

ภาคผนวก

## วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

### 1. สารเคมีที่ใช้ฉีดเข้าสู่ลูกตาไก่

1.1 สารละลาย กรดกลูตามิก 5 ไมโครโมล/ตา (ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร)

L-Glutamic acid (Sigma, U.S.A.) 0.4677 กรัม ทำให้เป็นสารละลาย 3 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร

1.2 สารละลาย กรดกลูตามิก 25 ไมโครโมล/ตา (ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร)

L-Glutamic acid (Sigma, U.S.A.) 7.0162 กรัม ทำเป็นสารละลาย 12 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย กรดกลูตามิก 50 ไมโครโมล/ตา (ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร)

L-Glutamic acid (Sigma, U.S.A.) 14.0324 กรัม ทำเป็นสารละลาย 12 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 มิลลิลิตร

1.4 สารละลาย กรดไคนิก 200 นาโนโมล/ตา (ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร)

Kainic acid (Sigma, U.S.A.) 0.0213 กรัม ทำให้เป็นสารละลาย 3 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร

1.5 สารละลาย NMDA 400 นาโนโมล/ตา (ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร)

NMDA (Sigma, U.S.A.) 0.0294 กรัม ทำเป็นสารละลาย 3 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร

### 2. สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณ total sulfhydryl โดยวิธี spectrophotometry

2.1 สารละลาย 0.01 โมลาร์ 5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid)

5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid) 0.0792 กรัม ทำเป็นสารละลาย 20 มิลลิลิตร ใน absolute methanol

2.2 สารละลาย Tris-buffer 0.2 โมลาร์ pH 8.6 ใน 0.02 โมลาร์ ethylenediamine tetraacetic acid

Tris [hydroxymethyl] aminomethane 0.746 กรัม และ ethylenediamine tetraacetic acid 2.421 กรัม ทำเป็นสารละลาย 90 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.6 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

### 3. สารเคมีที่ใช้ในการหาชนิดของโปรตีนในเรตินาโดย gel electrophoresis

#### 3.1 สารละลาย Acrylamide Bis

acrylamide 29.2 กรัมและ N,N'-Bis-methylene-acrylamide 0.8 กรัม ทำเป็นสารละลาย 100 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น และเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.2 สารละลาย Tris-HCl 1.5 โมลาร์, pH 8.8

Tris base 27.23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับให้เป็น pH 8.8 ด้วยกรด HCl จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 150 มิลลิลิตร และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.3 สารละลาย Tris-HCl 0.5 โมลาร์, pH 6.8

Tris base 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร ปรับให้เป็น pH 6.8 ด้วย HCl และเติมน้ำกลั่นได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.4 สารละลาย 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS)

ละลาย SDS 1 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนได้ 10 มิลลิลิตร

#### 3.5 บัฟเฟอร์สำหรับละลายสารตัวอย่าง (sample buffer)

|                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| น้ำกลั่น                    | 3.2 มิลลิลิตร |
| Tris-HCl 0.5 โมลาร์, pH 6.8 | 1 มิลลิลิตร   |
| glycerol                    | 1.6 มิลลิลิตร |
| SDS 10% (W/V)               | 1.6 มิลลิลิตร |
| $\beta$ -mercaptoethanol    | 0.4 มิลลิลิตร |
| Bromphenol blue 0.2% (W/V)  | 0.2 มิลลิลิตร |
| ปริมาตรรวม                  | 8.0 มิลลิลิตร |

เก็บสารละลายนี้ในที่เย็น ใช้สารละลายตัวอย่าง 1 ส่วนต่อสารละลายนี้ 1 ส่วน ผสมกันแล้วแช่ในน้ำเดือดนาน 2 นาที

#### 3.6 Electrode (Running) buffer, pH 8.3 เข้มข้น 5 เท่า

|           |           |
|-----------|-----------|
| Tris-base | 9 กรัม    |
| glycine   | 43.2 กรัม |
| SDS       | 3 กรัม    |

ทำเป็นสารละลาย 600 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้ถ้ามีการตกตะกอนให้อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียสก่อนจนตะกอนละลาย และทำให้เจือจาง 5 เท่าด้วยน้ำกลั่น

