2. อุปกรณ์ และวิธีทดลอง

2.1 เครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
Centrifuge , Model UV	International Equipment Company U.S.A.
Hotplate shaker	Cenco Instrument , Netherlands
Hotplate stirrer , Model PC-351	Coming Glass Works, U.S.A.
Mechanical analytical balance	Sartorius , Germany
Microtiter plate , V-Shape	Cooke Engineering Co., U.S.A.
pH-meter 51	Radiometer , Sweden
Quickpette , Variable volume pipetting	Helena Laboratories , U.S.A.
Refrigerated superspeed centrifuge, Sorvall RC-5B	Dupont Company , U.S.A.
Spectrapor membrane tubing	Authur H.Thomas Co., U.S.A.
Spectronic 21	Bausch & Lomb Inc.Ltd., U.S.A.
Waring blender	Waring Products, U.S.A.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
N-acetyl-D-galactosamine	Sigma Chemical Company , U.S.A.
N-acetyl-D-glucosamine	Sigma Chemical Company , U.S.A.
D(-)-Arabinose	Fluka , Switzerland
Bovine serum albumin	Sigma Chemical Company , U.S.A.
Calcium chloride	BDH Chemical Ltd., England
D(+)-Cellobiose	Sigma Chemical Company , U.S.A.
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka , Switzerland
Cupric chloride	BDH Chemical Ltd., England
Disodium hydrogen orthophosphate, anhydrous	BDH Chemical Ltd., England
Ethanol , 95 %	Ayudhya , Thailand
D-Fructose	May & Baker Ltd., England
α-D-Fucose	Sigma Chemical Company , U.S.A.
D(+)-Galactose	Fluka , Switzerland
D-Glucose	BDH Chemical Ltd., England
Hydrochloric acid	BDH Chemical Ltd., England
α-Lactose	Sigma Chemical Company , U.S.A.
Magnesium Chloride , hexahydrate	Fluka , Switzerland
Manganese Chloride , tetrahydrate	BDH Chemical Ltd., England
D(+)-Maltose	Fluka , Switzerland
D(+)-Mannose	Aldrich Chemical Co.Ltd., U.S.A.
α-D(+)-Melibiose	Sigma Chemical Company , U.S.A.
Methyl-α-D-galactopyranoside	Sigma Chemical Company, U.S.A.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อสารเคมี	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
Methyl-β-D-galactopyranoside	Sigma Chemical Company , U.S.A
3-O-Methyl-D-glucopyranose	Sigma Chemical Company , U.S.A.
Methyl-α-D-mannopyranoside	Sigma Chemical Company , U.S.A.
Neuraminidase , type V from *Clostridium perfringens* and activity: 1.8 units/mg protein	Sigma Chemical Company , U.S.A.
Ortho-phosphoric acid , 85%	Merck , Germany
D(+)-Raffinose , pentahydrate	Sigma Chemical Company , U.S.A.
D(-)-Ribose	Merck , Germany
Sephadex G-200	Pharmacia Fine Chemicals , Sweden
Sepharose	Pharmacia Fine Chemicals , Sweden
Sodium Chloride , AR grade	Merck , Germany
Sodium dihydrogen phosphate	Merck , Germany
Sucrose	Thailand
Tris(hydroxymethyl) methylamine	BDH Chemical Ltd., England
Trypsin , Crystalline from Beef pancreas	BDH Chemical Ltd., England
D-Xylose	BDH Chemical Ltd., England
Zinc chloride	Fluka , Switzerland

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 **พืชที่ใช้ศึกษาเลคติน**

ชื่อและชนิดของพืชทั้งหมดที่ใช้ศึกษาเลคติน แสดงในตาราง 2.1 สำหรับแหล่งที่ได้มาของพืชดังกล่าวคือ

ก. กวาวเครือ ขุดจากแหล่งโครงการห้วยมะนาวพื้นที่เขตติดต่อโรงเรียนบ้านกาดวิทยาคม อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่

ข. ก่อเดือย ก่อแป้น และก่อแหลม ซื้อจากตลาดต้นลำใย จ.เชียงใหม่ ราคาลิตรละ 8 , 6 และ 12 บาท ตามลำดับ

ค. ขนุน เครือเขาปู้ และถั่วราชมาษ ขอจากบ้านเลขที่ 55/1 หมู่ 1 ต.ฟ้าฮ่าม อ.เมือง จ.เชียงใหม่

ง. คำบูชา ขอจากศูนย์พัฒนาที่ดินเขต 6 จ.เชียงใหม่

จ. ถั่วแดง ถั่วแปบ ถั่วลาย ถั่วยาง และ มะขม ซื้อจากตลาดต้นลำใย จ.เชียงใหม่ ราคากิโลกรัมละ 10 , 9 , 10 , 9 และ 10 บาท ตามลำดับ

ฉ. ไมยราบยักษ์ เก็บจากแหล่งใน อ.เมือง จ.เชียงใหม่ และ อ.สามเงา จ.ตาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.1 รายชื่อและชนิดของพืชที่ใช้ศึกษาเลคติน[32]

ชื่อราชการและชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์ และชื่อทั่วไป	ลักษณะชนิดไม้	วงศ์
1. กวาวเครือ (เหนือ)	Pueraria mirifica Airy Shaw & Suvatabhandu	เถาวัลย์	Leguminosae
2. ก่อเดือย ก่อสร้อย (เชียงใหม่) ก่อหมัด,ก่อหัด(เลย, เพชรบูรณ์)	Castanopsis acuminatissima Rehd.	ไม้ยืนต้น	Fagaceae
3. ก่อแป้น(เชียงใหม่)	Castanopsis echinocarpa A.DC.	ไม้ยืนต้น	Fagaceae
4. ก่อแหลม(เชียงใหม่)	Castanopsis ferox Spach	ไม้ยืนต้น	Fagaceae
5. ขนุน มะหนุน(เหนือ,ใต้) หมักหมี้(อีสาน)	Artocarpus heterophyllus Lamk. Jack fruit	ไม้ยืนต้น ต่างประเทศ	Moraceae
6. เครือเขาปู้ ตาลานเครือ(ลำปาง)	Pueraria candollei Grah.	ไม้เลื้อย	Leguminosae
7. คำบูชา(เชียงใหม่) ปอเทือง(นครปฐม), บัวสา(แพร่) หิ่งห้อ(นครราชสีมา)	Crotalaria juncea Linn. Sann hemp, Sunn hemp	ไม้พุ่ม ต่างประเทศ	Leguminosae

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.1 (ต่อ)

