

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง (experimental animals)

สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ หนูถีบจักรสายพันธุ์ Swiss Albino เพศผู้หรือเพศเมีย อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ ใช้ในการติดเชื้อพยาธิตัวจืดโดยการป้อนไรน้ำที่ติดเชื้อ (infected cyclops) เพื่อให้ได้พยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นแก้วหน้า ในการใช้เตรียมแอนติเจน

3.2 การเตรียมพยาธิตัวจืด *G. spinigerum* ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นแก้วหน้า

3.2.1 ไรน้ำ : โฮสต์ตัวกลางตัวที่ 1 ของพยาธิตัวจืด

ไรน้ำ เก็บจากแหล่งน้ำภายในจังหวัดขอนแก่น นำมาเพาะเลี้ยงในถาดที่มีน้ำกรองปราศจากคลอรีน โดยให้พารามีเซียม (paramecium) เป็นอาหาร

3.2.2 ไข่พยาธิและตัวอ่อนระยะที่ 1 ของพยาธิตัวจืด

นำพยาธิตัวจืดตัวแก่เพศเมีย ออกจากก้อนทும்บริเวณผนังกระเพาะอาหารของสุนัขที่ซื้อมาจากตลาดขายเนื้อสุนัขบ้านท่าแร่ จังหวัดสกลนคร ล้างด้วยน้ำเกลือปกติ (0.85% NaCl) ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำพยาธิมาเลี้ยงต่อในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C ค้างคืน เพื่อวางไข่ เก็บรวบรวมไข่ทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในแก้วทรงกระบอก (beaker) ที่มีน้ำปราศจากคลอรีน ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 10-14 วัน ไข่จะฟักออกมาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1

3.2.3 ไรน้ำที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นของพยาธิตัวจืด

นำตัวอ่อนระยะที่ 1 ของพยาธิตัวจืดที่เริ่มฟักออกจากไข่ ใส่ในถาดเลี้ยงไรน้ำประมาณ 10-12 วัน นำไรน้ำมาตรวจหาตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 3 ขึ้นก้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งจะ พบตามช่องว่างภายในลำตัวของไรน้ำ เก็บรวบรวมไรน้ำที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นไว้ในจานพลาสติกขนาด 96 หลุม ให้ได้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้น 15-20 ตัวต่อหลุม

3.2.4 ป้อนไรน้ำที่ติดเชื้อเข้าหนูถีบจักร

นำไรน้ำที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นของพยาธิตัวจืด ป้อนเข้าทางปากของหนูถีบจักร

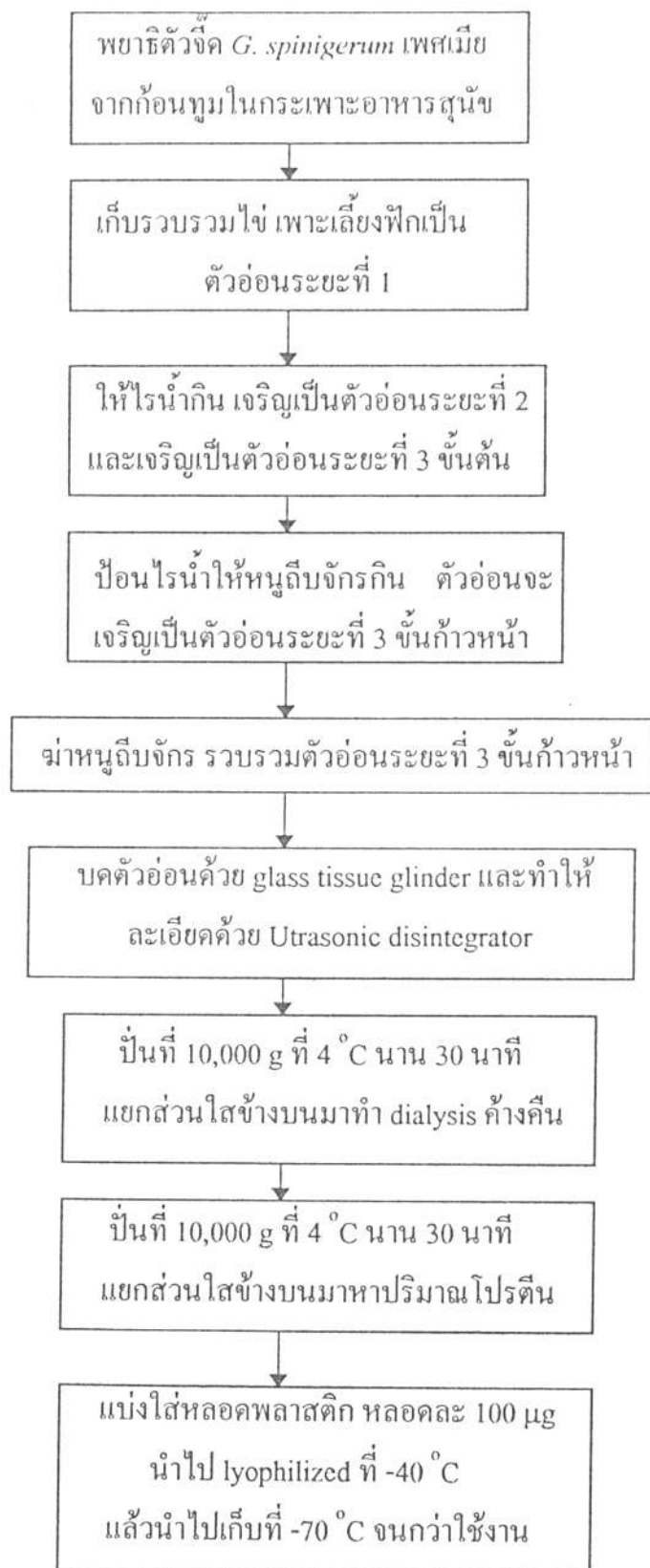
โดยใช้ทูเบอร์คูลิน ไชริงค์ (tuberculin syringe) ที่ต่อกับเข็มฉีดยาเบอร์ 8 ปลายตัด หนูถีบจักรแต่ละตัวจะได้รับตัวอ่อนพยาธิประมาณ 15-20 ตัว เลี้ยงหนูถีบจักรโดยให้น้ำและอาหารตามปกติ ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นคั่นจะเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้าเข้าซิสต์ (cyst) อยู่ในกล้ามเนื้อ ตับ และได้ผิวหนังของหนูถีบจักร ภายใน 30 วัน

