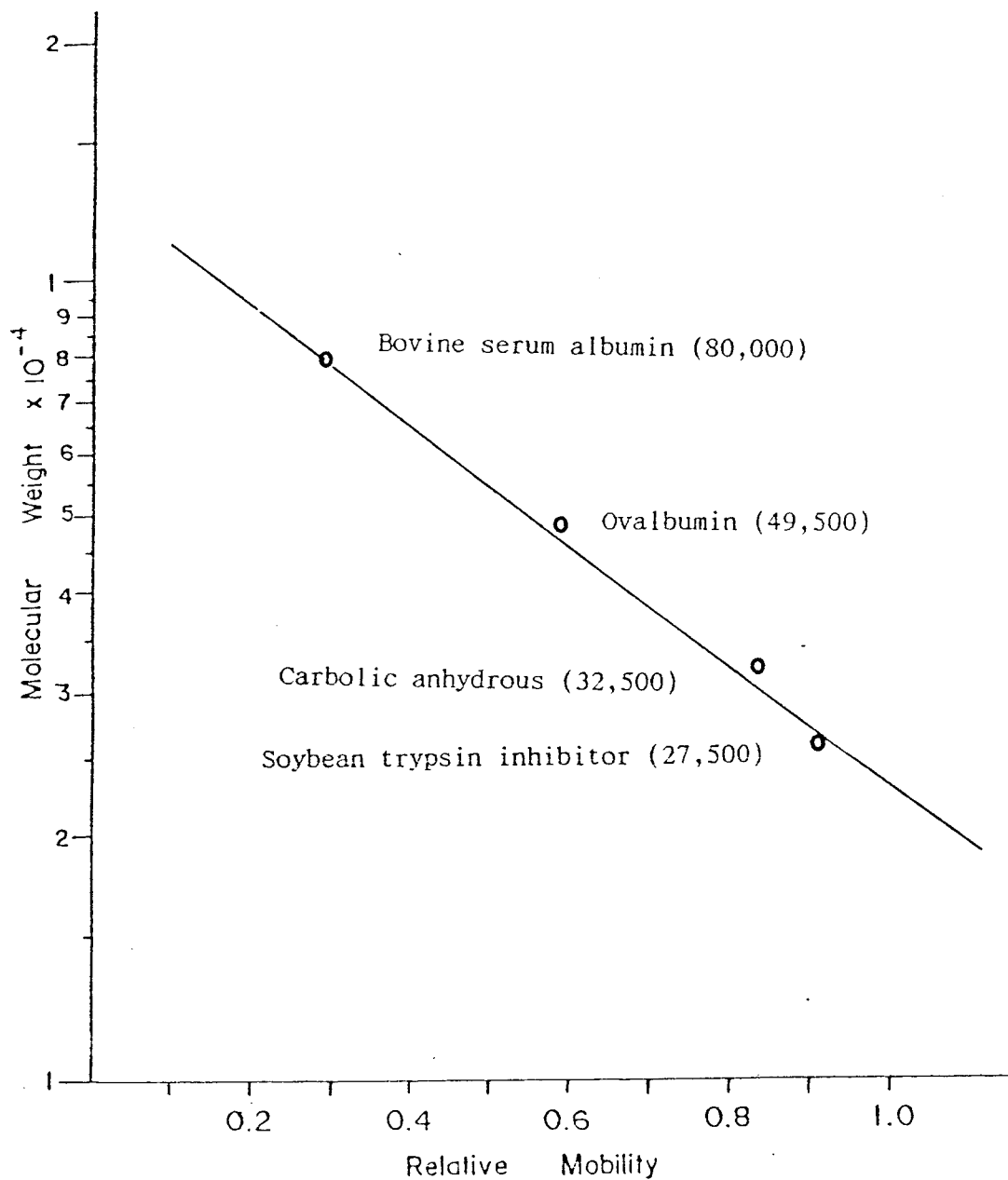
การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเป็นการเปรียบเทียบระหว่าง relative mobility ของสารประกอบต่าง ๆ ที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว (Weber and Osborn, 1969; Davies and Stark, 1978) โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility ของโปรตีนมาตรฐาน และ $\log_{10}$ ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในกราฟ semi-logarithmic ดังแสดงในภาพที่ 3.4 สำหรับค่า relative mobility ของสารประกอบที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Relative mobility} = \frac{\text{Distance of protein migration}}{\text{Distance of dye migration}}$$

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้สถิติ analysis of variance ในการเปรียบเทียบผลของกรดกลูตามิก และอนุพันธ์ของกรดกลูตามิกที่ฉีดเข้าสู่ลูกตาไก่ ที่มีต่อน้ำหนักตา, ความยาวในแนวตั้ง, ความยาวในแนวนอน และปริมาณ total sulfhydryl กับตาข้างควบคุม และจากนั้น ทำการทดสอบสถิติ โดยใช้ Student's t test โดยมีระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ นอกจากนี้ยังแสดงผลการทดลองในรูปแบบกราฟโดยใช้โปรแกรม Sigma Plot



ภาพที่ 3.4 แสดงกราฟของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน
ในสารตัวอย่างโดยโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็น prestained protein ของ
บริษัท BIO- RAD น้ำหนักโมเลกุลที่ใช้ในการเขียนกราฟจึงมากกว่า
น้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง