บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

วิธีดำเนินการดำเนินงานวิจัย มีขั้นตอนดังนี้

1) เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากโค
2) วิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ
3) จำแนกและวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีนคาลปาสเตติน
4) วิเคราะห์การแสดงออกของยีนและโปรตีนคาลปาสเตติน
5) วิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตติน
6) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่าทางสถิติในโคพื้นเมืองและโคลูกผสมกำแพงแสน

3.1 กลุ่มประชากรโคที่ศึกษา

1) โคพื้นเมืองไทย เลี้ยงด้วยระบบปล่อยแทะเล็มหญ้าตามธรรมชาติ ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี และจังหวัดนครปฐม จำนวน15 ตัว น้ำหนักมีชีวิต 198.43±11.23 กิโลกรัม เข้าฆ่าที่บริษัทประกอบบีฟโปรดักส์ จังหวัดราชบุรี และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2) โคกำแพงแสน โคลูกผสมสายเลือดชาโรเลส์ 50% บราห์มัน 25% และ โคพื้นเมืองไทย 25% เลี้ยงภายใต้ระบบการผลิตของสหกรณ์โคเนื้อกำแพงแสน จำนวน 15 ตัว น้ำหนักมีชีวิต 544.64±29.86 กิโลกรัม เข้าฆ่าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ทำการเก็บข้อมูลประจำตัวสัตว์ทั่วไป เช่น เบอร์สัตว์ เพศ สายพันธุ์ สี พื้นที่เก็บตัวอย่าง วัน เดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

3.2 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างกล้ามเนื้อและอวัยวะของโคพื้นเมือง เก็บจากโคจำนวน 3 ตัว ในส่วนกล้ามเนื้อลายชนิดต่างๆ ได้แก่ Rectus abdominis (RA), Semitendinosus (ST), Semimembranosus (SM), Transversus abdominis (TA), Longissimus troracis (LT) และ Longissimus dorsi (LD) และเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ สมอง หัวใจ ตับ ไต ม้าม ลำไส้ และ อัณฑะ ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5x0.5x0.5 เซนติเมตร แช่ใส่สารละลาย RNAlater® Solution (Ambion, US) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80°C สำหรับใช้วิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและการแสดงออกของยีนและโปรตีนคาลปาสเตตินคาลปาสเตติน

ตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกส่วน *Longissimus dorsi* เก็บจากโคพื้นเมืองจำนวน 15 ตัว และโคกำแพงแสนจำนวน 15 ตัว บริเวณซี่โครงที่ 12 ถึง 13 ภายใน 45 นาทีหลังฆ่า โดยทำการห่อด้วย

พลาสติกใส ใส่ลงในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง บ่มที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จนครบเวลา 24 ชั่วโมงหลังฆ่า ณ ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตัดชิ้นเนื้อให้ได้รูปแบบชิ้นเนื้อสเต็กที่มีความหนา 2.5 เซนติเมตร นำมาเก็บในถุงสุญญากาศไล่อากาศออกด้วยเครื่องบรรจุสุญญากาศ รุ่น VP-600A (Ramon, Germany) จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ใช้สำหรับวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินและค่าการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตติน

3.3 การวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

ทำการวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler shear force) ตามวิธีของ Boccard *et al.* (1981) โดยนำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกมาตัดแต่งเอาพังผืดและไขมันออก และตัดชิ้นเนื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า หนา 2.5 เซนติเมตร ใส่ในถุงสุญญากาศชนิดโพลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinyl chloride) ทำการไล่อากาศออกด้วยเครื่องบรรจุสุญญากาศ รุ่น VP-600A (Ramon, Germany) และนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส วัดอุณหภูมิใจกลางเนื้อด้วยเครื่องมือวัดอุณหภูมิใจกลางเนื้อแบบอิเลคโทรนิค รุ่น TTX 100 (Ebro, Germany) ให้ได้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส จึงนำถุงที่ใส่ชิ้นเนื้อไปลดอุณหภูมิโดยการใช้น้ำไหลผ่าน ให้ใจกลางเนื้อมีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส แล้วตัดชิ้นเนื้อตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อ ให้มีขนาด กว้างxยาวxหนา เท่ากับ 1x3x1 เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ชิ้น แล้วนำไปวัดค่าแรงตัดผ่านของเนื้อด้วยเครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ รุ่น 1011 (Instron, US) โดยกำหนดหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (kg/cm^2)

