บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) จากศรีราชา โมด้า ฟาร์ม

1.1 ใช้เข็มขนาด 18 มิลลิเมตร กระบอกฉีดยาขนาด10 มิลลิลิตรดูดเลือดจากส่วน Supravertebral branch ของ internal jargular vein

1.2 ปล่อยเลือดลงในหลอดเซ็นติฟิวจ์ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย 0.5 โมลาร์ EDTA ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้วเพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว

1.3 ผสมเลือดให้เข้ากับสารละลาย EDTA โดยการคว่ำหลอดไปมาเบาๆ

1.4 เก็บหลอดใส่ในถังน้ำแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้พลาสมาและเม็ดเลือดแยกชั้นกัน

2. การแยกบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย

2.1 นำเลือดจระเข้ที่มีสารละลาย 0.5 โมลาร์ EDTA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ให้มีการแยกชั้นกันระหว่างพลาสมา เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดง โดยพลาสมาจะอยู่ชั้นบนสุด ชั้น interphase จะเป็นเม็ดเลือดขาว และชั้นล่างสุดจะเป็นเม็ดเลือดแดง

2.2 ใช้ steriled pastures pipette ดูดแยกเอาส่วนพลาสมาที่อยู่ชั้นบนและส่วนชั้น interphase ที่เป็นเม็ดเลือดขาวออกไป ให้เหลือเฉพาะส่วนเม็ดเลือดแดงที่อยู่ชั้นล่าง

2.3 ล้างเม็ดเลือดแดงโดยใช้ steriled pastures pipette ดูดเม็ดเลือดแดงใส่ในหลอดเซ็นติฟิวจ์ที่มี Phosphate buffer saline pH 7.0 ปริมาตร 4 เท่าของเลือดจระเข้ ผสมให้เข้ากัน

2.4 นำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 g นาน 5 นาที เก็บส่วนของเม็ดเลือดแดงเอาส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

2.5 ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยเทน้ำกลั่นแช่เย็นที่ปราศจากเชื้อลงไปปริมาตร 5 เท่าของเม็ดเลือดแดงผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 10 นาที

2.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 g ที่ 4 ^{o}C นาน 20 นาที ฮีโมโกลบินจะอยู่ในส่วนของเหลว ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดง

2.7 เก็บรวบรวมฮีโมโกลบินที่ได้นำไปแยกบริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ column Sephadex G-10 และ G-50

3. การแยกบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินอีกครั้งด้วย Gel filtration column chromatography ของ Sephadex G-10 และ G-50

3.1 การเตรียมเจล

- ค่อย ๆ โรยผงเจลใน equilibrating buffer (buffer ตัวเดียวกับที่ใช้ในการชะสาร)
- กวนเจลอย่างสม่ำเสมอด้วยstirring rod (ระวังอย่าให้ถูกก้นภาชนะจะทำให้เม็ดเจลแตกได้) อ่างน้ำเดือดประมาณ 1 ชั่วโมง
- เมื่อครบกำหนดเวลาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างรอให้เย็นสามารถกำจัดผง "fines" โดยการกวนเบา ๆ แล้วตั้งให้เจลทิ้งตัวลงประมาณ 90-95 % ของเจล ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดผง "fines" ที่แขวนลอยทิ้ง
- ทำซ้ำจนพิจารณาเห็นว่าชั้นน้ำใสปราศจากผง "fines"

3.2 การเตรียมและ pack column

- ติดตั้งคอลัมน์กับ clamp และ stand ให้ได้ระดับในแนวตั้งฉาก แล้วต่อสายยางเข้ากับปั๊ม
- เติม equilibrate buffer ประมาณ 2 นิ้ว จากนั้นค่อย ๆ เทเม็ดเจลลงในคอลัมน์ เติมไปเรื่อย ๆ ระวังอย่าให้เม็ดเจลเซตตัวอย่างสมบรูณ์เพราะให้ผลการแยกที่ไม่ดี
- ในระหว่างการ pack column ควรเปิดปั๊มให้ flow rate ประมาณ 0.5 ml / min
- เมื่อ pack เสร็จแล้วทำการ equilibrate column ให้พร้อมที่จะใช้งาน

3.3 การทำบริสุทธิ์ฮีโมโกลบิน

- load 2 ml ฮีโมโกลบินที่ผ่านการ concentrate ด้วยเครื่อง Speed Vacuum Concentrator ลงในคอลัมน์ ชะด้วย 50 mM Tris-HCl pH 8.1 (flow rate 0.5 ml / min)
- เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ fraction ละ 5 ml จนกระทั่งสังเกตเห็นว่าสีแดงของฮีโมโกลบินถูกชะออกจากคอลัมน์จนหมด
- นำทุก fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm
- รวม fraction ที่มี peak โปรตีนฮีโมโกลบิน เพื่อนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในลำดับต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

