

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

- บ่อขนาด 1 x 2 x 0.5 ตารางเมตร
- ตะแกรงจับปลา
- เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
- ถังใส่ปลา
- หนู ICR mouse จำนวน 1 ตัว
- Micro centrifuge (HERMLE Z233 MK-2)
- Homogenizer
- HisTrap FF crude column 1 มิลลิลิตร (Amersham Pharmacia Biotech)
- $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เคลือบอยู่ที่ผิวเรซิน
- Microplate 96 Wells
- Microplate Reader (Versamax)
- Autopipette and Tip
- Forceps
- Conical tube
- Vortex
- Appendroff Tube
- Electrophoresis, Chamber, Power supply (BIO-RAD)

สารเคมี

- Tris-HCl buffer
- $\text{CdNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Imidazol
- Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF)
- Sodium Phosphate Buffer
- 0.85% Normal Saline

- Complete Adjuvant & Incomplete Adjuvant
- Tris Base
- Phosphate Buffer Saline (PBS)
- Acrylamide
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
- Ammonium Persulphate (APS)
- Bromphenol Blue
- Comassie Blue
- น้ำกลั่น
- Cobalt Chloride (CoCl_2)
- Diaminobenzidine Tetra-Hydrochloride (DAB)
- Hydrogenperoxide (H_2O_2)
- Clorox

วิธีการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่

- การสกัดโปรตีน Cd-Binding Protein และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
- การผลิตและทดสอบคุณสมบัติของโพลี โคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd-Binding Protein
- การใช้โพลี โคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd-Binding Protein สํารวจการแสดงออกของ Cd-Binding Pprotein ในปลาทะเลที่จับโดยใช้อวนลากแผ่นตะเฒ่ บริเวณเขตนกมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและเขตนกมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง

ส่วนที่ 1 การสกัดโปรตีน Cd-Binding Protein และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized Metal ion Affinity Chromatography

1.1 การฉีดกระตุ้นปลากระพงขาวด้วยสารแคดเมียมเพื่อชักนำให้สร้าง Cd-Binding Protein (ดัดแปลงจาก Honda et al., 2005)

1. เลี้ยงปลากระพงขาว 15 ตัว ขนาด 80-100 กรัม แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมไม่ได้ฉีดสาร กลุ่มควบคุมฉีดบัฟเฟอร์ (50 mM Sodium Phosphate Buffer, pH 7.4) และกลุ่ม

ทดลอง (n=5) กลุ่มทดลองฉีด $\text{CdNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ที่ละลายใน 50 mM Sodium Phosphate Buffer, pH 7.4 ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ใช้ 10 % จากค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 20.12 ในปลากระพงขาวที่ได้รับสารแคะเมียมจากการทดลองของ Thophon et al., 2003 บริเวณใต้ท้อง (Intraperitoneal) ทั้งไว้ 48 ชั่วโมง

1.2 การสกัดโปรตีน Cd-Binding Protein (ดัดแปลงจาก Honda et al., 2005)

1. ผ่าท้องปลากระพงขาวเก็บตับปลา ชั่งน้ำหนักตับ เพื่อทำการสกัด โปรตีน

Cd-Binding Protein

2. นำตับมาสกัดโดย Homogenized (35 % w/v) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่บรรจุด้วย 0.1 mM PMSF, 0.5 mM DTT และ 150 mM NaCl

3. จากนั้นนำมา Centrifuge ที่ 15,000 X g นาน 90 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. เก็บโปรตีนส่วนบน (Supernatant) มาทำการ Purification เพื่อให้ได้ Cd-Binding Protein ที่บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography

ขั้นตอนการสกัดโปรตีน Cd-binding protein

สกัดตับปลากะพงขาว (35 % W/V) ทำให้เป็นชิ้นเล็กๆ



เติมสาร 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่บรรจุด้วย 0.1 mM PMSF,
0.5 mM DTT และ 150 mM NaCl



ปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer (นาน 1 นาที ในน้ำแข็ง)



นำไป centrifuge ที่ 15,000 Xg นาน 90 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



เก็บเฉพาะ โปรตีนส่วนบน (Supernatant)



ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography

1.3 การทำโปรตีน Cd-binding protein ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized metal ion affinity chromatography (คัดแปลงจาก Honda et al., 2005)