3.2.5 การเก็บรวบรวมพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้า

ทำการฆ่าหนูถีบจักรโดยวิธีคั่นคอ (cervical dislocation) นำอวัยวะทุกส่วนของหนูถีบจักรมาตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้า โดยกดด้วยแผ่นกระจกชนิดหนา 2 แผ่น (compression method) ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereoscopic ค่อยๆ เขี่ยตัวอ่อนพยาธิโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 26 ที่ติดปลายกับทูเบอร์คูลิน ไชริงค์ ล้างให้สะอาดด้วยน้ำเกลือปกติ ปราศจากเชื้อ เก็บรวบรวมและแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C

3.3 การสกัดแอนติเจนจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้า, ตัวแก่เพศผู้ และตัวแก่เพศเมียของพยาธิตัวจิ๊ด

นำตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ำวหน้าหรือ ตัวแก่เพศผู้ หรือ ตัวแก่เพศเมีย มาบดด้วย glass tissue grinder ใน 0.15 M phosphate buffered saline pH 7.2 ที่มี 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 mM N-tosylamide-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) และ 2 μM trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-quinidino)-butane (E-64) เป็น protease inhibitor บดตัวพยาธิจนละเอียดโดยทำในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา นำส่วนผสมที่ได้มาทำให้เซลล์แตกดียิ่งขึ้น โดยใช้เครื่องคลื่นความถี่สูง (ultrasonic disintegrator) (Vibra cell) ใช้ความถี่สูงสุดครั้งละ 1 นาที พัก 10 นาที จำนวน 10 ครั้ง โดยทำในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา นำส่วนผสมทั้งหมดที่ได้ไปปั่นที่ 10,000 x g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C คู่อสาละลายใสส่วนบน (supernatant) ซึ่งเป็นแอนติเจนชนิดสกัดจากพยาธิ มาทำการ dialysis ด้วยน้ำกลั่นที่ไม่มี อีออนที่อุณหภูมิ 4°C นำสารละลายที่ได้มาปั่นที่ 10,000 x g เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C แล้วแยกเอาเฉพาะสารละลายใสส่วนบน มาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry *et al.*, 1951 แบ่งใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มล. ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนหลอดละ 100 μg เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C ค้างคืน แล้วนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ -40°C ด้วยเครื่อง lyophilizer จากนั้นนำมาเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน



ภาพที่ 4 แผนภูมิการเตรียมแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ามหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด

3.4 การแยกชนิดแอนติเจน โดยวิธี two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

นำแอนติเจนที่สกัดได้มาแยกชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค two dimensional gel electrophoresis (O'Farrel, 1975) โดยในมิติแรก จะแยกแอนติเจนชนิดต่างๆตามหลักการของ isoelectric focusing ซึ่งใช้ polyacrylamide gel เป็นตัวค้ำจุนบนแผ่นฟิล์ม (gel bond film) ที่มี pH ต่างๆกันอยู่ระหว่าง 3-10 แล้วนำมาแยกชนิดของแอนติเจนในมิติที่ 2 โดยใช้เทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) ที่มีเปอร์เซ็นต์ gel ต่างๆกันอยู่ระหว่าง 10-18%

3.4.1 Isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis (IEF-PAGE)

เป็นการแยกแอนติเจนโดยอาศัยความแตกต่างของค่า isoelectric point (pI) ของโปรตีน ตามวิธีการของ O'Farrel (1975)

3.4.1.1 การเตรียม IEF gel

เตรียมเป็นแผ่น gel ชนิดบาง (ultra-thin IEF polyacrylamide slab gel) ขนาด 6.5x14.0x0.06 ซม. ประกอบด้วย 7.5% (w/v) acrylamide gel (โดยเตรียมจาก 29.1% (w/v) acrylamide, 0.9% (w/v) Bis) และ 8% (v/v) ampholine (Pharmacia, LKB) ที่มี pH operating range 3.5-10.0 ทำการกำจัดอากาศ (deacrate) ออกจากส่วนผสมในสูญญากาศ (vacuum flask) 5 นาที แล้วเติม 0.05 (v/v) TEMED และ 0.05% (w/v) ammonium persulfate (วิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก) เทส่วนผสมของ gel ลงบนแผ่นกระจกที่กั้นขอบทั้งสองข้างด้วยเทปพลาสติก (demo tape) ที่หนา 0.06 ซม. แล้วปิดผิวบนของ gel ด้วยแผ่นฟิล์ม (gel bond film) ที่ติดกับแผ่นกระจกอีกแผ่นหนึ่ง โดยให้ด้าน hydrophilic ของแผ่นฟิล์มเข้าหา gel ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แข็งตัว ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นจึงแกะแผ่น gel ออกจากกระจก แล้วเก็บแผ่น gel ในกล่องพลาสติกที่มีผ้าชุบน้ำ ไว้ในตู้เย็น 4 °C เพื่อให้ gel แข็งตัวอย่างสมบูรณ์ (complete polymerization)