ชื่อราชการและชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์ และชื่อทั่วไป	ลักษณะชนิดไม้	วงศ์
8. ถั่วแดง ถั่วแป๋,มะแป๋(เหนือ)	Vigna umbellata (Thunb.) Ohwi & Ohashi Red bean, Rice bean	ไม้ล้มลุกเลื้อย	Leguminosae
9. ถั่วแปบ ถั่วหนัง,ถั่วแปยี,มะแปบ (เหนือ)มะแปบ(เชียงใหม่)	Lablab purpureus Sweet หรือ Dolichos lablab Linn. Bonavista bean	ไม้ล้มลุกเลื้อย	Leguminosae
10. ถั่วราชมาษ มะวอย,มะบอย(เหนือ)	Phaseolus lunatus Linn. Lima bean, Sieva bean	ไม้ล้มลุกเลื้อย ต่างประเทศ	Leguminosae
11. ถั่วลาย	Centrosema pubescens Benth. Butterfly bean	ไม้เลื้อยต่างประเทศ	Leguminosae
12. ถั่วยาง(เชียงใหม่)	Vicia faba Linn. Broad bean, Windsor bean	ไม้ล้มลุกเลื้อย	Leguminosae
13. มะขม(น่าน)	Pittosporopsis kerrii Craib	ไม้พุ่มยืนต้น	Icacinaceae
14. ไมยราบยักษ์(เหนือ) ไมยราบต้น	Mimosa pigra Linn.	ไม้ล้มลุกต่างประเทศ	Leguminosae

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนของพืชที่ใช้ศึกษาเลคติน แสดงในรูป 2.1 พืชทั้งหมดยกเว้นกวาวเครือ และเครือเขาปู่ จะใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเมล็ดในการศึกษา โดยเลือกเฉพาะเมล็ดที่แก่จัดและแห้ง ทั้งนี้ยกเว้นไมยราบยักษ์เท่านั้นที่ใช้เมล็ดอ่อนและสด สำหรับกวาวเครือใช้ส่วนของหัวใต้ดิน และเครือเขาปู่ใช้หัวที่ติดกับเถา

รูป 2.1 ส่วนของพืชชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษาเลคติน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.1 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 **เลือดที่ใช้ทดสอบเลคติน**

เลือดที่ใช้ทดสอบเลคตินเป็นเลือดคนที่ได้รับบริจาคจากธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ เลือดที่ได้เป็นเลือดที่หมดอายุไม่นาน อาจได้มาในรูปของเลือดทั้งหมดหรือเฉพาะเม็ดเลือดก็ได้ เลือดเหล่านี้แบ่งกลุ่มมาตามระบบเอบีโอ

2.5 **การสกัดเลคติน**

<u>การเตรียมสิ่งที่ใช้สกัด</u>

สิ่งที่ใช้สกัดเลคตินคือ 0.005 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 0.15 โมลาร์ เกลือแกง (PBS) โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้

การเตรียม 0.05 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

ชั่ง Na_2HPO_4 หนัก 0.7098 กรัม ละลายในน้ำแล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

การเตรียม 0.05 โมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ชั่ง $NaH_2PO_4.H_2O$ หนัก 0.6900 กรัม ละลายในน้ำแล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

การเตรียม 1.5 โมลาร์ เกลือแกง

ชั่ง NaCl หนัก 8.7660 กรัม ละลายในน้ำแล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

การเตรียม 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

เติม 0.05 โมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ลงใน 0.05 โมลาร์ ไดโซ-เดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีปริมาตร 100 มล. จนได้ pH เป็น 7.4 เก็บสารละลายที่ 4° ซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม 0.005 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 0.15 โมลาร์เกลือแกง

ปิเปต 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 10 มล. ผสมกับ 1.5 โมลาร์ เกลือแกง 10 มล. แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล. นำไปวัด pH ได้ 7.0

วิธีสกัด

ชั่งส่วนของพืชที่เป็นเมล็ดหนัก 20.00 กรัม แช่ใน PBS ปริมาตร 100 มล. เป็นเวลา 4 ชม. ถ้าส่วนของพืชเป็นหัวให้ปอกเปลือกทิ้ง และนำเนื้อข้างในไปชั่งแล้วเติม PBS จากนั้นนำไปปั่นด้วย Waring blender ที่ความเร็วสูงสุดของเครื่อง เป็นเวลา 3 นาที กรองกากทิ้งด้วยผ้าขาวบางซ้อนสองชั้น นำส่วนที่กรองได้ไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์ที่ควบคุมอุณภูมิระหว่าง 4 - 6 ° ซ (Sorvall centrifuge) และใช้หัวเหวี่ยงชนิด SS-34 ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาตรสิ่งที่สกัดได้แล้วแช่แข็งในตู้เย็นไว้ศึกษาต่อไป

2.6 การไดอะไลซ์ (Dialysis)

การไดอะไลซ์เป็นวิธีที่ใช้แยกสารโมเลกุลใหญ่ออกจากสารโมเลกุลเล็กได้ โดยนำสารผสมใส่ในถุงที่ทำด้วยสารประกอบที่มีการจัดตัวเป็นระเบียบมีลักษณะเป็นเยื่อบาง และมีรูพรุนเล็ก ๆ เช่น เยื่อเซลลูโลสอะซิเตต เป็นต้น ดังนั้นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ารูจะสามารถลอดผ่านรูออกไปนอกถุงได้ ในขณะที่สารโมเลกุลใหญ่จะถูกกักอยู่ในถุง ตัวอย่างเช่น สิ่งสกัดจากพืชที่มีโปรตีนแขวนลอยปนอยู่กับเกลือแร่และน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ๆ เมื่อนำมาใส่ในถุงดังกล่าวแล้วนำถุงนั้นไปแช่ในน้ำ สารโมเลกุลเล็กที่ปนอยู่นั้นจะผ่านรูออกมาเจือจางอยู่ในน้ำ ส่วนโปรตีนทั้งหมดจะอยู่แต่ในถุง และเมื่อเปลี่ยนน้ำที่ใช้แช่ถุงหลาย ๆ ครั้งจะสามารถกำจัดเกลือแร่และน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ๆ ออกจากโปรตีนได้

วิธีการไดอะไลซ์ นำสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่างปริมาตร 5 มล. ใส่ในถุงไดอะไลซ์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 มม. และน้ำหนักโมเลกุลคัดเลือก 12,000 - 14,000 ผูกก้นและปากถุงให้แน่น นำไปแช่ใน PBS ปริมาตร 1 ลิตร ที่ 4° ซ คน PBS เบา ๆ เพื่อเร่งการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระจายตัวของสารโมเลกุลเล็ก เปลี่ยน PBS ทุก ๆ 12 ชม. จนครบ 4 ครั้ง นำสิ่งที่อยู่ในถุงไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์ที่ใช้หัวเหวี่ยงชนิด SS-34 ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปใช้เป็น "สิ่งสกัดหลังไดอะไลซิส"

2.7 การวัดความขุ่นและความเป็นกรดด่าง (pH)

การวัดความขุ่นของสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง นำสิ่งที่สกัดได้ก่อนทำการไดอะไลซ์ไปวัดความขุ่น โดยวัดการกระเจิงแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectronic 21 ในการวัด และใช้ PBS เป็น blank

การวัดความเป็นกรดด่างของสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง นำสิ่งที่สกัดได้ก่อนทำการไดอะไลซ์ไปวัด pH โดยใช้เครื่อง pH-meter 51

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford[30]

<u>การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน</u>

ชั่ง Bovine serum albumin (BSA) หนัก 1.0000 กรัม ละลายใน PBS แล้วเติม PBS จนได้ปริมาตรเป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร สารละลายที่ได้คือ 1.00% BSA (w/v)

สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ 0.02% BSA ซึ่งเตรียมได้โดยปิเปต 1.00% BSA ปริมาตร 1.00 มล. มาเติม PBS จนได้ปริมาตรเป็น 50 มล. ในขวดวัดปริมาตร

<u>การเตรียมสารละลาย Coomassie</u>

ชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 หนัก 0.0200 กรัม ละลายใน 95% ethanol 50 มล. เติม 85% phosphoric acid 100 มล. แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลาย Coomassie ควรเตรียมใหม่ทุกวัน

<u>การสร้างกราฟมาตรฐาน</u>

ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 0.02% BSA ปริมาตรต่างๆกันตามตาราง 2.2

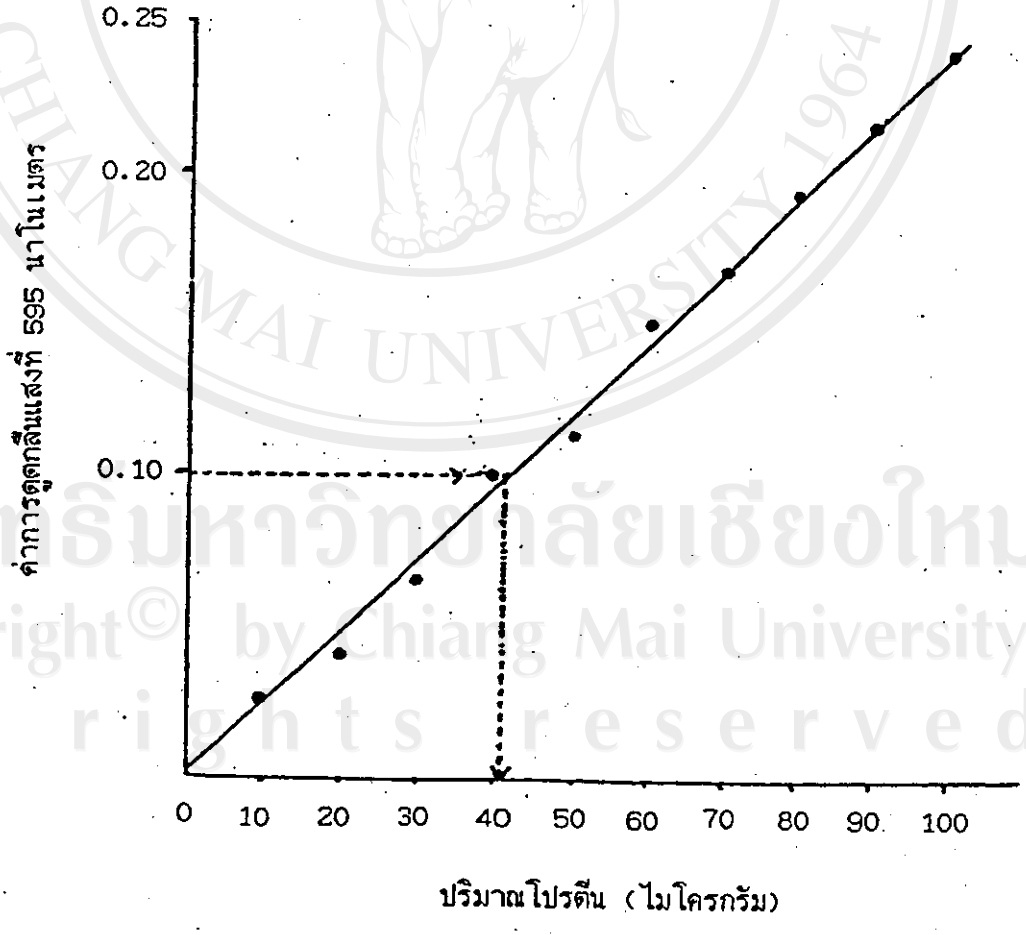
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เติม PBS จนได้ปริมาตรของสารละลายโปรตีนเป็น 0.50 มล. เติมสารละลาย Coomassie ปริมาตร 5.00 มล. เขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟกับปริมาณโปรตีนที่เติมลงไป จะได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ดังรูป 2.2

ตาราง 2.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

หลอดที่	0.02%BSA (ไมโครลิตร)	PBS (ไมโครลิตร)	สิ่งที่สกัดได้จากพืช (ไมโครลิตร)	สารละลาย Coomassie (มล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)
Blank	-	500	-	5.00	0	0
1	50	450	-	5.00	0.025	10
2	100	400	-	5.00	0.040	20
3	150	350	-	5.00	0.065	30
4	200	300	-	5.00	0.100	40
5	250	250	-	5.00	0.112	50
6	300	200	-	5.00	0.150	60
7	350	150	-	5.00	0.168	70
8	400	100	-	5.00	0.192	80
9	450	50	-	5.00	0.215	90
10	500	-	-	5.00	0.238	100
Sample	-	-	500	5.00	0.100	41

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.2 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากพืช

ปิเปตสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Coomassie 5.00 มล. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปอ่านปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสิ่งสกัดได้ ตัวอย่างเช่น สิ่งสกัดจากพืชชนิดหนึ่ง เมื่อเจือจางด้วย PBS 20 เท่า แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.100 นำไปอ่านปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานได้ 41.2 ไมโครกรัม เพราะฉะนั้นความเข้มข้นของโปรตีนในสิ่งสกัดเป็น 41.2X20 ไมโครกรัมใน 500 ไมโครลิตรหรือ 1.65 มก./มล.

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินโดยทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Hemagglutination test)

การเตรียมเม็ดเลือดแดง

ถ่ายเลือดกลุ่ม เอ บี โอ หรือ เอบี ออกจากถุงลงในหลอดเหวี่ยงประมาณ 10 มล. เติม PBS 10 มล. คนเบา ๆ จนผสมกัน แล้วเหวี่ยงในเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์ (Model UV) ด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำเลือดส่วนบนทิ้งไป ล้างเม็ดเลือดโดยเติม PBS 30 มล. คนและเหวี่ยงเหมือนเดิม ล้างเม็ดเลือดดังนี้ 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายควรล้างในหลอดที่มีขีดปริมาตรเพื่ออ่านปริมาตรของเม็ดเลือดที่ได้ทั้งหมด จากนั้นเติม PBS ลงไปในปริมาตรที่ทำให้ได้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงเป็น 2% ตัวอย่างเช่นปริมาตรเม็ดเลือดนอนก้นเป็น 3.8 มล. ต้องเติม PBS จนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 190 มล. เป็นต้น