1. ล้าง HiTrap FF Crude Column ที่มี $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เคลือบอยู่ที่ผิวเรซิน ด้วยน้ำกลั่นออก 3-5 คอลัมน์ เพื่อให้เอทานอลที่บรรจุในคอลัมน์หลุดออกไปโดยใช้ syringe
2. ปรับสมดุลด้วย 10 มิลลิลิตร Tris HCL buffer, pH 7.4 10 คอลัมน์
3. โหลดโปรตีน Cd-Binding Protein ที่สกัดจากตับปลากระพงขาว ลงในคอลัมน์ โปรตีนที่มี Cd^{2+} จะเข้าไปจับกับ Ni^{2+} ที่เคลือบอยู่บนผิวของเรซิน
4. ชะโปรตีน Cd-Binding Protein ที่มีจับกับ Ni^{2+} ด้วย 10 Volume ของ 5, 50, 100, 250 และ 500 mM imidazol เก็บแฟรกชันที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ความเข้มข้น 10 แฟรกชัน

1.4 การทดสอบคุณลักษณะของ Cd-Binding Pprotein

1.4.1 การหาปริมาณโปรตีน (Protein Determination) (Bradford, 1976)

ทำการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง เพื่อนำค่าความเข้มข้นโปรตีนมาคำนวณก่อนนำไปใช้ในการทดสอบ Gel Electrophoresis

1. นำโปรตีนมาทำการเจือจางตัวอย่างในอัตราส่วนที่กำหนดไว้
2. นำตัวอย่างใส่ใน 96 Well Plate 20 ไมโครลิตร ในหลุมแรกของแต่ละความเข้มข้น
3. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่าง 2 เท่า ในไมโครลิตร หลุมถัดไป (2-Fold Dilution) ด้วย PBS จนครบแถว
4. นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานของ Bio-Rad มาทำเช่นเดียวกับสารตัวอย่างให้มี 3-5 ความเข้มข้น
5. เติม Dye Reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในทุกหลุม Incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
6. ครบเวลา นำ Microplate ที่มีทั้งตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานโปรตีนของ Bio-Rad มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ช่วง 595 นาโนเมตร
7. นำค่าการดูดกลืนแสง O.D. (Optical Density) ที่เครื่องอ่านได้ มาสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานจากการคำนวณค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) กับค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ของโปรตีนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Excel ให้ได้สมการ Linear Regression เพื่อนำไปคำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง ซึ่งจะนำไปใช้ในการหาปริมาณโปรตีนที่จะใช้สำหรับ Load ลงบน 15% SDS-PAGE

1.4.2 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1. ประกอบแผ่นกระจกของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำไปวางบนที่ตั้ง (Stand) ที่ใช้แยก หรือในกรณีที่เป็นชุดประกอบสำเร็จให้ปฏิบัติตามคู่มือการใช้ เตรียมส่วนผสมของสารละลายอะคริลาไมด์โดยให้ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในส่วนของ Separating Gel เท่ากับ 15% เจลที่เตรียมควรมีความหนาตั้งแต่ 0.75 มิลลิเมตร

2. เทสารละลายอะคริลาไมด์ในช่องระหว่างแผ่นกระจกของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเหลือส่วนของ Stacking Gel ไว้ประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นเติมไอโซบิวทานอล (Isobutanol) หรือน้ำกลั่นบนเจลเพื่อป้องกันออกซิเจนยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันของอะคริลาไมด์เจล แล้ววางเจลในแนวตั้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง

3. เมื่อครบเวลา เทสารละลายด้านบนออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง และซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชู

4. เตรียมสารละลายอะคริลาไมด์ในส่วนของ Stacking Gel เท่ากับ 4% เทส่วนผสมของ Stacking Gel ลงบน Separating Gel ใส่ซี่หวี (Comb) ลงไปเพื่อให้เกิดช่องว่างที่จะเติมตัวอย่าง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที

5. เตรียมตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน (Standard Protein) โดยผสมตัวอย่าง (CYPIA หรือ HSP70) กับ Sample Buffer และนำโปรตีนมาตรฐานไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