3.4.1.2 การแยกชนิดแอนติเจนโดยวิธี IEF-PAGE

เทคนิค IEF-PAGE ในการวิจัยครั้งนี้ ทำในแนวราบ โดยใช้เครื่อง Multiphor II (LKB, Sweden) ขั้นตอนแรกจะวางแผ่นฟิล์ม IEF gel บน cooling plate (10 °C) ประมาณ 15 นาที จากนั้นวางแผ่นกระดาษกรอง (electrode strip) ที่ชุ่มด้วย 10 mM H_3PO_4

วางบนด้านซ้ายของแผ่น gel หรือด้านขั้วบวก (anode) และวางอีกแผ่นที่ชุ่มด้วย 20 mM NaOH อีกด้านหนึ่งของแผ่น gel หรือด้าน ขั้วลบ (cathode) ปิดฝา chamber ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ เครื่อง 3000 xi power supply (Bio-Rad) จ่ายกระแสไฟฟ้าเพื่อ prerin โดยให้ power 15 watt คงที่ เป็นเวลานาน 20 นาที (final voltage ประมาณ 1,370 V, กระแสไฟฟ้า 10 mA, VH 309) ปลดขั้วไฟฟ้า แล้วเติมแอนติเจน 5 μ l (200 μ g protein) และ pI marker 5 μ l บนแผ่นกระดาษกรอง (sample application pieces) ที่วางลงบน gel ด้านใกล้ขั้วบวก แล้วจ่ายกระแสไฟฟ้า ให้ power 10 watt คงที่ นาน 15 นาที เพื่อ focusing (final voltage ประมาณ 1,579 V, กระแสไฟฟ้า 6 mA, VH 340) ปิดกระแสไฟฟ้า เอาแผ่นกระดาษกรอง ออก แล้วจึงให้กระแสไฟฟ้าเพื่อ focusing ต่อ โดยให้ power 15 watt คงที่ นาน 45 นาที (final voltage ประมาณ 2,389 V, กระแสไฟฟ้า 6 mA , VH 1,587) กรบเวลาปิดกระแสไฟฟ้า แะกระดาษกรอง electrode strip ออก นำแผ่นฟิล์ม gel มาตัดเป็นแผ่น strip ตามความยาวตามแนวของ แล็บโปรตีน เพื่อนำไปแยกชนิดแอนติเจนต่อในมิติที่ 2 ในเทคนิค SDS-PAGE หรือนำไปย้อมสีเพื่อดูแถบโปรตีน (protein pattern)

3.4.1.3 การย้อมสี IEF gel

นำแผ่นฟิล์ม IEF gel มา fixed ใน fixing solution นาน 5 นาที แล้วย้ายมาแช่ใน destaining solution นาน 5 นาที จากนั้นนำมาย้อมสี ใน staining solution นาน 5 นาที ครบเวลานำมาล้างสีด้วย destaining solution 2 ครั้งๆละ 10 นาที หรือจน background ใสแล้วนำมาแช่ใน preserving solution นาน 5 นาที จากนั้นนำมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องค้างคืน (นำมาย้อมสี คู่มือที่ภาคผนวก)

3.4.1.4 IEF standard marker (Bio-Rad)

ประกอบด้วยโปรตีน 9 ชนิด ละลายใน 50% glycerol และ 0.02% sodium azide โปรตีน 9 ชนิดมี isoelectric points อยู่ในช่วง 4.6-9.6 ส่วนผสมนี้มีเสถียรภาพ การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จะไม่แข็งตัว เพราะมี glycerol และโปรตีนจะไม่ถูกทำลายจากการ freeze-thaw

3.4.1.5 การคำนวณค่า pI ของแถบโปรตีน

pI ของแถบโปรตีนที่แยกจากการทำ IEF-PAGE สามารถทราบค่าได้โดยการนำค่าระยะทางจากขั้วบวก (anode) จนถึงระยะทางโปรตีนที่สนใจ มาเปรียบเทียบกับระยะทางจากขั้วบวกจนถึงระยะทางที่ IEF standard marker เคลื่อนที่ไป ที่ทำควบคู่บนแผ่นฟิล์ม

IEF gel เดียวกัน จากกราฟเส้นตรงที่ได้จากการ plot ระหว่างค่าระยะทางจากขั้วบวกกับค่า pI ของ standard marker