3.4 การจำแนกและวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีนคาลปาสเตติน

3.4.1 การออกแบบไพรเมอร์

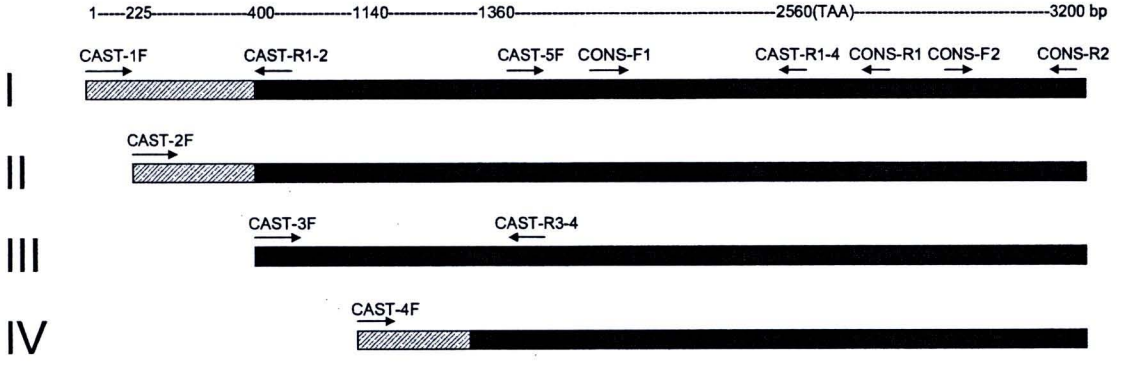
ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีนคาลปาสเตตินรูปแบบที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยการเปรียบเทียบเส้นยีนที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของโคสายพันธุ์ชาโรเล่ส์ (Charolais) ซึ่งปรากฏหมายเลข Accession number ตามลำดับ คือ Type I = NM_001030318, Type II = NM_174003, Type III = NM_001030319 และ Type IV = NM_001030320 ไพรเมอร์ที่ออกแบบมีลำดับนิวคลิโอไทด์ ดังต่อไปนี้

CAST-1F	5'-TCCAGCCTCCCTTCCAGGC-3'
CAST-2F	5'-ATGGCATTTGCAAGCTGGTGGT-3'
CAST-3F	5'-ATGAATCCCACAGAAGCCAAGG-3'
CAST-4F	5'-ATGGCCAGTTTCTATCGTCAAC-3'
CAST-5F	5'-CGTGGCAGAGGACGTGCCTC-3'

CONS-F1	5'-AAGGATAAAGACGGAAAACCA-3'
CONS-F2	5'-GTTGGGAGAGAAAGGAACTT-3'
CAST-R1-2	5'-CCTTGGCTTCTGTGGGATTCAT-3'
CAST-R3-4	5'-CAGCATCGTCTGGCACCATGC-3'
CAST-R1-4	5'-TTAACTTGTACTTTTTCCATCAGC-3'
CONS-R1	5'-TCAGAAGTCACCATCTACCC-3'
CONS-R2	5'-TTAGCAGCTCAAGAGGAGAC-3'

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์บนยีนคาลปาสเตตินแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์บนยีนคาลปาสเตติน ยีนคาลปาสเตตินสายย่อยที่ I, II, III และ IV มีบริเวณที่แปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' (เส้นสี) และมีบริเวณอนุรักษ์ทางด้านปลายด้าน 3' (สีทึบ) ลูกศร → แทน forward primer และ ← แทน reverse primer

3.4.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) โดยใช้น้ำยา TRIZOL® Reagent (Invitrogen, US) ตามวิธีการในคู่มือของบริษัท โดยบดเนื้อ 50-100 มิลลิกรัม ในน้ำยา TRIZOL® Reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นบดละเอียด (homogenizer; Ultratarrax, Germany) ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที บ่มตัวอย่างที่บดแล้วที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที ปั่นตัวอย่างที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติมไอโซพรอพิลแอลกอฮอล์ 0.5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปั่นตัวอย่างที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทิ้งส่วนน้ำ ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% แอลกอฮอล์ 1 มิลลิลิตร ปั่นตัวอย่างที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทิ้งตะกอนให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วิเคราะห์

ปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงอุตร้าไวโอเลต เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.3 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบย้อนกลับ

ทำการเพิ่มปริมาณยีนในรูปแบบ cDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR) โดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยาโดยใช้น้ำยา QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอ 200-400 นาโนกรัม 1XOneStep RT-PCR Buffer (Tris-Cl, KCl, $(NH4)_2SO_4$, 1.25 mM $MgCl_2$, DTT; pH 8.7 at 20°C), 400 mM each dNTP, Onestep RT-PCR Enzyme Mix 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ชนิดละ 1 mM และ RNase Inhhibitor 5 ยูนิต จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ รุ่น T-Personal (Biometra, US) กำหนดอุณหภูมิก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 55 องศาเซลเซียส ใช้เวลานาน 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ เป็นขั้นตอนการทำปฏิกิริยาที่เสร็จสมบูรณ์ โดยสายดีเอ็นเอผลผลิตควรมีขนาดเป้าหมายเมื่อใช้ไพรเมอร์แต่ละคู่ ดังนี้

1. CAST-1F/CAST-R1-2	ความยาวผลผลิต	330	คู่เบส
2. CAST-2F/CAST-R1-2	ความยาวผลผลิต	220	คู่เบส
3. CAST-3F/CAST-R3-4	ความยาวผลผลิต	1,310	คู่เบส
4. CAST-4F/CAST-R3-4	ความยาวผลผลิต	460	คู่เบส
5. CAST-5F/CAST-R1-4	ความยาวผลผลิต	950	คู่เบส
6. CONS-F1/CONS-R1	ความยาวผลผลิต	750	คู่เบส
7. CONS-F2/CONS-R2	ความยาวผลผลิต	320	คู่เบส

3.4.4 การแยกดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลด้วยกระแสไฟฟ้า

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเครื่องอิเล็กโทรฟิรีซิสบน 1% (w/v) เจลอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) โดยผสมดีเอ็นเอและ 6X DNA loading dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol in water) ที่มีสารเอทิเดียมโบรไมด์ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นจึงหยอดลงในหลุมบนเจลอะกาโรส แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA: 90 mM Tris, 90 mM Boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ จากนั้นตรวจสอบแถบ

ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีผ่านเครื่อง UV trans-illuminator โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas, US)

3.4.5 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรส

ทำการแยกสกัดผลผลิตพีซีอาร์จากชิ้นเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่แนะนำในคู่มือการใช้น้ำยาของบริษัท โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการใส่หลอดไมโครทิวป์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน spin column ที่วางอยู่ในหลอด collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตรใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและวัดค่าการดูดกลืนแสง