6. หลังจาก Stacking Gel แข็งตัวค่อย ๆ นำหัวออกจากเจล แล้วล้างช่องเดิมตัวอย่างทันทีด้วยน้ำกลั่น เพื่อกำจัดเจลส่วนเกินที่ไม่แข็งตัวออกไป แล้วประกอบเจลลงในชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วเติมสารละลายอิเล็กโตรโฟรีซิสบัฟเฟอร์ (Electrophoresis Buffer) ในช่องด้านบนของชุดอุปกรณ์ให้สารละลายท่วมช่องใส่ตัวอย่าง

7. เติมตัวอย่างในช่องเดิมตัวอย่างของเจลด้วยเข็มฉีดยาขนาดเล็ก (Micro Syringe) หรือ ปิเปตขนาดเล็ก (Micro Autopipette) โดยใช้ปลายเข็มหรือปลายทิว (Tip) จุ่มผ่านชั้นบัฟเฟอร์และอยู่เหนือส่วนกันของช่องเดิมตัวอย่าง ค่อย ๆ เติมตัวอย่างลงในแต่ละช่อง แล้วบันทึกตัวอย่างที่เติมลงในแต่ละช่อง

8. ต่ออุปกรณ์จ่ายไฟเข้ากับชุดทดลอง ตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ ตรวจสอบขั้วไฟฟ้าทั้ง 2 ด้านให้ถูกต้องเนื่องจากโปรตีนในตัวอย่างจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก Marker Bromophenol Blue จะเคลื่อนเข้าสู่ Separating Gel เมื่อสังเกตว่าสีของ Bromophenol Blue เคลื่อนที่ลงส่วนล่างเจลจึงหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ระบบ ค่อย ๆ แยกส่วนของ Stacking Gel ออก ตัดมุมของเจลกลับบริเวณที่เติมตัวอย่างช่องแรกเพื่อเป็นสัญลักษณ์

9. นำเจลมาย้อมสี Comassi Blue เพื่อดูขนาดของโปรตีน

ส่วนที่ 2 การผลิตและทดสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ

Cd-Binding Protein

2.1 การฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจน

นำหนูเมาส์ อายุ 6 สัปดาห์ มาเลี้ยงในห้องทดลองและปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน ฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจน Cd-Binding Protein ที่บริสุทธิ์ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมสารละลาย Phosphate Buffer Saline 150 ไมโครลิตร และ Complete Adjuvant 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของหนูเมาส์ 150 ไมโครลิตร หลังจากนั้นฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ด้วย Cd- Binding Protein ผสมกับ Incomplete Adjuvant ในอัตราส่วนเดียวกับการฉีดครั้งแรก ทำการฉีดซ้ำทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เจาะเลือดหนู เก็บซีรัม มาใช้เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี เพื่อทดสอบความจำเพาะต่อ Cd- Binding Protein

2.2 การเก็บเลือดหนู

ทำการเก็บเลือดจากหนูบริเวณหางหนู โดยก่อนการเจาะเลือดใช้แอลกอฮอล์ 70% เช็ดบริเวณหาง ใช้เข็มเจาะบริเวณหางให้เลือดหยดลงใน Appendroff Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเลือดหนูเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 Xg นาน 5-10 นาที เก็บซีรัมที่อยู่ส่วนบนของ Appendroff Tube ไว้ทดสอบคุณสมบัติโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd- Appendroff Tube ด้วยวิธี Western Blot กับแอนติเจน Cd- Binding Protein

2.3 การทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากซีรัมของหนูเมาส์

ทำการทดสอบด้วยวิธี Western Blot Analysis โดย Load แอนติเจน Cd- Appendroff Tube 10 ไมโครลิตร ลงบนช่องเดิมตัวอย่างของ 15% SDS-PAGE ต่ออุปกรณ์จ่ายไฟ ดังกระแสไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ จนกระทั่งสังเกตเห็นสีของ Bromophenol Blue เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจล จึงหยุดกระแสไฟ ตัดแผ่น Nitrocellulose Membrane ให้พอดีกับแผ่นเจล แฉแผ่น Nitrocellulose Membrane และกระดาษกรองใน 1x-Electrode Buffer นำแผ่น Nitrocellulose Membrane มาประกบกับแผ่นเจล ใส่ฟองอากาศ ประกบด้วยกระดาษกรองรีดน้ำออกให้ประกบกัน อย่างเรียบสนิททั้งสองด้าน วางบนเครื่อง Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell โดยให้แผ่น Nitrocellulose Membrane อยู่ด้านล่าง ต่ออุปกรณ์จ่ายไฟเข้ากับชุดทดลอง ดังกระแสไฟฟ้าที่ 15 โวลต์ นาน 20 นาที นำแผ่น Nitrocellulose ออกแช่ใน 5% Non Fat Dry Milk ใน PBS 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS/0.5% Tween20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง จากนั้นนำแผ่น Nitrocellulose Membrane แฉลงใน Mouse Polyclonal Antibody (1:1,000) ซึ่งได้จากซีรัมของหนู นาน 2 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินด้วย PBS/0.5% Tween20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง แฉแผ่น Nitrocellulose