## 3.7 Ammonium persulphate 10%

Ammonium persulphate 100 มิลลิกรัม ทำเป็นสารละลาย 1 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ ๆ ก่อนใช้ ไม่สามารถเก็บไว้ได้เนื่องจากเป็นสารที่สลายตัวได้ง่าย

## 3.8 สารละลาย Coomassie blue

Coomassie blue R-250 0.4 กรัม ละลายใน 400 มิลลิลิตรของสารละลาย ซึ่งประกอบด้วย methanol 40% และ acetic acid 10% ในน้ำกลั่น

## 3.9 สารละลายสำหรับตรึงแถบโปรตีน (fixative solution)

ประกอบด้วย methanol 50% และ acetic acid 12% ในน้ำกลั่น

## 3.10 สารละลายสำหรับล้างสีออก (destaining solution)

ประกอบด้วย methanol 40% และ acetic acid 10% ในน้ำกลั่น

## 3.11 การเตรียม separating gel 9%

|                                   |                 |
|-----------------------------------|-----------------|
| น้ำกลั่น                          | 3.5 มิลลิลิตร   |
| Tris-HCl 1.5 โมลาร์, pH 8.8       | 2.0 มิลลิลิตร   |
| สารละลาย Acrylamide/ Bis          | 2.4 มิลลิลิตร   |
| สารละลาย 10% SDS                  | 0.08 มิลลิลิตร  |
| สารละลาย 10% Ammonium persulphate | 0.045 มิลลิลิตร |
| TEMED                             | 0.011 มิลลิลิตร |
| ปริมาตรรวม                        | 8.039 มิลลิลิตร |

ผสมสารละลายสามชนิดแรก จากนั้นนำมาดูดอากาศออก แล้วจึงเติมสารละลาย 10% SDS สารละลาย 10% Ammonium persulphate และ TEMED รีบเทสารผสมลงในระหว่างแผ่น กระดาษ ที่เตรียมไว้ ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นให้เป็นชั้นอยู่บนสารละลายผสม ทิ้งให้สารผสมเกิด polymerization ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที หลังจากเกิด polymerization ควรเก็บเจลไว้อีก ประมาณ 2 ชั่วโมง จึงนำมาทำ stacking gel

## 3.12 การเตรียม stacking gel 4%

|                                   |                 |
|-----------------------------------|-----------------|
| น้ำกลั่น                          | 2.43 มิลลิลิตร  |
| Tris-HCl 0.5 โมลาร์, pH 6.8       | 1.00 มิลลิลิตร  |
| สารละลาย Acrylamide/Bis           | 0.53 มิลลิลิตร  |
| สารละลาย 10% SDS                  | 0.04 มิลลิลิตร  |
| สารละลาย 10% Ammonium persulphate | 0.025 มิลลิลิตร |

|            |                  |
|------------|------------------|
| TEMED      | 0.0125 มิลลิลิตร |
| ปริมาตรรวม | 4.0375 มิลลิลิตร |

ผสมสารละลายสามชนิดแรก ดูดอากาศออก แล้วจึงเติมสารละลายสามชนิดหลัง จากนั้นรีบเททับลงบน separating gel ที่เอาชั้นน้ำออกไปแล้ว ใส่แผ่นพลาสติกซึ่งใช้สำหรับทำให้เกิดช่องใน stacking gel และทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จึงนำเจลไปใช้

#### 4. สารเคมีที่ใช้ในการหา sulfhydryl-contained protein โดยวิธี autofluorograph

4.1 สารละลาย 1 โมลาร์ Sodium salicylate สำหรับเจล 1 แผ่น

Sodium salicylate 6.4040 กรัม ทำให้เป็นสารละลาย 40 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น