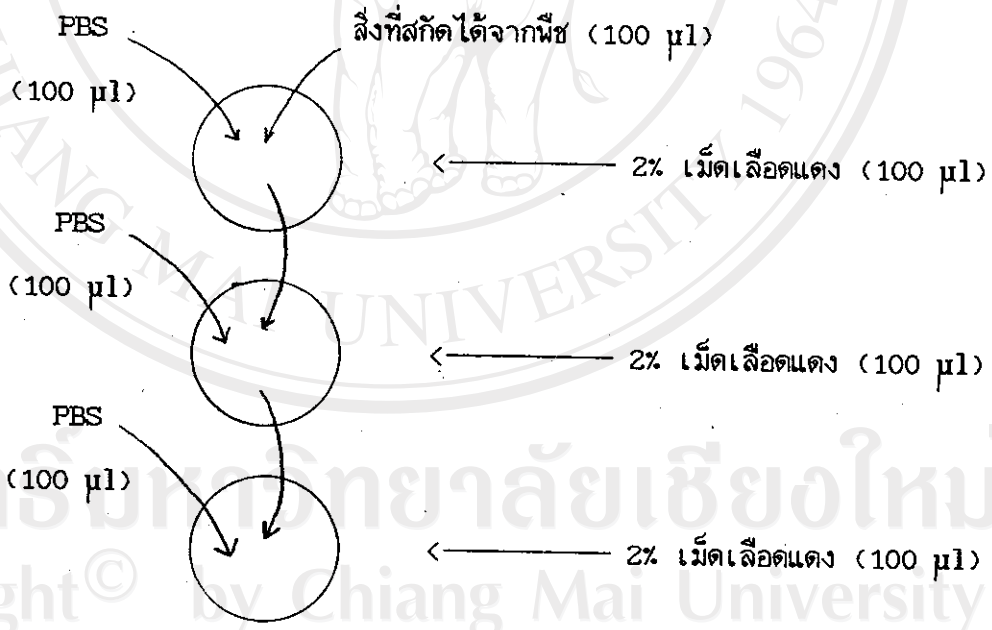
เมื่อนำสารแขวนลอย 2% เม็ดเลือดแดงไปวัดการกระเจิงแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ได้ค่าเท่ากับ 1.5 AU หรือ Absorbance unit

การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

การทดสอบทำในไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ชนิด 8 X 12 หลุม ความจุหลุมละ 200 ไมโครลิตร ลักษณะก้นหลุมเป็นรูปตัววี เติม PBS ลงไปทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ผสมสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรลงในหลุมที่หนึ่ง ปิเปตสาร-

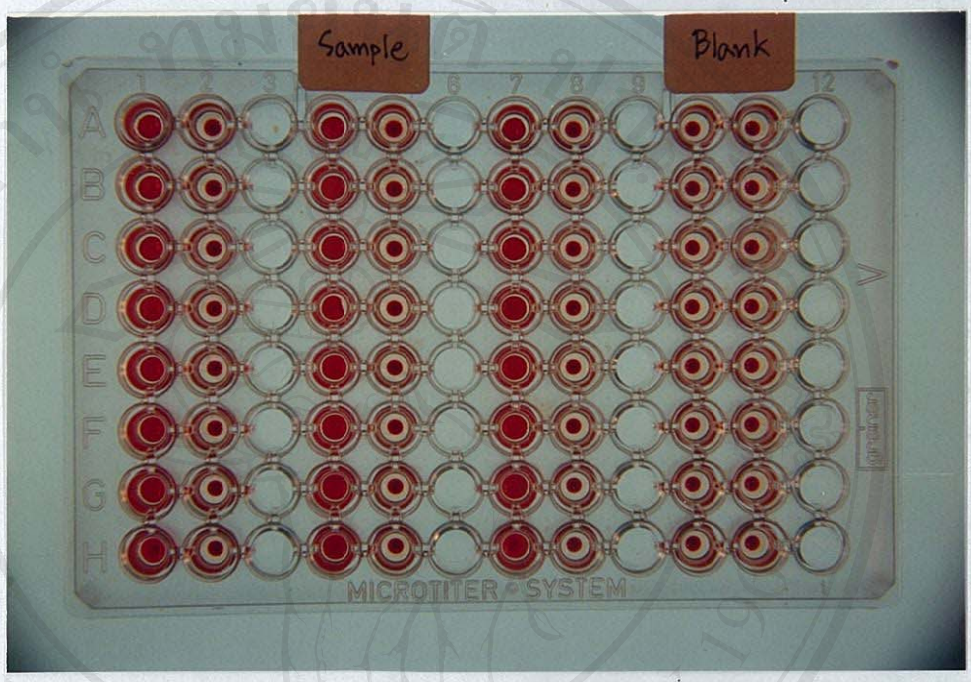
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละลายในหลุมที่หนึ่งขึ้นมา 100 ไมโครลิตรผสมลงในหลุมที่สอง ปิเปตสารละลายในหลุมที่สองขึ้นมา 100 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุมที่สาม ทำดังนี้เรื่อยไปตั้งแต่หลุมบนลงล่าง (A ถึง H) และแถวซ้ายไปขวา (1 ถึง 12) สรุปขณะนี้ทุกหลุมมีเลคตินที่เจือจางต่าง ๆ กันในปริมาตร 100 ไมโครลิตร (รูป 2.3) จากนั้นจึงเติม 2% เม็ดเลือดแดงลงไปทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทำดังนี้ 3 ชุด แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงสังเกตการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง หลุมที่มีเม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงแผ่กระจายเป็นวงกลมขนาดใหญ่ที่ก้นหลุม ส่วนหลุมที่เม็ดเลือดแดงไม่เกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงกองรวมเป็นจุดเล็ก ๆ อยู่กลางหลุม ดังแสดงในรูป 2.4



รูป 2.3 การเจือจางสิ่งที่สกัดได้จากพืชในไมโครไตเตอร์เพลท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2.4 การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

สารละลายที่ทดสอบคือสิ่งที่สกัดได้จากเมล็ดคำบูชาหลังการไดอะไลซ์ การทดสอบทำ 3 ชุดๆ ละ 16 หลุม (1A - 2H, 4A - 5H และ 7A - 8H) และชุดที่ 4 (10A - 11H) เป็นชุดควบคุม คือเติม PBS แทนที่สิ่งสกัดที่ได้จากพืช สำหรับเม็ดเลือดแดงที่ใช้ทดสอบเป็นเลือดกลุ่มเอ ในกรณีนี้พบว่าสิ่งที่สกัดได้จากเมล็ดคำบูชาสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ทั้งหมด 8 หลุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณเลคติน

เนื่องจากเลคตินสามารถจับกับเซลเม็ดเลือดแดง แล้วทำให้เม็ดเลือดแดงเหล่านั้นมาเกาะกันเป็นกลุ่ม การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจึงเป็นการวิเคราะห์ปริมาณเลคตินอย่างคร่าว ๆ ปริมาณเลคตินที่ได้จะมีค่าเป็นไตเตอร์ (Titer) โดย

ไตเตอร์คือค่าการเจือจางมากที่สุดที่ยังสามารถทำให้เม็ดเลือดเกาะกลุ่มได้

จากการทดสอบความสามาถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม การเจือจางสิ่งที่สกัดได้จากพืชในไมโครไตเตอร์เพลทนั้น (รูป 2.3) หลุมที่อยู่ถัดไปจะถูกเจือจางมากขึ้นหลุมละสองเท่าเสมอ นั่นคือหลุมที่หนึ่งมีเลคตินที่เจือจาง 2 เท่า หลุมที่สองมีเลคตินที่เจือจาง 4 หรือ 2^2 เท่า หลุมที่สามมีเลคตินที่เจือจาง 8 หรือ 2^3 เท่า ดังนี้เรื่อยไป ดังนั้นค่าไตเตอร์ของเลคตินจึงเท่ากับ 2^n เมื่อ n คือจำนวนหลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ยกตัวอย่างเช่น ในรูป 2.4 สิ่งที่สกัดได้จากเมล็ดคำบูชาสามารถทำให้เม็ดเลือดเกาะกลุ่มได้จนถึงหลุมที่ 8 จึงมีปริมาณเลคตินเท่ากับ 2^8 หรือ 256 ไตเตอร์ต่อปริมาตรสิ่งที่สกัดได้ 100 ไมโครลิตรหรือ 2560 ไตเตอร์/มล.