Membrane ใน Goat anti-Mouse Conjugated Peroxidase (Secondary Antibody Dilution 1:1,000 ; GAM-HRP) นาน 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินด้วย PBS/0.5% Tween20 นาน 5 นาที 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน Substrate คือ 30% H_2O_2 25 ไมโครลิตร + DAB 7 มิลลิกรัม + $CoCl_2$ 200 ไมโครลิตร ใน PBS 20 มิลลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสี ภายใน 5 นาที เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น ทำลายปฏิกิริยาของ Substrate ด้วยคลอโรกซ์ อ่านผลการทดลองเทียบกับ ขนาดของโปรตีนมาตรฐาน ถ้ามีโปรตีนที่ต้องการจะปรากฏแถบสีบนแผ่น Nitrocellulose Membrane

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดี ด้วยวิธี Western Blot Analysis

นำแผ่น nitrocellulose membrane ที่ทำการถ่าย Cd-Binding Protein จาก 15% SDS-PAGE แช่ใน 5% dry milk in PBS นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS/0.5% tween20 ตัดแผ่น Nitrocellulose Membrane ตามแนวตั้งให้มีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาทดสอบความไว ของแอนติบอดีตามขั้นตอนของวิธี Western Blot โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการ ทดสอบความจำเพาะต่อ Cd- Binding Protein ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 1:1000 1:2500 1:5000 1:7500 และ 1:10000 เป็น Primary Antibody หลังจากนั้นบ่มใน Secondary Antibody และแช่ใน สารละลาย Substrate แล้วอ่านผล ความเข้มข้นของ โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับ แอนติเจน Cd- Binding Protein

ส่วนที่ 3 การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี สำหรับการแสดงออกของ Cd- Binding Protein ในปลาทะเลแนวชายฝั่งจังหวัดชลบุรีและระยอง

3.1 การสกัดโปรตีน Metal- Binding Protein

3.1.1 เก็บตัวอย่างปลาทะเลที่จับโดยใช้จวนลากแผ่นตะเฒ่ บริเวณเขตอุตสาหกรรม ได้แก่ นิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบังจังหวัดชลบุรีและเขตนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัด ระยอง ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนของโลหะหนัก โดยตัวอย่างปลาทะเล ทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากงานวิจัย เรื่อง การประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของโลหะหนัก ในอาหารทะเลในพื้นที่อุตสาหกรรมชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

3.1.2 ทำการชั่งน้ำหนัก ขนาด ผ่าท้อง เก็บอวัยวะตับปลา ชั่งน้ำหนักตับ นำตับ เก็บในถังไนโตรเจนเหลว ระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้นย้ายตับปลาเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.1.3 นำตับมาสกัดโดย Homogenized (35 % W/V) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่ บรรจุด้วย 0.1 mM PMSF, 0.5 mM DTT และ 150 mM NaCl

3.1.4 นำมา Centrifuge ที่ 15,000 X g นาน 90 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.5 เก็บโปรตีนส่วนบน Supernatant นำส่วน Supernatant ที่เป็นของเหลวเก็บใส่ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส รอการทดสอบต่อไป

3.2 การหาปริมาณโปรตีน (Protein Determination) (Bradford, 1976)

ทำการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง เพื่อนำค่าความเข้มข้นโปรตีนมาคำนวณก่อนนำไปใช้การทดสอบ Western Blot (ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น)

3.3 การตรวจการแสดงออกของ Metal-Binding Protein ในปลาทะเล ด้วยวิธี Western Blot (ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น)

วิเคราะห์ข้อมูล

ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธี Chi-Square Tests โดยมีตัวแปรต้นคือ สถานี และ
ฤดูกาล ส่วนตัวแปรตาม คือ การแสดงออกของ Metal-Binding Protein