#### 5. สารละลายที่ใช้ในการหา ไกลโคโปรตีน โดยวิธี blotting

5.1 สารละลาย Tris-buffer saline

Tris-HCl 2 โมลาร์, pH 8.0 5 มิลลิลิตร

Sodium chloride 8.78 กรัม

ทำเป็นสารละลาย 1000 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น

5.2 สารละลาย Tris-buffer saline Tween

Tris-buffer saline 1000 มิลลิลิตร

Tween 20 (0.05%) 0.5 มิลลิลิตร

5.3 สารละลาย 5% Skim milk

Skim milk 5 กรัม ทำให้เป็นสารละลาย 100 มิลลิลิตรใน Tris-buffer saline

5.4 การเตรียม Towbin buffer

Tris 3.03 g

glycine 14.4 g

methanol 200 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

5.5 substrate buffer

Tris-HCl 2 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร

Sodium chloride 5 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร

Magnesium chloride 1 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร

ทำให้เป็นสารละลาย 100 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น

#### 5.6 Substrate

Nitro blue tetrazolium 33 ไมโครลิตร

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate 16.5 ไมโครลิตร

เติม substrate buffer 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 5 นาที อย่าให้โดนแสงจัด

## ผลงานทางวิชาการ

จากการศึกษาในครั้งนี้ผลการศึกษาที่ได้นำออกเผยแพร่ในการประชุมวิชาการต่างๆ ดังนี้

1. การศึกษาเบื้องต้น : ผลของกรดกลูตามิกต่อการเจริญของลูกตาเปรียบเทียบกับสารปิดตา นำเสนอในการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 9 ซึ่งจัดขึ้นระหว่างวันที่ 13-15 ตุลาคม พ.ศ. 2536 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. Comparative Studies of Occlusion- and Excitatory Amino Acid-Induced Abnormal Eye Growth. นำเสนอในการประชุมวิชาการและการประชุมใหญ่ประจำปีสรีรวิทยา ครั้งที่ 23 ซึ่งจัดขึ้นระหว่างวันที่ 6-8 เมษายน พ.ศ. 2537 ณ อุทยานวิทยาศาสตร์ จังหวัดชลบุรี

3. Sulfhydryl-Containing Proteins and Abnormal Eye Growth จะนำเสนอใน 11 th FAOBMB Symposium ซึ่งจะจัดขึ้นระหว่างวันที่ 15-18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2537 ณ Marriott Royal Garden Riverside Hotel. Bangkok.

หมายเหตุ : บทคัดย่อแนบท้าย

การศึกษาเบื้องต้น : ผลของกรดกลูตามิกต่อการเจริญของลูกตา เปรียบเทียบกับการปิดตา

เขาวเรศ สุวรรณไพบูลย์, จินตนา สัตยาศัย  
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**Objective :** ศึกษาผลของกรดกลูตามิกต่อการเกิด abnormal eye growth ในลูกไก่ โดยเปรียบเทียบกับการปิดตา (eye occlusion)

**Materials :** ลูกไก่อายุประมาณ 2-3 วัน

**Measurement :** แบ่งลูกไก่ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มแรกตาขวาถูกปิดด้วยเทปขาวทึบแสง ที่ทำเป็นรูปกรวย กลุ่มที่ 2,3,4 และ 5 ตาขวาได้รับการฉีด intraocular ด้วยสารละลาย กรดกลูตามิก ในขนาด 90,50,5 และ 1 umoles/eye ตามลำดับ และตาซ้ายได้รับการฉีดด้วยน้ำกลั่น 10 ul หลังสัปดาห์ที่ 3 จึงนำมามาและแยกลูกตามาชั่งน้ำหนัก วัดความยาวทั้งทาง equatorial และ axial และแยกเอา retina มาหาปริมาณ total sulfhydryl ค่าต่าง ๆ ที่ได้นำมาเปรียบเทียบ ระหว่างตาขวาและซ้ายในลูกไก่แต่ละตัว

**Results :** ตาที่ได้รับการปิด มีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยเทียบกับข้างควบคุมจะมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนัก ความยาว equatorial และความยาว axial กลุ่มที่ได้กรดกลูตามิก 90 หรือ 50 umoles/eye มีผลทำให้ตามีขนาดเล็กลง ทั้งน้ำหนัก ความยาว equatorial และความยาว axial ขนาด 5 umoles/eye ทำให้ตาใหญ่ขึ้นเล็กน้อย ส่วนขนาด 1 umoles/eye ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลง ที่ชัดเจน ปริมาณ total sulfhydryl ของ retina มีค่าลดลงในกลุ่มที่ได้รับการปิดหรือฉีดด้วย กรดกลูตามิก 90 หรือ 50 umoles/eye