2.10 การทดสอบความต้องการโลหะอิออนของเลคติน

<u>การเตรียมสิ่งที่ใช้สกัดเลคติน</u>

สิ่งที่ใช้สกัดเลคตินจากพืชตัวอย่าง เพื่อนำมาทดสอบความต้องการโลหะอิออนของเลคตินคือ 0.01 โมลาร์ **Tris - HCl buffer,pH** 7.4 ที่มี 0.15 โมลาร์เกลือแกง (TBS) สาเหตุที่ไม่ใช้ PBS เป็นสิ่งสกัดเพราะใน PBS มีฟอสเฟตที่อาจเกิดตะกอนกับโลหะอิออนที่ต้อง - การทดสอบ

การเตรียม 0.1 M Tris - HCl buffer,pH 7.4

ชั่ง **Tris (hydroxymethyl) methylamine** หนัก 1.2114 กรัม ละลายในน้ำประมาณ 90 มล. เติมกรดเกลือเข้มข้นจนได้ pH เป็น 7.4 แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

การเตรียม 0.01 M Tris - HCl buffer,pH 7.4 ที่มี 0.15 โมลาร์เกลือแกง

ปิเปต 0.1 M **Tris - HCl buffer,pH** 7.4 ปริมาตร 10.00 มล. ผสมกับ 1.5 โมลาร์เกลือแกง ปริมาตร 10.00 มล. แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดเลคตินจากพืชตัวอย่าง

การสกัดเลคตินใช้วิธีเดียวกับข้อ 2.5 ยกเว้นสิ่งที่ใช้สกัดเป็น TBS แทนที่ PBS แล้วนำสิ่งที่สกัดได้ไปทำการไดอะไลซ์ตามข้อ2.6 ยกเว้นสารละลายที่ใช้แช่เป็น TBS แทนที่ PBS

การเตรียมสารละลายโลหะอิออน

การเตรียม TBS ที่มี 4 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์ และแมงกานีส-คลอไรด์

ชั่ง $CaCl_2$ หนัก 0.0444 กรัม $MgCl_2.6H_2O$ หนัก 0.0813 กรัม และ $MnCl_2 . 4H_2O$ หนัก 0.0792 กรัม ละลายผสมกันใน TBS แล้วเติม TBS จนได้ปริมาตร 100 มล.

การเตรียม TBS ที่มี 2มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์และแมงกานีสคลอไรด์

ปิเปต TBS ที่มี 4 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์ ปริมาตร 10.00 มล. ผสมกับ TBS ปริมาตร 10.00 มล.

วิธีทดสอบ

จากการทดสอบผลของโลหะอิออนต่อความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคติน ถ้าโลหะอิออนใดเพิ่มความสามารถแสดงว่าเลคตินต้องการโลหะอิออนนั้นในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคติน เมื่อเติมโลหะอิออนลงไปด้วย เรียกว่าชุดทดสอบ และเมื่อไม่เติมโลหะอิออน เรียกว่าชุดควบคุม ดังนั้นวิธีทำชุดควบคุมจึงเหมือนข้อ 2.9 แต่ใช้ TBS แทนที่ PBS และวิธีทำชุดทดสอบก็เหมือนข้อ 2.9 แต่หลุมแรกใช้ TBS ที่มี 4 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์ ส่วนหลุมที่เหลือทั้งหมดใช้ TBS ที่มี 2 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์แทนที่ PBS นั่นคือความเข้มข้นของโลหะอิออนในขณะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของเลคตินในชุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดสอบกับชุดควบคุม ถ้าค่าไตเตอร์ในชุดทดสอบมากกว่าชุดควบคุม แสดงว่า เลคตินต้องการโลหะอิออนดังกล่าวในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

2.11 การปรับปรุงเม็ดเลือดแดงด้วยนิวรามินิเดส[33]

การเตรียมสารละลายนิวรามินิเดส

ชั่ง Neuraminidase หนัก 0.0056 กรัม ละลายใน PBS ปริมาตร 1.00 มล. จะได้สารละลายนิวรามินิเดส 10 ยูนิต/มล. เก็บโดยการแช่แข็งในตู้เย็น

วิธีปรับปรุง

ผสม 10 ยูนิต/มล. นิวรามินิเดส ปริมาตร 40 ไมโครลิตรกับ 2% เม็ดเลือดแดงกลุ่มเอใน PBS (ข้อ 2.9) ปริมาตร 20 มล. คนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำไปเหวี่ยงหนีศูนย์ด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เติม PBS 35 มล. ลงในเม็ดเลือด คนเม็ดเลือดให้แขวนลอยและเหวี่ยงหนีศูนย์แล้วเทน้ำล้างทิ้ง ล้างเม็ดเลือดดังนี้ 3 ครั้ง อ่านปริมาตรนอนก้นของเม็ดเลือดแดงที่ได้และเติม PBS จนได้ 2% เม็ดเลือดแดง โดยปริมาตรต่อปริมาตร

2.12 การปรับปรุงเม็ดเลือดแดงด้วยทริปซิน[23]

การเตรียมสารละลายทริปซิน

ชั่ง Trysin หนัก 0.0375 กรัม ละลายใน PBS ปริมาตร 36.0 มล.

วิธีปรับปรุง

ล้างเม็ดเลือดแดงกลุ่มเอด้วย PBS ตามข้อ 2.9 แล้วนำเม็ดเลือดที่มีปริมาตรนอนก้น 1.5 มล. มาผสมกับสารละลายทริปซินใน PBS 36.0 มล. คนเบา ๆ และอุ่นที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชม. นำไปเหวี่ยงหนีศูนย์ด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เติม PBS 30 มล. ลงในเม็ดเลือด คนเม็ดเลือดให้แขวนลอย และเหวี่ยงหนีศูนย์ แล้วเทน้ำล้างทิ้ง ล้างเม็ดเลือดดังนี้ 5 ครั้ง อ่านปริมาตรนอนก้นของเม็ดเลือดที่ได้และเติม PBS จนได้ 2% เม็ดเลือดแดง โดยปริมาตรต่อปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.13 การทดสอบการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Hemagglutination Inhibition Test)

เนื่องจากเลคตินทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ โดยเลคตินจับกับส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตบนผิวของเซลเม็ดเลือดแดง การจับจำเพาะของเลคตินกับคาร์โบไฮเดรตนั้น สามารถถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาลอิสระที่มีโครงสร้างเหมือนน้ำตาลที่ปลายของคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซล ดังนั้นเม็ดเลือดแดงที่ผสมกับเลคตินในขณะที่มีน้ำตาลเหล่านั้นอยู่ด้วยจะไม่เกิดการเกาะกลุ่ม

