

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ในการวิจัย

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อุปกรณ์สำหรับวิจัย

1. Sonicator Bath (Cole-Parmer, รุ่น 8893)
2. Centrifuge (ยี่ห้อ Hermle รุ่น Z 323 K)
3. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CH-2)
4. UV Spectrophotometer (ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1601)
5. Mini-Protean II Cell (Bio-Rad)
6. Tran-Blot Semi-Dry (Bio-Rad)

สารเคมี

1. Dodecylbenzenesulfonic Acid Sodium Salt ยี่ห้อ Fluka
2. Neutral Red ยี่ห้อ Fluka
3. 1-Chloro-2, 4-Dinitrobenzene ยี่ห้อ Fluka
4. L-Glutathione Reduced ยี่ห้อ Fluka
5. 5, 5'-Dithiobis-2-Nitrobenzene ยี่ห้อ Fluka
6. Acetylthiocholine ยี่ห้อ Fluka
7. Protein Marker ยี่ห้อ Bio-Rad
8. Acrylamide, 99.9% ยี่ห้อ Bio-Rad
9. Bis N, N'-Methylene-Bis-Acrylamide ยี่ห้อ Bio-Rad
10. TEMED N, N, N', N'-Tetra-Methyl-Ethylenediamine ยี่ห้อ Bio-Rad
11. Glycine ยี่ห้อ Bio-Rad

ตัวอย่างสัตว์วิจัย

1. การเตรียมน้ำทะเลสำหรับวิจัย

กรองน้ำทะเลด้วยถุงกรองน้ำเพื่อกำจัดของแข็งแขวนลอย และวัดความเค็มด้วยเครื่องวัดความเค็ม (Refractometer) จากนั้นจึงปรับความเค็มของน้ำทะเลให้มีความเค็มที่ 30 ppt ด้วยน้ำกลั่นและเกลือแกง

2. การทดสอบ เปรียบเทียบระยะเวลาการพักของสัตว์ในการวิจัย

ทดสอบระหว่างปูม้าที่ระยะเวลาการพัก 0 วัน กับปูม้าที่ระยะเวลาการพักที่ 3 วัน ทั้งคู่ให้อาหาร เก็บตัวอย่างเลือด เพื่อวัดการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ วัดความเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม และวัดปริมาณฮีโมไซยานิน

3. การเตรียมสัตว์ก่อนการทดลอง

นำปูม้าเพศผู้ (เพื่อลดผลกระทบในช่วงระยะสืบพันธุ์ ที่อาจเกิดกับปูม้า เพศเมีย) ขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 3-4 เซนติเมตร มาเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ppt เพื่อปรับสภาพของปูม้า ให้คุ้นเคยกับสภาวะห้องปฏิบัติการ โดยให้อากาศตลอดเวลาเป็นเวลา 3 วัน และงดอาหารก่อนนำมาทำการทดลอง 1-2 วัน เพื่อลดการรบกวนของกระบวนการย่อยอาหาร และลดการขับถ่ายของเสีย ซึ่งอาจมีผลต่อผลการทดลอง

การดำเนินการวิจัย

นำปูม้าเพศผู้ที่ผ่านการเลี้ยงปรับสภาพแล้ว นำมาทดสอบโดยเลี้ยงในภาชนะแก้วทรงกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นิ้ว ภายในบรรจุด้วยน้ำทะเลที่เตรียมไว้ ปริมาตร 4 ลิตร มีความเข้มข้นของ LAS ต่างกัน คือ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความหนาแน่นของปูม้า 1 ตัว ต่อ 1 ภาชนะทดลอง โดยให้อากาศตลอดการทดลอง ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองใช้ปูม้าจำนวน 3 ตัว รวมปูม้าที่ใช้สำหรับทดสอบทั้งหมด 321 ตัว

วิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่างเลือด

1.1 ตัวอย่างเลือดสำหรับการวิเคราะห์ความเสถียรของเยื่อหุ้มไลโซโซม การวัดการทำงานของเอนไซม์ ความเข้มข้นของโปรตีนในเลือด และปริมาณของฮีโมไซยานินด้วยวิธี Electrophoresis

เก็บเลือดจากปูม้า โดยแทงเข็มลงผ่านเยื่อได้เปลือกคลุมหัว (Carapace) ตรงบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 จากนั้นผสมเลือดตัวอย่างกับสารละลายกันเลือดแข็งตัว (Anticoagulant) ในอัตราส่วน 1: 1 (ปริมาตร/ ปริมาตร) และเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในกล่องน้ำแข็งตลอดเวลาจนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

1.2 ตัวอย่างเลือดสำหรับการวัดความเข้มข้นของฮีโมโกลบินด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

เก็บเลือดจากปฏีมา โดยวิธีเดียวกับข้อ 1.1 และเก็บเลือดในหลอดทดลอง โดยไม่ต้องผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดในกล่องน้ำแข็งตลอดเวลา จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

2. การเตรียมตัวอย่างตับอ่อน สำหรับวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์

นำตับอ่อนประมาณ 1 กรัม (น้ำหนักเปียก) มาบดในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด เติม 50 mM Tris-HCl Buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมา Sonicate ด้วยเครื่อง Sonicator Bath 3 ครั้ง ๆ ละ 15 วินาที เมื่อครบตามเวลา นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 30 นาที และปีเปิดของเหลวด้านบน (Supernatant) ไปวิเคราะห์ทันที

3. การเตรียมตัวอย่างเหงือก สำหรับวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์

นำเหงือกประมาณ 1 กรัม ใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างเดียวกับตัวอย่างตับอ่อนในข้อ 3.