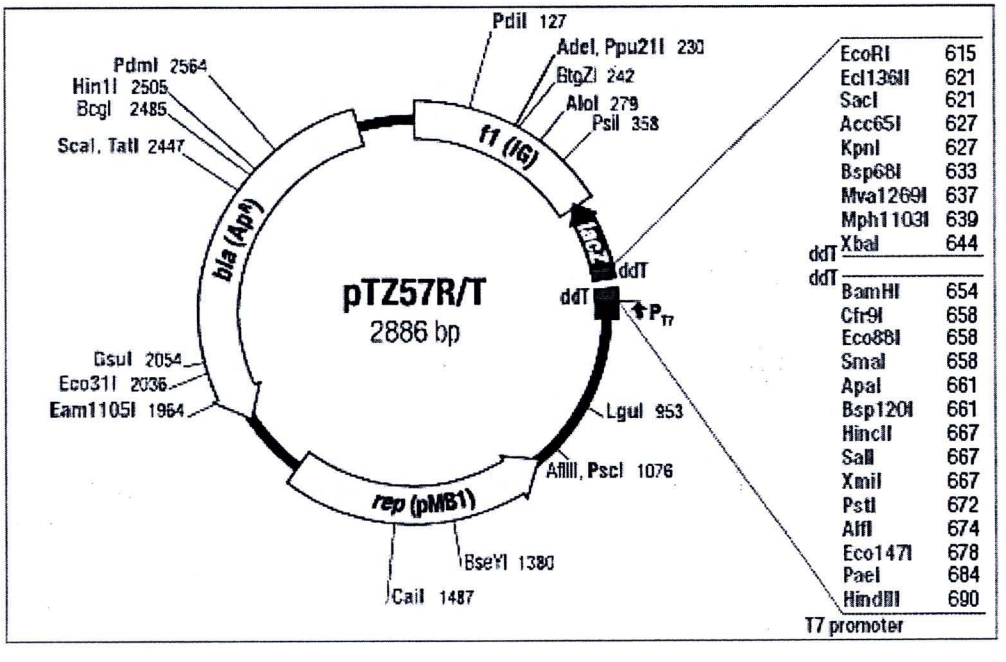
3.4.6 การโคลนยีนในพลาสมิดเวกเตอร์

3.4.6.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียคอมพิเทนต์

เตรียมเซลล์คอมพิเทนต์ (competent cell) ของเชื้อ *E.coli* DH5α ตามวิธีการของ Inoue *et. al.* (1990) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* DH5α ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB (20g Bacto tryptone, 5g Bacto yeast extract, 2ml of 5M NaCl, 2.5ml of 1M KCl, 10ml of 1M $MgCl_2$, 10ml of 1M $MgSO_4$) 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อทั้งหมด เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.3–0.4 จึงถ่ายเชื้อลงหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ตั้งหลอดทิ้งไว้บนน้ำแข็งประมาณ 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส และละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB (10mM PIPES, 55mM $MnCl_2$, 15mM $CaCl_2$, 250mM KCl) ที่แช่เย็น 16 มิลลิลิตร ต่อหลอด ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส จากนั้นเติมสารละลาย TB ที่แช่เย็น 4 มิลลิลิตรต่อหลอด เขย่าเบาๆจนตะกอนละลายจนหมด แล้วจึงค่อยๆเติมสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 7% ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งประมาณ 10 นาที แบ่ง competent cell ที่ได้ ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.6.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวคเตอร์

นำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T (ภาพที่ 3.2) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Canada) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของดีเอ็นเอผลผลิตต่อเวคเตอร์เท่ากับ 3 ต่อ 1 โมลาร์ โดยปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, pH 7.8 at 25°C) เวคเตอร์ pTZ57R/T 3 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ 150 นาโนกรัม เอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas,Canada) 5 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12–16 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.2 แผนที่ยีนของเวคเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas, Canada)

3.4.6.3 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์คอมพิเทนต์

การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์คอมพิเทนต์ (competent cell) ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et. al.*1989) ทำโดยนำ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตปฏิกิริยาที่ได้จากข้อ 3.4.6.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยการแช่ลงในน้ำแข็งประมาณ 2–3 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ luria–bertani broth (LB broth: 10g Bacto-tryptone, 5g yeast extract, 10g NaCl) 900 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปเกลี่ย (spread) บน

อาหารเลี้ยงเชื้อ luria–bertani agar (LB agar: 10g Bacto-tryptone, 5g yeast extract, 10g NaCl, 15g agar) ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น100 µg/ml, isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 mM และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 80 µg/ml จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12–16 ชั่วโมง

3.4.6.4 การคัดเลือกโคลนโดยเทคนิค blue/white screening

เนื่องจาก pTZ57R/T เป็นเวคเตอร์ที่มีส่วนของ α-subunit ของ *lacZ* ในขณะที่ *E.coli* มี Ω-subunit ของ *lacZ* โดยทั้ง 2 subunit จะรวมกันได้เป็นเอนไซม์ β-galactosidase เมื่อทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอผลผลิตเข้าไปในเวคเตอร์ จะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างส่วน α-subunit ของ *lacZ* จึงไม่เกิดการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase โดยการตรวจสอบทำได้โดยการใช้ X-gal เป็นซับสเตรตในกรณีที่ไม่มีดีเอ็นเอผลผลิตอยู่ในเวคเตอร์ การสร้าง α-subunit จะเกิดขึ้น ทำให้ได้เป็นเอนไซม์ β-galactosidase ไปทำการย่อย substrate X-gal ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็นสารสีฟ้าทำให้มองเห็นโคโลนีเป็นสีฟ้า ส่วนในกรณีที่มีดีเอ็นเอผลผลิตอยู่ในเวคเตอร์จะไม่เกิดการสร้าง β-galactosidase จึงไม่เกิดการย่อย X-gal โคโลนีที่ได้จึงเป็นสีขาว