สำหรับ IEF standard marker ของ Bio-Rad ประกอบด้วย

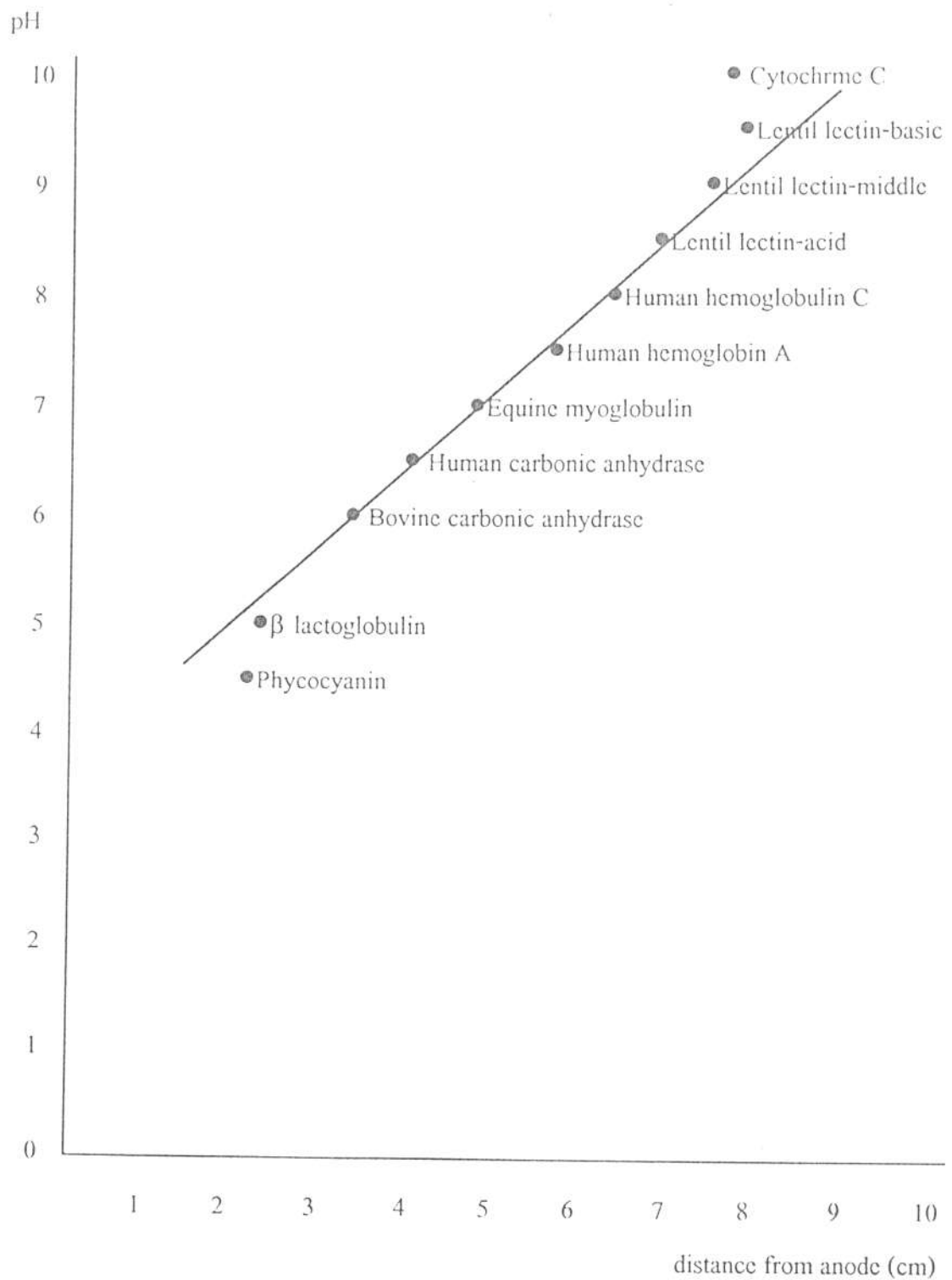
Phycocyanin	pI 4.65
β lactoglobulin	pI 5.10
Bovine carbonic anhydrase	pI 6.00
Human carbonic anhydrase	pI 6.50
Equine myoglobin	pI 7.00
Human hemoglobin A	pI 7.10
Human hemaglobin C	pI 7.50
Lentil lectin (3 band)	pI 7.80, 8.00, 8.20
Cytochrome C	pI 9.6

3.4.2 การแยกชนิดแอนติเจน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

เป็นวิธีแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้ Protien II dual slab cell apparatus และเครื่อง 3,000 xi power supply 200/240 VAC (Bio-Rad, CA, USA) ทำตามวิธีที่กล่าวไว้ในคู่มือการใช้เครื่องมือ โดยใช้ระบบ gel ไม่ต่อเนื่อง(discontinuous gel) ประกอบด้วย 10-18% gradient acrylamide separating gel และ 3% acrylamide stacking gel

3.4.2.1 การเตรียม SDS-PAGE gel

โดยเริ่มเตรียม 10-18% gradient SDS-PAGE gel ที่มีความหนา 1.5 มม. ซึ่งใช้ gradient former (Pharmacia) และ peristatic pump P-1 (Pharmacia) เป็นเครื่องผสมสารละลาย 10% และ 18% separatory acrylamide ที่มีปริมาตรอย่างละ 20 มล. ค่อยๆใส่ลงไประหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ โดยไม่ให้มีฟองอากาศ คั้นปิดหน้าสารละลาย acrylamide ด้วยน้ำกลั่น พอประมาณ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว (polymerization) เป็นเวลา 45-60 นาที จะได้ 10-18% gradient SDS-PAGE gel ที่มีขนาด 15.5 x 16 ซม. ล้าง acrylamide ที่ไม่ polymerized บนหน้าผิว gel ออกด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นเตรียม 3% stacking acrylamide gel แล้วค่อยๆเทลงไประหว่างแผ่นกระจก บน 10-18% separating gel พร้อมกับสอด 2D comb (Bio-Rad) ลงไป ปล่อยให้เกิดการ polymerization นาน 45-60 นาที หลังจากนั้น ค่อยๆ