การเตรียมสารละลายน้ำตาล

สารละลายน้ำตาลส่วนใหญ่จะเตรียมที่ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ยกเว้นน้ำตาลที่ละลายน้ำได้น้อย จะเตรียมที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นของสารละลายอิ่มตัวของน้ำตาลนั้นเล็กน้อย

ในการเตรียมสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิด ชั่งน้ำตาลนั้นให้มีน้ำหนักดังระบุในตาราง 2.3 ละลายใน PBS สารละลายใน PBS ถ้าไม่ละลายให้อุ่นจนละลาย แล้วจึงเติม PBS จนได้ ปริมาตรสุดท้ายดังระบุในตาราง 2.3 การปรับปริมาตรสารละลายทำในขวดวัดปริมาตร

การเตรียมสิ่งที่สกัดได้จากพืช

นำสิ่งที่สกัดได้จากพืชที่ตรวจพบเลคตินทั้งก่อนและหลังการไดอะไลซ์ มาวิเคราะห์ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ตามข้อ 2.9 ยกเว้นปริมาตรของสารละลายซึ่งใช้ต่างกัน โดยในที่นี้ให้เติม PBS ลงในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร ผสมสิ่งที่สกัดได้จากพืช 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่หนึ่ง ปิเปตสารละลายจากหลุมที่หนึ่งมา 50 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุมที่สอง ทำดังนี้เรื่อยไป จากนั้นเติม PBS ลงในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม 2% เม็ดเลือดแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.3 การเตรียมสารละลายน้ำตาลสำหรับทดสอบการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

สารละลาย	น้ำหนักโมเลกุล	น้ำหนักสาร (กรัม)	ปริมาตรสุดท้าย (มล.)
1.2M N-acetyl-D-galactosamine	221.2	1.3272	5.00
1.2M D-arabinose	150.13	1.8016	10.00
1.2M D-fructose	180.16	2.1619	10.00
1.2M α-D-fucose	164.2	0.1970	1.00
1.2M D-galactose	180.16	2.1619	10.00
1.2M D-glucose	180.16	2.1619	10.00
1.2M D-maltose	360.32	4.3238	10.00
1.2M D-mannose	180.16	2.1619	10.00
1.2M α-D-melibiose	342.3	4.1076	10.00
1.2M methyl-α-D-galactopyranoside	194.2	0.2330	1.00
1.2M methyl-β-D-galactopyranoside	194.2	0.2330	1.00
1.2M 3-O-methyl-D-glucopyranose	194.2	0.2330	1.00
1.2M methyl-α-D-mannopyranoside	194.2	2.3304	10.00
1.2M D-ribose	150.3	0.9008	5.00
1.2M sucrose	342.3	4.1076	10.00
1.2M D-xylose	150.13	1.8016	10.00
0.8M N-acetyl-D-glucosamine	221.2	0.3539	2.00
0.5M α-lactose	342.3	4.2788	25.00
0.33M D-cellobiose	342.3	1.1296	10.00
0.21M D-raffinose	594.5	0.6242	5.00

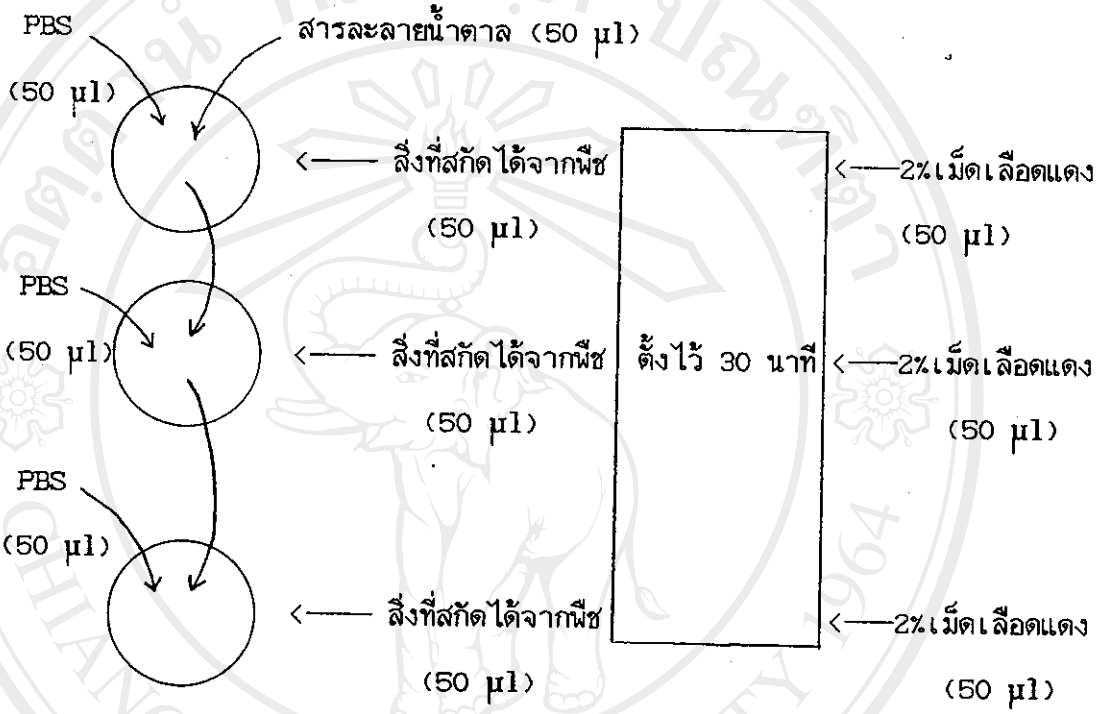
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ดังนั้นปริมาตรสุดท้ายจึงเป็น 150 ไมโครลิตร ทำดังนี้ 2 ชุด เพื่อหาค่าไตเตอร์ของเลคตินที่อยู่ในสิ่งสกัด จากนั้นจึงนำสิ่งที่สกัดได้จากพืชมาเติม PBS จนเลคตินถูกเจือจางลง คิดเป็นจำนวนเท่าเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่าไตเตอร์ ดังนั้นปริมาณเลคตินที่ถูกทดสอบการยับยั้ง จึงเท่ากับปริมาณเลคตินในหลุมรองสุดท้ายของการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มนั่นเอง