4.1 ปิเปต Bradford dye 1 ml ใส่ใน microtube

4.2 ปิเปตฮีโมโกลบิน 1 μl ลงใน microtube ที่มี Bradford dye (ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)

4.3 ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยใช้ Bradford dye เป็น blank

4.5 คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

5. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินที่แยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

5.1 นำโปรตีนฮีโมโกลบินที่แยกบริสุทธิ์ด้วย column Sephadex G-50 มาผสมกับ 2x solubilizing buffer ในอัตราส่วน 1: 1

5.2 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

5.3 Load protein marker และสารละลายฮีโมโกลบินตัวอย่างชนิดละ 1 well

5.4 ทำการแยกโปรตีนด้วย 13.5% T separating gel, 4% T stacking gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 120 V จนกระทั่งทำการแยกสมบูรณ์

5.5 ย้อมโปรตีนโดยใช้ 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250

5.6 ล้างสีย้อมออกโดยใช้ destain solution จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

6. การตัดฮีโมโกลบินที่แยกได้จากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยโดยใช้ กรดไฮโดรคลอริก 0.05 M

7. การทดสอบความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราของฮีโมโกลบินจระเข้สายพันธุ์ไทยด้วยวิธี Disc diffusion assay

ตารางที่ 5 เชื้อก่อโรคที่นำมาทดสอบกับฮีโมโกลบินที่แยกได้จากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย

Gram Positive	**Gram Negative**	**Fungal**
Staphylococcus aurease	*Escherichia coli*	*Candida albican*
Bacillus subtilis TISTR 008	*Pseudomonas aeruginosa*	
Bacillus pumilus TISTR 905	*Pseudomonas putida*	
Bacilus amyloliquefaciens TISTR 1045	*Salmonella typhi*	
Bacillus sphaericus TISTR 678		
Bacillus licheniformis TISTR 1010		

8. การทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

8.1 ผสม fragmented hemoglobin ที่ต้องการทดสอบกับ PBS และ 2% HRBC จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 30 นาที

8.2 นำไปปั่นที่ 2,500xg เวลา 5 นาที แล้วเก็บส่วน supernatant มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 nm

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

8.3 คำนวณหาค่า % hemolytic (ใช้ Triton X-100 เป็น Positive control)

9. การแยก Hemoglobin fragment โดยใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

9.1 เตรียมสารละลาย solvent A (0.1%TFA) และ solvent B (60% acetonitrile ใน 0.1%TFA)

9.2 กรองสารละลายเพปไทด์ด้วย filter membrane ขนาด 0.45 μm และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

9.3 เปิดเครื่องเข้าสู่โปรแกรมควบคุม ติดตั้ง Reservior buffer, Sample loop ปริมาตร 20 μl จากนั้น purge ไล่ฟองอากาศออกจาก line แล้วต่อ Column Jupiter 5u C4 ขนาด 250 x 4.60 mm ให้เรียบร้อย ทำการล้าง Stationary phase ด้วย บัฟเฟอร์ B ประมาณ 30 นาที equilibrate column ด้วย บัฟเฟอร์ A จนกระทั่ง base line คงที่

9.4 load และฉีดสารละลายเพปไทด์โดยใช้ Time program สำหรับการแยกดังนี้

นาทีที่	% solvent B
0-30	0-67
30-65	67-87
65	stop

9.5 เก็บ fraction ที่ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี disc diffusion assay และทำการศึกษาผลของ antimicrobial peptide ต่อเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscopy)

10. การศึกษาผลของ antimicrobial peptides ต่อเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscopy)

10.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

10.1.1 เตรียม cell starter ของเชื้อแบคทีเรีย

10.1.2 ปิเปต cell starter ปริมาตร 1 ml ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่มีอาหาร NB อยู่ 100 ml

10.1.3 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสามารถวัดค่า OD_{600} 0.5

10.1.4 ทำการ centrifuge ที่ 1,500 g เป็นเวลาประมาณ 10 นาที ในขั้นตอนนี้อาจทำการ centrifuge หลายๆรอบ จนกว่าจะได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียตามต้องการ

10.1.5 ทำการล้างเซลล์ด้วย 10 mM phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 ประมาณ 2 ครั้ง

10.1.6 จากนั้นทำการละลายเซลล์ด้วย 10 mM PBS ให้ได้ค่า OD_{600} ประมาณ 0.1

10.1.7 ปิเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร และสารละลายเปปไทด์ 100 ไมโครลิตร (1:1) ลงใน microtube ขนาด 1.5 ml จากนั้นทำการ incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

10.1.8 ทำการ fix เซลล์ด้วย 2.5% glutaraldehyde (w/v) ประมาณ 1 ชั่วโมง วางบน polycarbonate membrane

10.1.9 ล้างด้วย 10 mM PBS

10.2 ขั้นตอนการส่องด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

10.2.1 นำเซลล์บน membrane มาทำการ dehydrate ด้วย 30% ethanol, 50% ethanol, 70% ethanol และ 90% ethanol อย่างละ 1 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างด้วย 100% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาทีเช่นกัน