ภาพที่ 5 Calibration curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง isoelectric point (pI) กับระยะทางที่เคลื่อนที่ของ standard isoelectric focusing markers (Bio-Rad) จากขั้วบวก (anode) ใน Isoelectric focusing gel (IEF gel)

ถอด comb ออก แล้วล้าง หน้า gel ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับ cooling core เพื่อทำเป็น upper buffer chamber และนำมาใส่ใน lower buffer chamber ที่มี lower buffer อยู่

3.4.2.2 การเตรียม IEF gel strip ที่มีแถบโปรตีนก่อนการแยกในมิติที่ 2

แช่ IEF gel strip ใน sample solubilizing solution ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที หรือแช่นาน 5 นาที แล้วต้มด้วยเครื่องไมโครเวฟ 1 นาที จากนั้นนำแผ่น IEF strip ไปวางในช่องของ stacking gel ที่เกิดจาก 2D comb โดยให้ขอบของ IEF gel แนบสนิทกับเนื้อ gel ของ SDS-PAGE gel ทำเครื่องหมายให้ทราบตำแหน่งของ IEF gel ที่จะถูกแยกชนิดโดย SDS-PAGE เติม electrode buffer ที่ upper buffer chamber ให้ท่วม gel แล้วเติม prestained low range M.W. standard (Bio-Rad) 10 μ l ลงในช่องว่างของ stacking gel สำหรับ marker ที่เกิดจาก 2 D comb

3.4.2.3 การเตรียมสารละลาย standard MW marker

standard MW marker ที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE ในการแยกในมิติที่ 2 เป็น prestained low range standard (Bio-Rad) ซึ่งเป็นสารละลายของ prestained protein ใน 33% (v/v) glycerol, 3% SDS, 10mM Tris pH 7.0, 10 mM DTT, 2mM EDTA, 0.01% NaN_3 เก็บในอุณหภูมิ -20°C ก่อนนำมาใช้ต้องมาอุ่นที่ 40°C นาน 1 นาที เพื่อละลายสารที่อาจตกตะกอนที่ -20°C แล้วควรแบ่งใส่เป็นหลอดเล็กๆหลอดละ 100 μ l เก็บแช่ที่ -20°C

3.4.2.4 การแยกชนิดโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

protein antigen ที่อยู่ใน IEF gel จะถูกแยกใน 10-18% gradient SDS-PAGE gel โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA ควบคุมด้วยเครื่อง 3000 xi power supply (Bio-Rad) ทำใน protein II xi electrophoresis chamber (Bio-Rad) ที่มี electrode buffer เป็น upper และ lower buffer และมีน้ำอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จาก circulating cooling bath (Lauda) เป็นตัวทำความเย็นให้ electrode buffer มีอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ทำการแยกข้ามคืน (ใช้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง) จนกระทั่งแนวสี bromphenol blue ใน sample buffer เคลื่อนที่ลงมาถึงขอบล่างของกระบอก หลังจากปิดเครื่องแล้ว นำ SDS-PAGE gel ที่ได้นำมาข้อมสี หรือทำการย้ายแอนติเจนลงสู่แผ่น nitrocellulose เพื่อใช้ในการทำ immunoblotting