<u>วิธีทดสอบ</u>

ปิเปต PBS ลงในหลุมของไมโครไตเตอร์เพลททุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ผสมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ 50ไมโครลิตรลงในหลุมที่สอง(หลุมที่หนึ่งเป็นหลุมควบคุม) ปิเปตสารละลายจากหลุมที่สองมา 50 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุมที่สาม ปิเปตสารละลายในหลุมที่สามมา 50 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุมที่สี่ ทำดังนี้เรื่อยไปตั้งแต่หลุมบนลงล่าง (A ถึง H) และแถวซ้ายไปขวา (1 ถึง 12) สรุปขณะนี้ทุกหลุมมีน้ำตาลที่เจือจางต่าง ๆ กันในปริมาตร 50 ไมโครลิตร (รูป 2.5) เติมสิ่งที่สกัดได้จากพืชซึ่งเจือจางเรียบร้อยแล้วลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเติม 2% เม็ดเลือดแดงลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ทำการทดสอบดังนี้ 2 ชุด แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. ในหลุมที่หนึ่งซึ่งเป็นหลุมควบคุมจะเห็นเม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มเป็นวงกลมสีแดงขนาดใหญ่ ส่วนหลุมต่อ ๆ มาถ้าน้ำตาลนั้นสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มก็จะเห็นเม็ดเลือดแดงกองรวมเป็นจุดเล็กๆ อยู่กลางหลุม ดังแสดงในรูป 2.6 ดังนั้นหลุมสุดท้ายที่การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงถูกยับยั้งจะบ่งบอกถึงความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำตาลที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



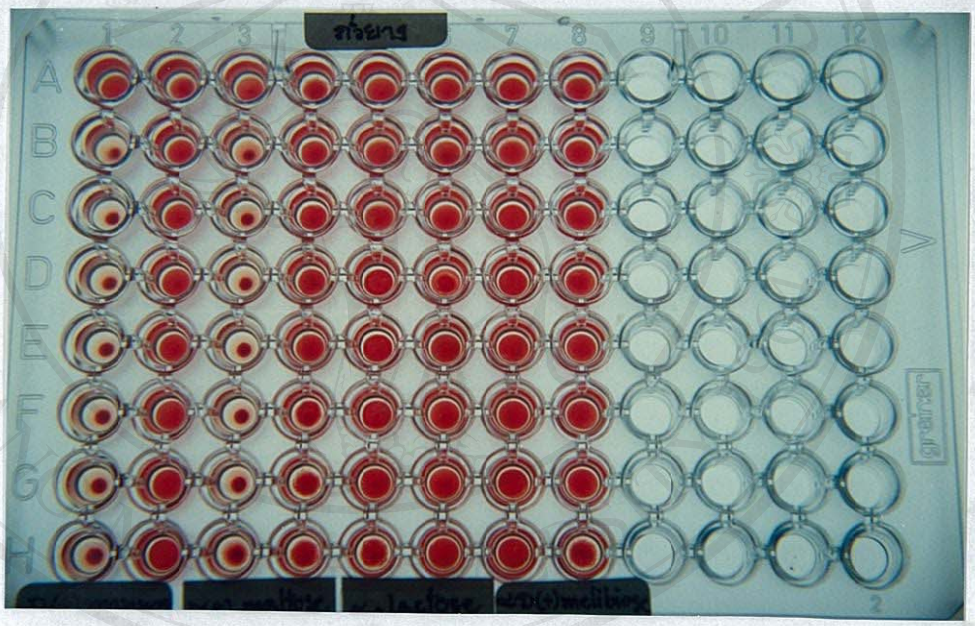
รูป 2.5 การเจือจางสารละลายน้ำตาลในไมโครไตเตอร์เพลท

การคำนวณ

ถ้าสารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ เมื่อเติมลงในหลุมแรกปริมาตร 50 ไมโครลิตร จะถูกเจือจางด้วย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในหลุมแรกเป็น 0.6 โมลาร์ และเมื่อปิเปตสารละลายจากหลุมแรกไปใส่ในหลุมที่สองปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้หลุมแรกมี 0.6 โมลาร์สารละลายน้ำตาลในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดังนั้นหลังจากการเติมสิ่งที่สกัดได้จากพืชปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 2% เม็ดเลือดแดงปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วน้ำตาลจะมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 โมลาร์ หรือ 200 มิลลิโมลาร์ ในทำนองเดียวกัน หลุมที่ 2 , 3 , 4 , 5 ,... จะมีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาลเป็น 100 , 50 , 25 , 12.5 ,... ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างการทดสอบการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคตินจากถั่วยาง โดยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ (รูป 2.6) พบว่า D-mannose และ D-maltose สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ 7 และ 6 หลุม ตามลำดับ จากความเข้มข้นที่เตรียมได้ของน้ำตาลทั้งสองเป็น 1.2 โมลาร์ จึงคำนวณได้ว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็น 3.13 และ 6.25 มิลลิโมลาร์ สำหรับ ∝-lactose และ ∝-D-melibiose ไม่พบการยับยั้งในการทดสอบจึงสรุปว่าน้ำตาลทั้งสองไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 200 มิลลิโมลาร์ เป็นต้น



รูป 2.6 การทดสอบการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

เลคตินที่ใช้คือสิ่งที่สกัดได้จากถั่วยางหลังการไดอะไลซ์สารละลายน้ำตาลที่ใช้ทดสอบเรียงลำดับดังนี้คือ 1A-2H ทดสอบด้วย D-mannose ,3A-4H ทดสอบด้วย D-maltose ,5A-6H ทดสอบด้วย ∝-lactose และ 7A-8H ทดสอบด้วย ∝-D-melibiose โดยหลุมที่ 1A,3A , 5A และ 7A เป็นหลุมควบคุม

ในกรณีนี้ D-mannose สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ทั้งหมด 7 หลุม (1B-1H) และ D-maltose สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ทั้งหมด 6 หลุม (3B -3G) ส่วน ∝-lactose และ ∝-D-melibiose ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.14 การทดสอบการจับของเลคตินกับเม็ดเดกซ์ตราน

<u>การเตรียมสารละลาย</u>

การเตรียม 0.005 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 0.15 โมลาร์เกลือแกง ($PBS_{0.15}$)

ปิเปต 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 10.00 มล. ผสมกับ 1.5 โมลาร์เกลือแกงปริมาตร 10.00 มล. แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

การเตรียม 0.005 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 1.0 โมลาร์เกลือแกง ($PBS_{1.0}$)

ปิเปต 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 10.00 มล. ผสมกับ 1.5 โมลาร์เกลือแกงปริมาตร 66.7 มล. แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

การเตรียม 0.005 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 2.7 โมลาร์เกลือแกง ($PBS_{2.7}$)

ปิเปต 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 10.00 มล. ผสมกับ 5.0 โมลาร์เกลือแกงปริมาตร 54.0 มล. แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การเตรียมเม็ดเดกซ์ตราน</u>

ชั่ง Sephadex G-200 หนัก 2 กรัม เติม $PBS_{0.15}$ ปริมาตร 120 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 4 ชม. ตั้งไว้ให้เม็ดเดกซ์ตรานนอนก้นหนึ่งคืนแล้วอ่านปริมาตรนอนก้นได้ 62.0 มล. เติม $PBS_{0.15}$ ลงในเม็ดเดกซ์ตรานจนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 124.0 มล. คนจนเม็ดเดกซ์ตรานกระจายใน PBS อย่างสม่ำเสมอแล้วแบ่งเป็น 4 ส่วน