**Conclusion :** การปิดตามีผลทำให้ลูกตามีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนการฉีดด้วยกรดกลูตามิก ให้ผลในลักษณะที่ขึ้นกับขนาดที่ใช้ ปริมาณ total sulfhydryl อาจแสดงถึงการเกิด abnormal function ของ retina

**Request for prints :** เขาวเรศ สุวรรณไพบูลย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## บทคัดย่อ

**เรื่อง Comparative Studies of Occlusion- and Excitatory Amino Acid-Induced  
Abnormal Eye Growth**

ชื่อ-สกุล ผู้เสนอ นางสาวเขาวเรศ สุวรรณไพบูลย์

สถานศึกษา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**Comparative Studies of Occlusion- and Excitatory Amino Acid-Induced Abnormal  
Eye Growth**

Yauvaret Suwanphaiboon\*, Jintana Sattayasai\*, Nison Sattayasai\*\*

\* Department of Pharmacology Faculty of Medicine, Khon Kaen University

\*\* Department of Biochemistry Faculty of Science, Khon Kaen University

This studies examines the effect of excitotoxic amino acids on eye growth and total sulfhydryl content compare with occlusion. Day old chick recieved a single intraocular of either 5 umoles glutamic acid (GLU), 50 umoles GLU, 200 nmoles kainic acid (KA) or 400 nmoles N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) per eye or monocularly occluded with masking tape. Following 21 days survival period, eyeballs were removed and weighed. The axial and equatorial length of eyeball and total retinal sulfhydryl content were determined. An increase in eye weight and axial length without changing in total retinal sulfhydryl content was observed in the eye treated with 5 umoles GLU. Treatment with 50 umoles GLU resulted in a decrease in eye weight, axial length, equatorial length and total retinal sulfhydryl content while KA resulted in a increase in eye weight, axial length and equatorial length but decrease in total retinal sulfhydryl content. Eyeballs treated with NMDA appeared normal. Occluded eyes were enlarged with and decrease in total retinal sulfhydryl content. The results demonstrate that this excitatory

neurotoxins have different effect on eye growth. In addition, changing in total retinal sulfhydryl content might be associated with the abnormal growth of the eyeball.

## SULFHYDRYL-CONTAINING PROTEINS AND ABNORMAL EYE GROWTH

Nison Sattayasai<sup>1</sup>, Yauvaret Suwanphaiboon<sup>2</sup>, and Jintana Sattayasai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, and <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

Photoreceptor cells in the retina are proposed to play an important role in controlling eye growth. Changes in eye size and zinc-iodide-osmium (ZIO) staining property of photoreceptor cells were reported after treatment with certain excitotoxic amino acids (EAAs). In addition, ZIO staining was suggested to relate with sulfhydryl group. In this study, the effects of eye occlusion and EAAs on eye growth and sulfhydryl-containing proteins were examined. One day old chicks received either a monocular occlusion with opaque masking tape or a single intraocular injection of 5 umoles glutamic acid (GLU), 200 nmoles kainic acid (KA) or 400 nmoles N-methyl-D,L-aspartic acid. After 21 days, the eyeballs were removed and weighed. Measurements of axial and equatorial length were taken. Retinae were homogenized and total sulfhydryl contents were determined. Retinal proteins were separated by using gel electrophoresis. Autoradiographs using <sup>14</sup>C-iodoacetamide were done to identify sulfhydryl-containing proteins. Eye occlusion resulted in an increase in eye weight and size, but in a decrease in total sulfhydryl content and sulfhydryl-containing proteins. Treatment with GLU increased eye weight and size, but to a lesser extent than eye occlusion. Total sulfhydryl content and sulfhydryl-containing proteins were normal. Treatment with KA increased eye weight and size, but decreased total sulfhydryl content and sulfhydryl-containing proteins. No changes in all these parameters were observed in NMDA-treated eyes. The electrophoretic pattern of proteins in all treatment groups was the same as the controls. It is proposed that sulfhydryl groups of certain proteins in the retina might have a functional relationship with eye growth.