3.4.2.5 การข้อมสี SDS-PAGE gel

นำแผ่น SDS-PAGE gel (2D-PAGE gel) มาข้อมด้วย silver stain ด้วยวิธีการดังนี้

1. แช่แผ่น gel ใน 20% trichloroacetic acid นาน 1 ชั่วโมง

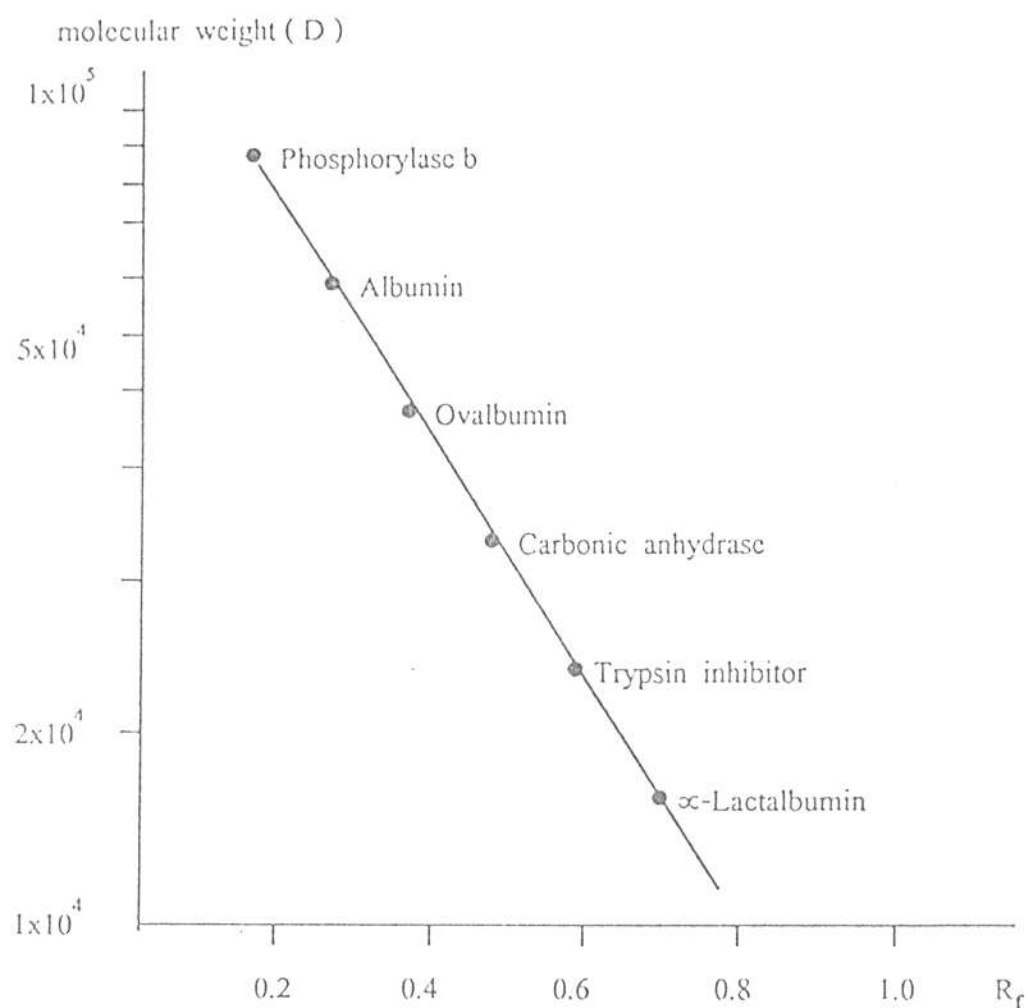
2. ครบเวลานำมาแช่ใน 10 % glutaraldehyde นาน 30 นาที
3. นำ gel มาล้างด้วยส่วนผสมของ 10% ethanol กับ 5% acetic acid 2 ครั้งๆละ 15 นาที
4. แช่แผ่น gel ในส่วนผสมของ 3.4 mM potassium dichromate และ 3.2 mM nitric acid นาน 15 นาที
5. ครบเวลานำมาแช่ใน 12mM silver nitrate 20 นาที
6. ทำให้เกิด (develope) โดยล้างด้วย ส่วนผสมของ 0.28 M sodium carbonate กับ 0.5 ml/ L formadehyde หลายๆครั้ง จนกระทั่ง background เปลี่ยนเป็นสีเหลือง
7. หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ gel ใน 3% acetic acid นาน 5 นาที
8. ล้าง gel ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 2 ครั้ง
9. แช่ gel ใน 3% glycerol นาน 5 นาที
10. จากนั้นนำแผ่น SDS-PAGE gel ที่ย้อมสีแล้วไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Easy Breeze Air Gel Dryer (Hoefer) แล้วเก็บแผ่น gel ในที่แห้ง

3.4.2.6 การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน

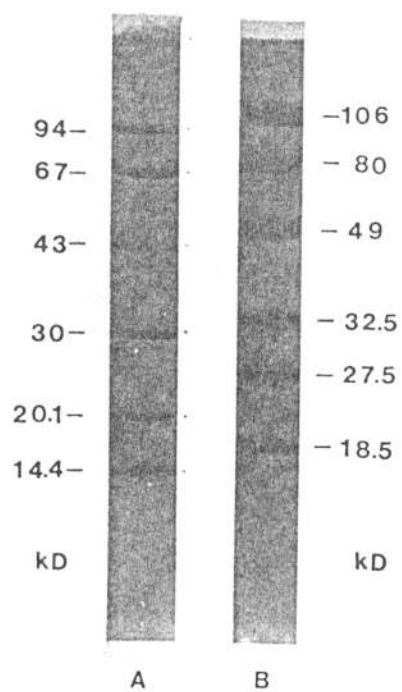
น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน หรือชิ้น polypeptide หลังจากแยกด้วยวิธี SDS-PAGE สามารถทราบได้โดยนำค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่ (Relative electrophoretic mobility, Rf) ของแถบโปรตีนหรือชิ้น polypeptide ที่สนใจมาเปรียบเทียบกับค่า Rf ของ standard MW marker ที่ทำควบคู่บน slab gel แผ่นเดียวกัน จากกราฟเส้นตรงที่ได้จากการ plot ระหว่างค่า Rf กับค่า log ฐาน 10 ของ M.W. ของ โปรตีน แต่ละชนิดที่อยู่ใน standard M.W.marker โดยค่า Rf ของสารที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่อยู่ในสารละลายของ standard M.W.marker ที่ใช้ หรือของ protein antigen ที่เราสนใจ จะคำนวณได้จาก

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ไป}}{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงระยะทางที่ bromphenol blue เคลื่อนที่ไป}}$$

สำหรับ กรณีที่ใช้ prestained low range standard MW marker จะต้องนำมา calibrate กับ low range standard MW marker เสียก่อน โดยนำ marker ทั้ง 2 ชนิดมาทำการแยกชนิดด้วยวิธี SDS-PAGE ใน 10-18% gradient gel แผ่นเดียวกัน (ภาพที่ 7) แล้วนำมา plot ระหว่างค่า



ภาพที่ 6 Calibration curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) กับระยะทางสัมพัทธ์ (R_f) ของ standard molecular weight markers (Pharmacia) ใน 10%-18% gradient gel (SDS-PAGE)



ภาพที่ 7 การ calibrate ค่าของ prestained low range standard MW marker (Bio-Rad) (B) กับ low range standard MW marker (Pharmacia) (A)

Rf กับ log ฐาน 10 ของค่าน้ำหนักโมเลกุลของ marker ทั้ง 2 ชนิดในกราฟเดียวกัน เพื่อหาค่า factor ในการ calibrate ค่าของ prestained marker

prestained low range standard MW marker (Bio-Rad) ประกอบด้วย phosphorylase B (106 kD) , BSA (80 kD) , ovalbumin (49.5 kD) , carbonic anhydrase (32.5 kD) , Soybean trypsin inhibitor (27.5 kD) และ lysozyme (18.5 kD)

low range standard MW marker (Pharmacia) ประกอบด้วย phosphorylase B(94.0 kD) albumin(67.0 kD), oval albumin(43.0 kD), carbonic anhydrase(30.0 kD), trypsin inhibitor (20.1 kD) และ lactoalbumin(14.4 kD)

3.5 Western blot analysis

3.5.1 Electrophoretic transfer

การย้าย protein antigen ที่ถูกแยกตามค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล ใน 2D -PAGE gel ลงสู่แผ่น nitrocellulose จะทำตามวิธีของ Towbin และคณะ (1979) เริ่มจากนำ 2 D-PAGE gel ที่ต้องการย้าย protein antigen คัดส่วนของ stacking gel ออก จะได้ขนาด ของ separating gel ประมาณ 16.0 x15.5 ซม. นำ 0.2 μ m nitrocellulose membrane (Hoefer) ที่มีขนาดเท่ากับ gel มาแช่ใน Towbin transfer buffer ประมาณ 10 นาที นำมาประกอบเข้าด้วยกันระหว่างกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย Towbin transfer buffer โดยไม่ให้มีฟองอากาศขึ้น ทำในเครื่อง Trans-Blot SD Semi-Dry cell (Bio-Rad) เรียงลำดับจากด้านบนสู่ด้านล่างเป็น ขั้วลบ - กระดาษกรอง - 2D gel - nitrocellulose - กระดาษกรอง - ขั้วบวก , ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง Model 200/2.0 power supply (Bio-Rad) ตั้งให้มีกระแสไฟฟ้าคงที่ 5.5 mA/cm² นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง พัก 10 นาที แล้วให้กระแสไฟฟ้าต่ออีก 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำแผ่น nitrocellulose ที่มี protein antigen ตำแหน่งตรงกับ gel มาดำเนินการต่อไป แผ่น gel ที่ผ่านการ transfer นำมาข้อมสี Coomassie brilliant Blue R-250 เพื่อดูว่า transfer protein ไปได้หมดหรือไม่

3.5.2 Immunoenzyme demonstration of antigen

แผ่น nitrocellulose ที่ได้จากข้อ 3.6.1 นำมาปิด non-specific binding site โดยแช่ใน 1% blocking reagent (Boehringer Mannheim , Germany) ใน Tris pH 7.5 tween นาน 30 นาทีเท blocking solution ออก แล้วเติมซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ด, โรคพยาธิชนิดอื่น และ คนปกติ ที่ทำให้เจือจาง 1:100 ด้วย 1% blocking reagent ใน Tris pH 7.5 tween โดยใช้

nitrocellulose 1 แผ่นต่อตัวอย่างซีรัม 1 ราย เขย่าเบาๆบนเครื่องเขย่า (Red-Rocker, Hoefer) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างแผ่น nitrocellulose ด้วย Tris pH 7.5 tween 5 ครั้งๆละ 5 นาที (100 มล./ ครั้ง) ตรวจสอบแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับแอนติเจนบนแผ่น nitrocellulose โดยให้ทำปฏิกิริยากับ secondary antibody ในที่นี้ใช้ Alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-human IgA, IgG, IgM (Dako, Denmark) ที่เจือจางเป็น 1:1,000 ด้วย Tris pH 7.5 tween ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง โดยเขย่าเบาๆบนเครื่องเขย่า จากนั้นล้าง conjugate ส่วนเกินออกด้วย Tris pH 7.5 tween 5 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วล้างอีกครั้งด้วย Tris pH 9.6 buffer นาน 5 นาที เพื่อปรับให้เป็นค่า buffer ที่เจือจางแล้วเติม BCIP & NBT substrate ปล่อยให้ปฏิกิริยา enzyme-substrate เกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที ปฏิกิริยาผลบวกจะปรากฏแถบหรือจุดสีม่วงบนแผ่น nitrocellulose หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 5% acetic acid ประมาณ 1 เท่าของ substrate แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งๆ ชับแผ่น nitrocellulose ให้แห้งด้วยกระดาษกรอง เก็บแผ่น nitrocellulose เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3.6 การจำแนกชนิดแอนติเจนของพยาธิตัวจิ๋วโดยวิธี one dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

3.6.1 การจำแนกชนิดแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจิ๋ว โดยวิธี IEF-PAGE

ใช้วิธีเดียวกับข้อ 3.4.1 โดยใช้แอนติเจนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ แอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ามหน้า, ตัวแก่เพศผู้ และตัวแก่เพศเมีย ปริมาณชนิดละ 100 µg เติมนลงใน sample strip บนแผ่น IEF gel เดียวกัน จากนั้นนำมาย้อมสี Coomassie brilliant blue R 250 ตามวิธีข้อ 3.4.1.3 หรือ ทำการย้ายโปรตีนแอนติเจนลงสู่แผ่น nitrocellulose เพื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมต่อไป

3.6.2 การจำแนกชนิดแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจิ๋ว โดยวิธี SDS-PAGE