10.2.2 นำ membrane เข้าเครื่อง CPD จากนั้นทำการเคลือบทองลงบนผิวเซลล์

10.2.3 นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

11. ขั้นตอนการทำฮีโมโกลบินจระเข้อัดเม็ด

11.1 นำ intact hemoglobin และ fragmented hemoglobin ไปผสมกับตัวยาต่าง ๆ (basis, adjuvant, corrective and vehicle) ตามสูตรหรือต้นตำรับ

11.2 จากนั้นนำตัวยาทั้งหมดมาผสมกัน อาจผสมพร้อมกัน หรือผสมทีละอย่าง ๆ ใส่ binder เล็กน้อยให้เหนียวพอดี แล้วนำไปผ่านตะแกรงขนาด 16 mesh จะได้ granule

11.3 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C เป็นเวลา 20 นาที

11.4 จากนำไปผ่านตะแกรงขนาด 18 Mesh จะได้เป็นผงยา

11.5 จากนั้นนำเข้าเครื่องตอกเม็ดยา ขณะตอกเม็ดจะทำการสุ่มตัวอย่างมาทดสอบเป็นระยะ ๆ (5-10 เม็ดทุก ๆ 100 เม็ดที่ผลิตได้)

12. การทดสอบหาสารที่เหมาะสมกับฮีโมโกลบินในการอัดเม็ดยา

ยาเม็ดประกอบไปด้วยตัวยาสำคัญและสารช่วยต่างๆ เพื่อช่วยในกระบวนการผลิตยาส่วนประกอบที่สำคัญต่างๆนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดและประเภทของการผลิตยานั้นด้วย รวมทั้งปริมาณที่ใช้ที่แตกต่างกันอาจหมายถึง หน้าที่ที่แตกต่างกันของสารช่วยนั้นๆ ดั้งนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการ Vary ส่วนประกอบที่สำคัญของยาเม็ดได้แก่ สารเพิ่มปริมาณ (filler, dilutes), สารยึดเกาะ (binder), สารช่วยแตกตัว (disintegrant), สารหล่อลื่น (lubricant), สารช่วยไหล (glidant) เป็นต้น เพื่อให้ได้อัตราส่วนที่เหมาะสม ที่ทำให้ส่วน Intact

hemoglobin และ fragmented hemoglobin สามารถขึ้นรูปเป็นเม็ดได้ และยังคง activity มากที่สุด ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงสูตรของเม็ดยาแต่ละสูตร

ส่วนประกอบตัวยา	สูตรที่ 1 (1 เม็ด/ mg)	สูตรที่ 2 (1 เม็ด/ mg)	สูตรที่ 3 (1 เม็ด/ mg)	สูตรที่ 4 (1 เม็ด/ mg)	สูตรที่ 5 (1 เม็ด/ mg)
1. Hemoglobin + fragmented	40 mg	40 mg	50 mg	60+40 mg	250 mg
2. Avicel PH101	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg
3. Lactose	150 mg	150 mg	140 mg	140 mg	140 mg
4. Corn starch	15 mg	15 mg	15 mg	15 mg	15 mg
5. Binder	PVP (K30) 20 g ใน200 g ใน Alcohol	PVP (K30) 20 g ใน 200 g ในน้ำ	Sucrose 20 g ใน 200 g ใน น้ำ	gelatin 20 g ใน 200 g ใน น้ำ	แป้ง 20 g ใน 200 g ในน้ำ
ชั่งแมกนีเซียมสเตียเรต 1%					

hemoglobin และ fragmented hemoglobin สามารถขึ้นรูปเป็นเม็ดได้ และยังคง activity มากที่สุด ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงสูตรของเม็ดยาแต่ละสูตร

ส่วนประกอบตัวยา	**สูตรที่ 1 (1 เม็ด/ mg)**	**สูตรที่ 2 (1 เม็ด/ mg)**	**สูตรที่ 3 (1 เม็ด/ mg)**	**สูตรที่ 4 (1 เม็ด/ mg)**	**สูตรที่ 5 (1 เม็ด/ mg)**
1. Hemoglobin + fragmented	40 mg	40 mg	50 mg	60+40 mg	250 mg
2. Avicel PH101	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg
3. Lactose	150 mg	150 mg	140 mg	140 mg	140 mg
4. Corn starch	15 mg	15 mg	15 mg	15 mg	15 mg
5. Binder	PVP (K30) 20 g ใน200 g ใน Alcohol	PVP (K30) 20 g ใน 200 g ในน้ำ	Sucrose 20 g ใน 200 g ใน น้ำ	gelatin 20 g ใน 200 g ใน น้ำ	แป้ง 20 g ใน 200 g ในน้ำ
ชั่งแมกนีเซียมสเตียเรต 1%					