3.4.6.5 การสกัดพลาสมิดลูกผสม

สุ่มเลือกโคลนที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin 100 µg/ml ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12–16 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที สกัดพลาสมิดลูกผสม โดยใช้ GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Canada) เติม resuspension buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อมาเติม lysis buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 4–6 ครั้ง แล้วจึงเติม neutralization buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 4–6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปตของเหลวทั้งหมดใส่ในหลอด GeneJet™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5–10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 0.8 %

3.4.6.6 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI (Fermentas, Canada) เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของยีนที่ได้ทำการสอดแทรกเข้าไปได้ โดยในปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิด 100 นาโนกรัม 1X buffer Y Tango™ - BSA (3.3 mM Tris-acetate pH 7.9 at 37°C, 10 mM magnesium acetate, 6.6 mM potassium aceteate, 0.01 mg/ml BSA) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI อย่างละ 3 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำปฏิกิริยามาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.0 % จากนั้นทำการสุ่มเลือกพลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วมีการสอดแทรกด้วยชิ้นส่วนของยีนในขนาดที่ต้องการ มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาลปาสเตตินที่ทำการโคลนไว้ในพลาสมิด pTZ57R/T ทำการวิเคราะห์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้

M13F 5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'

T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

3.4.8 การวิเคราะห์ข้อมูลรหัสพันธุกรรม

การรวมลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์ทำโดยใช้โปรแกรม CAP contig assembly program (Huang, 1992) ในโปรแกรมสำเร็จรูป BIOEDIT version 7.0.4.1 (Hall, 2007)

การแปลรหัสดีเอ็นเอเป็นกรดอะมิโน วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Translate Tool ในเซิร์ฟเวอร์ ExPASy Proteomics Server เข้าถึงได้ที่ http://expasy.org/tools/dna.html.

การเปรียบเทียบความเหมือนของยีนทั้งในระดับนิวคลิโอไทด์ (nucleotide sequence) และกรดอะมิโน (amino acid sequence) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 เข้าถึงได้ที่ http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ (Larkin *et al*, 2007)

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตติน

วิเคราะห์หาปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อและอวัยวะส่วนต่างๆ ของโคโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase Real-Time PCR (Real-Time RT-PCR)

การเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตตินทุกรูปแบบใช้ไพรเมอร์ CONS-F2 และ CONS-R2 ซึ่งเข้าจับบริเวณปลายด้าน 3' ของโดเมนที่ IV โดยมีความยาวของผลผลิตเป้าหมายที่ 320 คู่เบส

ยีนเบต้าแอคติน (β-actin) เป็นยีนอ้างอิง (internal control) ผลผลิตพีซีอาร์มีความยาวประมาณ 540 คู่เบส (Hoppe *et al.*, 1992) ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณ ได้แก่

ACTIN.5 5'- GCT CCG GCA TGT GCA A -3'

ACTIN.3 5'- AGG ATC TTC ATG AGG TAG T -3'

ทำการเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ชุดน้ำยา SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Germany) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอรวม 100 นาโนกรัม SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix (with RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor) 0.5 ไมโครลิตร 2X SYBR® Green Reaction Mix (with 0.4 μM of each dNTP และ 6 mM $MgSO_4$) 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ชนิดละ 10 μM และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง รุ่น Chromo4 Real Time PCR (MJ Research, US) กำหนดอุณหภูมิก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จำนวน 1 รอบ และ ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ จำนวน 40 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 55 องศาเซลเซียส ใช้เวลานาน 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 40 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ เป็นขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เสร็จสมบูรณ์

ทำการวิเคราะห์ค่า C_T (cycle threshold) และ ค่า E (amplification efficiency) โดยใช้โปรแกรม MJ Opticon Monitor™ Analysis Software version 3.1.32 (MJ Geneworks, US)

ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตดินที่เนื้อเยื่อเป้าหมายเทียบกับเนื้อเยื่ออ้างอิง คำนวณได้จากสูตรของ Pfaffl (2004)

$$\text{ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta C_P \text{ target (control - sample)}}}{(E_{Ref})^{\Delta C_P \text{ Ref (control - sample)}}}$$

โดยที่ E (amplification efficiency) แทน ประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณยีน

C_P (cycle threshold at crossing point) แทน รอบของพีซีอาร์ ณ.จุดตัดกราฟที่กำหนด

Target แทน เนื้อเยื่อเป้าหมาย

Ref แทน เนื้อเยื่ออ้างอิง (ในการทดลองนี้ใช้กล้ามเนื้อสันนอก)

Control แทน ยีนเบต้าแอคติน เป็น internal control

Sample แทน ยีนคาลปาสเตดิน

3.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตติน

3.6.1 การสกัดโปรตีน

ทำการสกัดโปรตีนในเอนไซม์กลุ่มคาลเปน ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Delgado *et al.* (2001) โดยชั่งตัวอย่างเนื้อ 2.5 กรัม ใส่หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร (Beckman, US) บดให้ละเอียดใน extraction buffer 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นบดละเอียด (homogenizer; Ultratarrax, Germany) ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที โดยในระหว่างการบดให้หลอดตัวอย่างอยู่ในน้ำแข็งเสมอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง รุ่น Avanti® J-E Centrifuge (Beckman Coulter, US) ที่ความเร็ว 37,500 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนบนใส่หลอดเซนติฟิวส์อันใหม่และนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนต่อไป

3.6.2 การวัดความเข้มข้นโปรตีน

เจือจางน้ำยาวัดโปรตีน Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, US) ในสัดส่วนน้ำยาวัดโปรตีน 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 4 ส่วน จากนั้นทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยเจือจาง bovine serum albumin (BSA) (Fluka, US) ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยาวัดโปรตีนที่เจือจางแล้ว 500 ไมโครลิตร สำหรับการวัดตัวอย่างโปรตีน ให้นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยาวัดโปรตีนที่เจือจางแล้ว 500 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น BioPhotometer plus (Eppendorf, Germany) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A_{595}) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณสมการถดถอยเชิงเส้น $y = ax \pm b$ โดยค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA และทำการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างได้จากสมการถดถอยเชิงเส้นของกราฟมาตรฐานตามลำดับ

3.6.3 การแยกโปรตีนบนเจลโพลิอะคริลาไมด์ด้วยกระแสไฟฟ้า

การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Sodium dodesyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) ทำตามวิธีของ Laemmli (1979) โดยใช้ชุดเจลเล็กขนาด 8x10x0.075 เซนติเมตร รุ่น mini-PROTEAN ® 3 Cell (BioRad, US)

ทำการเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์โดยให้ความเข้มข้นของเจลชั้น separating gel มีความเข้มข้น 12.5% และเจลชั้น stacking gel มีความเข้มข้น 4% ตามลำดับ (Delgado *et al.*, 2001) โดยใช้สารละลาย 30% acrylamide:bis (Serva, US) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับการแยกเอนไซม์คาลปาสเตตินด้วยเทคนิค SDS-PAGE

สารเคมี	12.5 % separating gel (มิลลิลิตร)	4 % stacking gel (มิลลิลิตร)
น้ำกลั่น	3.2	6.1
1.5 M Tris/HCl, pH 8.8	2.5	-
0.5 M Tris/HCl, pH 6.8	-	2.5
30% acrylamide/bis solution (29:1)	4.2	1.3
10% SDS	0.10	0.10
10% APS	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01
ปริมาตรรวม (มิลลิลิตร)	10	10

ทำการผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน โดยใส่ ammonium persulphate (APS) และ N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine (TEMED) เป็นตัวสุดท้าย พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ หลังจากเทชั้น separating gel ใช้ปิเปตเติม isopropanol ลงบนชั้น separating gel ทันที เพื่อทำให้ผิวหน้าด้านบนเรียบ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเท stacking gel แล้วใส่หวี ปล่อยไว้อีกประมาณ 2 ชั่วโมง จนเจลแข็งตัว

นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ผสมกับ loading buffer (95% Formamide, 20 mM EDTA, pH 8.0, 0.05% Bromophenol blue, 0.05% Xylene cyanol) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำการหยอดโปรตีนตัวอย่างหลุมละ 60 ไมโครกรัม ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ 50 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที โดยใช้ running buffer (192mM Glycine, 25mM Tris, 0.1% SDS) เป็นตัวนำกระแสไฟฟ้า เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำเจลไปย้อมสีใน straining buffer (0.1% Coomassie R250, 10% acetic acid, 40% methanol) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกใน destraining buffer (20% methanol, 10% acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำเจลที่ได้ไปถ่ายรูปเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วยเครื่องถ่ายรูปเจล รุ่น gene genius bio imagine system (Syngene, UK) และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนที่ปรากฏด้วยโปรแกรม GeneTool (Syngene, UK) โดยเทียบกับโปรตีนอัลบูมิน (bovine serum albumin) ขนาดโมเลกุล 66.78 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนมาตรฐาน PageRuler Plus Prestained Protein (Fermentas, Canada) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนขนาด 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 และ 11 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot analysis

ทำการย้ายโปรตีนจากเจลโพลิอะคริลาไมด์ลงสู่แผ่นเมมแบรนชนิด Hybond-P PVDF (Amersham, US) ด้วยเครื่อง Mini Trans-Blo® Electrophoretic Transfer Cell (Biorad, US) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ 350 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ transfer buffer (192mM Glycine, 25mM Tris, 20% Methanol) เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นเมมแบรนมาแช่ใน blocking solution (0.05M Tris, 3 % nonfat milk) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นเมมแบรนแช่ในแอนติบอดีตัวที่ 1 คือ monoclonal anti-bovine calpastatin domain IV antibody, clone 1F7E3D10 (Sigma, US) ที่เจือจางด้วย blocking solution ในสัดส่วน 1:5,000 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเมมแบรนมาล้างด้วย washing solution จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และจึงนำเมมแบรนมาแช่ในแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่ติดฉลากเอนไซม์ horseradish peroxidase คือ anti-mouse IgG-peroxidase antibody (Roche, Germany) ที่เจือจางด้วย blocking solution ในสัดส่วน 1:600 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างแผ่นเมมแบรนด้วย washing solution (0.05M Tris, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, 0.05 % Tween 20) จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยใส่สับสเตรท TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine; Sigma, US) ซึ่งมีความจำเพาะกับเอนไซม์ horseradish peroxidase เพื่อให้เห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีน ทิ้งไว้นาน 5-30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ นำแผ่นเมมเบรนไปถ่ายรูปด้วยเครื่องถ่ายรูปเจล รุ่น gene genius bio imagine system (Syngene, UK)

3.7 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของคาลปาสเตติน

โดยดัดแปลงวิธีการมาจากรายงานของ Geesink and Koohmaraie (1999) ตามลำดับดังนี้

3.7.1 การสกัดโปรตีน

ชั่งตัวอย่างเนื้อจำนวน 2 กรัม เติม extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 10 mM EDTA, 0.05%(v/v) β-mercaptoetanol, 6 mg/L leupepten, 100 mg/L ovomucoid, 2 mM phenylmethysulfony fluoride) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บดด้วยเครื่อง homogenizer (Ultratarrax, Germany) ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที โดยในระหว่างการบดให้หลอดตัวอย่างเนื้ออยู่ในน้ำแข็งเสมอ ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง รุ่น Avanti® J-E Centrifuge (Beckman Coulter, US) ที่ความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เก็บสารละลายส่วนใสกรองผ่านใยแก้ว บันทึกปริมาตรสารที่กรองได้ หลังจากนั้นทำการ dialysis ด้วยถุง dialysis ขนาด cut-off 10 kDa (Pierce, US) ใน dialysis buffer (40mM Tris-HCl pH 7.35, 5mM EDTA, 0.05%(v/v) β-mercaptoetanol) 200 มิลลิลิตร นาน 12-16 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็สารละลายส่วนใสที่เป็นส่วนของโปรตีนรวม (crude extract) นำไปแยกเอนไซม์คาลปาสเตตินด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีทันที

3.7.2 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

ทำการบรรจุ DEAE-Sephacel™ (GE Healthcare, Sweden) 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร Equilibrate คอลัมน์ด้วย elution buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.35, 0.5 mM EDTA, 0.05% (v/v) β-mercaptoetanol) 50 มิลลิลิตร เติม crude extract protein ลงบนผิวของเจล DEAE-Sephacel ที่ทำการด้วยความระมัดระวัง ปล่อยให้ crude extract protein เคลื่อนที่เข้าไปในเจลจนหมด โดยอาศัยแรงโน้มถ่วงของโลก หลังจากนั้นทำการชะเอาโปรตีนคาลปาสเตติน ออกจาก DEAE-Sephacel column ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 200 mM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยทิ้งสารตัวอย่างส่วนแรก 3 มิลลิลิตร และเก็บเฉพาะสารตัวอย่างส่วนหลัง 17 มิลลิลิตร

3.7.3 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของโปรตีน

นำตัวอย่างที่ชะออกจากคอลัมน์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นแช่น้ำแข็งนาน 10 นาที แล้วทำการตกตะกอนโปรตีนที่เสียสภาพโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสซึ่งเป็นเอนไซม์คาลปาสเตตินในน้ำแข็ง จากนั้นทำการเตรียมปฏิกิริยา (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 การเตรียมปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตติน

ปฏิกิริยา	m-calpain (µl)	ตัวอย่าง (µl)	5 mM $CaCl_2$ reaction mix (µl)	10 mM EDTA reaction mix (µl)	น้ำกลั่น (µl)	รวม (µl)
ควบคุม 1	150	-	150	-	100	400
ควบคุม 2	-	100	-	150	150	400
ทดสอบ	150	100	150	-	-	400

บ่มหลอดควบคุม 1 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดทดลองทุกปฏิกิริยามาบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 5% trichloroacetic acid ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) คำนวณค่าการทำงานของคาลปาสเตตินเป็นหน่วยเอนไซม์ต่อเนื้อ 1 กรัม (unit/g of meat) โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

ค่าการทำงานของคาลปาสเตติน = A_{280}หลอดควบคุม 1- (A_{280}หลอดทดสอบ - A_{280}หลอดควบคุม 2)

กำหนดให้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตติน 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณคาลปาสเตตินที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอ็มคาลเปน (m-calpain) 1 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 60 นาที

3.8 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการเก็บรวบรวมข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis Software (SAS®, US) โดย

ค่าเฉลี่ยของข้อมูล (Mean)วิเคราะห์จากสมการดังนี้

$$X = \frac{\sum Xi}{n}$$

เมื่อ X แทน ค่าเฉลี่ย

$\sum Xi$ แทน ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด

n แทน ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) วิเคราะห์จากสมการดังนี้

$$S = \sqrt{\frac{n\sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}}$$

เมื่อ S แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่าง

$(\sum X)^2$ แทน ผลรวมของข้อมูลทั้งหมดยกกำลังสอง

$\sum X^2$ แทน ผลรวมของข้อมูลแต่ละตัวอย่างยกกำลังสอง

n แทน จำนวนสมาชิกในกลุ่มตัวอย่าง

การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม โดยใช้สูตร Independent T-test

$$t = \frac{X1 - X2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

เมื่อ t แทน ค่าสถิติที่ใช้พิจารณาใน t-distribution

$X1$ แทน ค่าเฉลี่ยตัวอย่างกลุ่มที่ 1

X2 แทน ค่าเฉลี่ยตัวอย่างกลุ่มที่ 2

S^1_2 แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ 1

S^2_2 แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ 2

n_1 แทน ขนาดตัวอย่างกลุ่มที่ 1

n_2 แทน ขนาดตัวอย่างกลุ่มที่ 2

การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ที่สนใจโดยใช้ Pearson Correlation โดยค่า correlation coefficient คำนวณได้จากสูตร

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{(n-1)s_x s_y},$$

เมื่อ r แทน ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

i แทน ตัวอย่างลำดับที่ 1, 2, 3,..., n

x แทน พารามิเตอร์ที่หนึ่ง

y แทน พารามิเตอร์ที่สอง

S แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

n แทน ขนาดตัวอย่าง