ใช้แอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้ามหน้า, ตัวแก่เพศผู้และเพศเมียของพยาธิตัวจิ๋ว ปริมาณ 100 µg / lane นำมาแยกชนิดใน 10-18% gradient mini SDS-PAGE gel ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 200 volts ซึ่งควบคุมด้วย 3000xi power supply (Bio-Rad) เป็นเวลาประมาณ 45 นาที ทำใน Mini-PROTEAN II Cell (Bio-Rad) โดยน้ำยาและสารเคมีที่ใช้เช่นเดียวกับข้อ 3.5.2.4 นำ SDS-PAGE gel ที่ได้มาย้อมสี Coomassie brilliant blue R 250

หรือทำการย้ายโปรตีนแอนติเจนลงสู่แผ่น nitrocellulose เพื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมต่อไป

สำหรับแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด จะนำมาแยกใน 10-18% gradient SDS-PAGE gel โดยใช้แอนติเจน 288 μg / 144 μl (2 μg / μl) เติมบนหน้า gel ที่เกิดจาก 2D comb ที่มีความยาวหน้า gel 7.2 ซม (40 μg / ซม) แล้วดำเนินการแยกชนิดด้วยไฟฟ้าเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น แผ่น gel ที่ได้นำมาย้ายโปรตีนแอนติเจนลงสู่แผ่น nitrocellulose แล้วตัดเป็น strip ขนาดกว้าง 0.5 ซม เพื่อนำไปใช้ทำปฏิกิริยากับซีรัมต่อไป

3.7 ตัวอย่างซีรัม

3.7.1 ซีรัมผู้ป่วยที่เป็นโรคพยาธิตัวจิ๊ด (proven human gnathostomiasis serum) ซึ่งได้ตัวพยาธิตัวจิ๊ดออกมาจากผู้ป่วย และสามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็น *G. spinigerum* จำนวนซีรัม ที่ใช้ในการศึกษา 6 ตัวอย่าง แบ่งเป็น Intraocular gnathostomiasis 3 ตัวอย่าง และ Cutaneous gnathostomiasis 3 ตัวอย่าง

3.7.2 ซีรัมผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายโรคพยาธิตัวจิ๊ดและ ไม่ได้พยาธิตัวจิ๊ดจากผู้ป่วย (presumptive human gnathostomiasis serum) จำนวน 5 ตัวอย่าง ทั้งหมดจากผู้ป่วยที่มีอาการทางระบบประสาท และให้ผลบวกกับ *G. spinigerum* antigen โดยการตรวจวิธี ELISA และให้ผลลบกับ *Angiostrongylus* antigen และ *Cysticercus* antigen

3.7.3 ซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิอื่นๆ ได้แก่ ผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง (*Angiostrongyliasis*) จำนวน 1 ตัวอย่าง และ ผู้ป่วยโรคพยาธิคืดหมู (*Cysticercosis*) จำนวน 1 ตัวอย่าง

3.7.4 ซีรัมคนปกติ โดยเป็นซีรัมรวม (pooled serum) ของซีรัมคนปกติ 10 ตัวอย่าง จากคนที่มีสุขภาพร่างกายสมบูรณ์ แข็งแรง ไม่มีประวัติอาการทางคลินิกของโรคพยาธิตัวจิ๊ด ผลการตรวจอุจจาระโดยวิธีเข้มข้น (formaline ether concentrate method) ไม่พบเชื้อปรสิตใดๆ และผลการตรวจเลือดและปัสสาวะให้ผลปกติ

3.8 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

แผ่น nitrocellulose ที่ได้จะเกิดจุดหรือแถบสีมากมาย ซึ่งเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิชนิดต่างๆ การวิเคราะห์จุดหรือแถบสีที่เกิดขึ้น จะต้องกำหนดให้จุดหรือแถบสีอยู่ในพิกัดแกน X และแกน Y โดยให้น้ำหนักโมเลกุลอยู่บนแกน Y และค่า pI อยู่บนแกน X (two dimensional map) แล้ว

วิเคราะห์ตำแหน่งด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ (gel documentation system และ "GelWorks" 2D gel analysis software, UVP) โดยการเปรียบเทียบจุดหรือแถบสีบนแผ่น nitrocellulose จุดหรือแถบสีที่ปรากฏเฉพาะบนแผ่น nitrocellulose ที่อาบด้วยซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้อหนอง พยาธิตัวจิ๋ว และไม่ปรากฏบนแผ่น nitrocellulose ที่อาบด้วยซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิ ชนิดอื่นและซีรัมคนปกติ จะแสดงถึงแอนติเจนที่จำเพาะ ส่วนจุดหรือแถบสีที่ปรากฏให้เห็นบนแผ่น nitrocellulose หลายแผ่น โดยอยู่ตำแหน่งเดียวกัน แสดงว่า เป็นแอนติเจน ชนิดเดียวกัน

การวิเคราะห์ตำแหน่งของแอนติเจน จะทำให้ทราบค่า isoelectric point (pI) และ น้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนที่จำเพาะ ข้อมูลต่างๆที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการหาวิธีที่จะสกัดเพื่อให้ได้แอนติเจนที่บริสุทธิ์ รวมทั้งการพัฒนาวิธีการที่จะนำมา ประยุกต์ใช้ในอนาคต ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยา เพื่อยืนยันการ ติดเชื้อหนองพยาธิตัวจิ๋ว รวมทั้งการสำรวจหาข้อมูลทางระบาดวิทยา