การวิเคราะห์เอนไซม์ (Enzyme Assay)

1. การวัดการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส (Regoli & Principato, 1995)

นำตัวอย่างเลือดจากข้อ 1.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย 100 mM Sodium Phosphate Buffer pH 7.0 ปริมาตร 850 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 33% ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร โดยเครื่อง UV Spectrophotometer จับเวลาโดยเริ่มอ่านค่าตั้งแต่ 30 วินาทีแรกและอ่านค่าทุก ๆ 15 วินาที ทำการบันทึกผล และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์

ในส่วนตัวอย่างตับอ่อน และเหงือก ทำซ้ำขั้นตอนเดิม เปลี่ยนจากตัวอย่างเลือดข้อ 1.1 เป็นตัวอย่างตับอ่อนข้อ 2. และตัวอย่างเหงือกข้อ 3. ปริมาตรตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร

2. การวัดการทำงานของของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอสทรานเฟอเรส (Astley, Meigh, Glegg, Braven, & Depledge, 1999)

นำตัวอย่างเลือดจากข้อ 1.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 100 mM Glutathione (GSH) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย 200 mM Phosphate Buffer pH 7.9 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย 20 mM 1-Chloro-2, 4-Dinitrobenzene (CDNB) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร จับเวลาโดยเริ่มอ่านค่าตั้งแต่ 30 วินาทีแรก และอ่านทุก ๆ 15 วินาที บันทึกค่า และนำ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

ในส่วนตัวอย่างตับอ่อน และเหงือก ทำซ้ำขั้นตอนเดิม เปลี่ยนจากตัวอย่างเลือดข้อ 1.1 เป็นตัวอย่างตับอ่อนข้อ 2. และตัวอย่างเหงือกข้อ 3. ปริมาตรตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร

3. การวัดการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Pfeifer, Schiedek, & Dippner, 2005)

นำตัวอย่างจากข้อ 1.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 0.01 M 5, 5'-Dithiobis-2-Nitrobenzene (DTNB) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ 0.02 M Phosphate Buffer 330 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 0.1 M Acetylthiocholine ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร เริ่มอ่านค่าการตั้ง 30 วินาทีแรก และอ่านซ้ำทุก ๆ 15 วินาที บันทึกค่า และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

ในส่วนตัวอย่างตับอ่อน และเหงือก ทำซ้ำขั้นตอนเดิม เปลี่ยนจากตัวอย่างเลือดข้อ 1.1 เป็นตัวอย่างตับอ่อนข้อ 2. และตัวอย่างเหงือกข้อ 3. ปริมาตรตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ Lysosomal Membrane Stability ด้วยวิธี Neutral Red Retention (Brown et al., 2004)

นำตัวอย่างเลือดจากข้อ 1.1 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย Crab Physiological Saline ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บนกระชกสไลด์ ผสมให้เข้ากันและนำไปพักใน Humidity Chamber เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Neutral Red ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และปิดด้วยกระชกปิดสไลด์ นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยส่องดูการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 15 นาที เพื่อสังเกตจากการติดสีแดงของไลโซโซม 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไลโซโซมทั้งหมด บันทึกเวลาที่ได้

ฮีโมไซยานิน

1. การวัดความเข้มข้นฮีโมไซยานิน (Hemocyanin Concentration) (Engel, Brouwer, & Mercaldo-Allen, 2001)

นำตัวอย่างเลือดจากข้อ 1.2 ที่ปล่อยให้แข็งตัวมาบดด้วย Hand Homogenizer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนนำมาเจือจางด้วย 50mM Tris-CaCl₂ Buffer โดยใช้อัตราส่วน 1: 15 (พลาสมา: บัฟเฟอร์) และนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และ 334 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของฮีโมไซยานินดังสมการ

$$A = XBC$$

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืนแสง

X* = Extention Coefficient (E)

B = Path Length (cm)

C = ความเข้มข้นของสารที่หา

* $E_{280\text{nm}} = 13.0$ และ $E_{334\text{nm}} = 2.30$

2. Electrophoresis

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเลือดจากข้อ 1.1 ที่ทราบค่าปริมาณโปรตีนแล้วมาเจือจางด้วยสารละลายกันเลือดแข็งตัว จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ผสมกับ 2X Treatment Buffer ในอัตราส่วน 1: 1 นำตัวอย่างไปต้ม เป็นเวลา 3 นาที

2.2 ขั้นตอนการทำ SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis

เตรียมแผ่นเจลอะคิลาไมด์ โดยมีความเข้มข้นของส่วน Separating Gel 10 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของส่วน Stacking Gel 4 เปอร์เซ็นต์ นำมาประกอบในชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มี Tank Buffer อยู่ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดจากข้อ 10.1 มาใส่ลงในช่องเจล (โดยแต่ละช่องต้องมีปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์กระแสไฟฟ้าขนาด 120 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีเคลื่อนลงไปถึงส่วน Separating Gel จึงเปลี่ยนความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีเคลื่อนถึงปลายแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลที่ได้ ย้อมด้วยสี Coomassie Blue 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย Destain I และ Destain II เป็นเวลา 1 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ สังเกตแถบโปรตีนสีฟ้าที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. การวัดปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างเลือดจากข้อ 1.1 ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ผสมกับ สี Coomassie Brilliant Blue G 250 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ได้ นำมาเทียบกราฟมาตรฐาน

2. การทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน

นำสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ผสมกับ สี Coomassie Blue ปริมาตร

5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้สถิติแบบ One Way Anova ใช้โปรแกรม SPSS Version 10 ในการวิเคราะห์ โดยใช้ LSD