ส่วนที่ 1 เก็บไว้ทดสอบเป็นเม็ดเดกซ์ตรานธรรมชาติใน 0.15 โมลาร์เกลือแกง

ส่วนที่ 2 นำมาล้างในกรวยที่มี sinter-glass filter เบอร์ 3 ที่ต่อกับเครื่องดูดอากาศ โดยเติม $PBS_{1.0}$ ปริมาตร 30 มล. ลงในเม็ดเดกซ์ตราน คนและดูดสารละลายทิ้งไป ล้างดังนี้ 3 ครั้ง แล้วนำเม็ดเดกซ์ตรานมาแช่ใน $PBS_{1.0}$ ที่มีปริมาตรเท่ากับ

ปริมาตรนอนก้นของเม็ดเดกซ์ตรานที่ล้างแล้วนั้น เก็บไว้ทดสอบเป็นเม็ดเดกซ์ตรานธรรมชาติใน 1.0 โมลาร์เกลือแกง

ส่วนที่ 3 และ 4 รวมกันแล้วนำไปอุ่นกับกรดเกลือต่อไป

การอุ่นเม็ดเดกซ์ตรานกับกรด

นำเม็ดเดกซ์ตรานส่วนที่ 3 และ 4 มาล้างในกรวยที่มี sinter-glass filter เบอร์ 3 โดยล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง ๆ ละ 70 มล. และล้างต่อด้วย 0.2M HCl 3 ครั้ง ๆ ละ 70 มล. แล้วนำเม็ดเดกซ์ตรานออกจากกรวยมาแช่ใน 0.2M HCl 70 มล. อุ่นที่ 50°ซ เป็นเวลา 2 ชม. บนเครื่องเขย่า จากนั้นจึงล้างเม็ดเดกซ์ตรานด้วยน้ำจนหมดกรด และล้างต่อด้วย $PBS_{0.15}$ 3 ครั้ง ๆ ละ 70 มล. แล้วปล่อยให้เม็ดเดกซ์ตรานนอนก้นใน $PBS_{0.15}$ และอ่านปริมาตรนอนก้นได้ 30.0 มล. เติม $PBS_{0.15}$ จนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 60.0 มล. คนแล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เก็บไว้ทดสอบเป็นเม็ดเดกซ์ตรานที่อุ่นกับกรดและอยู่ใน 0.15 โมลาร์เกลือแกง ส่วนที่ 2 นำมาล้างด้วย $PBS_{1.0}$ 3 ครั้ง ๆ ละ 30 มล. แล้วแช่ใน $PBS_{1.0}$ ที่มีปริมาตรเท่ากับปริมาตรนอนก้นของเม็ดเดกซ์ตรานที่ล้างแล้วนั้น เก็บไว้ทดสอบเป็นเม็ดเดกซ์ตรานที่อุ่นกับกรดและอยู่ใน 1.0 โมลาร์เกลือแกง

วิธีทดสอบ

ผสมสิ่งที่สกัดได้จากพืชซึ่งผ่านการไดอะไลซ์ โดยแช่ใน $PBS_{0.15}$ เรียบร้อยแล้วกับเม็ดเดกซ์ตราน ดังตาราง 2.4 ชุดควบคุมเป็นชุดที่ไม่ใส่เม็ดเดกซ์ตรานใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเลคตินที่เติมลงไป ส่วนชุดทดสอบใส่เม็ดเดกซ์ตรานชนิดธรรมชาติหรือชนิดที่อุ่นกับกรด ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแกงในขณะที่เลคตินจับกับเม็ดเดกซ์ตรานเป็น 0.15 และ 1.0 โมลาร์ แต่เนื่องจากสิ่งที่สกัดได้จากพืชอยู่ในสารละลายที่มี 0.15 โมลาร์เกลือแกง ดังนั้นในกรณีที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.0 โมลาร์เกลือแกง จึงต้องทำการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแกงโดยการเติม $PBS_{2.7}$ ลงในสิ่งที่สกัดได้จากพืชก่อนนำไปจับกับเม็ดเดกซ์ตราน เตรียมสิ่งที่สกัดได้จากพืชให้มีความเข้มข้นของเกลือแกงตามต้องการ แล้วเติมเม็ดเดกซ์ตรานลงไป เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นทำให้เม็ดเดกซ์ตรานนอนก้นโดยนำไปเหวี่ยงหนีศูนย์ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลาสั้น ๆ นำส่วนใสไปทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มตามข้อ 2.9 โดยใช้เลือดกลุ่มเอในการทดสอบ เปรียบเทียบค่าไตเตอร์ที่ได้กับค่าไตเตอร์ของชุดควบคุม ถ้าน้อยกว่าแสดงว่าเลคตินจับกับเม็ดเดกซ์ตราน

ตาราง 2.4 การทดสอบการจับของเลคตินกับเม็ดเดกซ์ตราน

หลอดที่	เม็ดเดกซ์ตราน			สิ่งสกัดจากพืช (มล.)	$PBS_{2.7}$ (มล.)	$PBS_{1.0}$ (มล.)	$PBS_{0.15}$ (มล.)
	สภาพ	เกลือแกง (โมลาร์)	ปริมาตร (มล.)				
1	ชุดควบคุม	0.15	-	1	-	-	2
2	ชุดควบคุม	1.0	-	1	0.5	1.5	-
3	ธรรมชาติ	0.15	1	1	-	-	1
4	ธรรมชาติ	1.0	1	1	0.5	0.5	-
5	อุ่นกับกรด	0.15	1	1	-	-	1
6	อุ่นกับกรด	1.0	1	1	0.5	0.5	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.15 การทดสอบการจับของเลคตินกับเม็ดอะกาโรส

การเตรียมเม็ดอะกาโรสและการอุ่นกับกรด

ตวงเม็ด Sepharose 4B ปริมาตรประมาณ 50 มล. ล้างใน sinter-glass filter เบอร์ 3 ด้วยน้ำ 3 ครั้ง ๆ ละ 100 มล. แล้วล้างต่อด้วย $PBS_{0.15}$ 3 ครั้ง ๆ ละ 100 มล. ตั้งไว้ให้นอนก้นเพื่ออ่านปริมาตรแล้วเติม $PBS_{0.15}$ ให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเป็นสองเท่าของปริมาตรนอนก้นของเม็ดอะกาโรส คนให้เม็ดอะกาโรสกระจายอย่างสม่ำเสมอแล้วแบ่งเป็น 4 ส่วน

ส่วนที่ 1 เก็บไว้ทดสอบ เป็นเม็ดอะกาโรสธรรมชาติใน 0.15 โมลาร์เกลือแกง

ส่วนที่ 2 ล้างด้วย $PBS_{1.0}$ ตามข้อ 2.14 แล้วเก็บไว้ทดสอบเป็นเม็ดอะกาโรสธรรมชาติใน 1.0 โมลาร์เกลือแกง

ส่วนที่ 3 และ 4 นำไปอุ่นกับกรดตามข้อ 2.14 แล้วเก็บไว้ทดสอบเป็นเม็ดอะกาโรสที่อุ่นกับกรด และอยู่ใน 0.15 และ 1.0 โมลาร์เกลือแกง ตามลำดับ

วิธีทดสอบ

เตรียมส่วนผสม และทำการทดสอบการจับของเลคตินกับเม็ดอะกาโรส ด้วยวิธีเดียวกับการจับของเลคตินกับเม็ดเดกซ์ตรานในข้อ 2.14

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved