บทที่ 4

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างพยาธิระยะโตเต็มวัย

1.1 จากท่อน้ำดีภายในตับของศพที่ถูกผ่าเพื่อชันสูตรจากภาควิชาพยาธิวิทยา และนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รวม 3 ราย

รายที่ 1 ผู้ตายเพศชาย อายุ 27 ปี มีภูมิลำเนาอยู่ที่ ต.บ้านหว้า อ.เมือง จ.ขอนแก่น ถึงแก่กรรมเนื่องจากประสบอุบัติเหตุรถยนต์ชน

รายที่ 2 ผู้ตายเพศหญิง อายุ 50 ปี มีภูมิลำเนาอยู่ที่ ต.บ้านไผ่ อ.บ้านไผ่ จ.ขอนแก่น ถึงแก่กรรมเนื่องจาก โรคมะเร็งตับ

รายที่ 3 ผู้ตายเพศหญิง มีภูมิลำเนาอยู่ที่ ต.ศรีชมภู อ.ศรีชมภู จ.ขอนแก่น ถึงแก่กรรมเนื่องจากป่วยด้วยโรคนิวมอเนีย

1.2 จากน้ำดีของผู้ป่วยเข้ารับการผ่าตัด ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รวม 3 ราย

รายที่ 1 ผู้ป่วยเพศชาย อายุ 55 ปี มีภูมิลำเนาอยู่ที่ ต.ผาเสวย อ.สมเด็จ จ.กาฬสินธุ์ รับการรักษาโรค มะเร็งในท่อน้ำดีตับ

รายที่ 2 ผู้ป่วยเพศหญิง อายุ 46 ปี มีภูมิลำเนาอยู่ที่ อ.สว่างดินแดง จ.สกลนคร รับการรักษาด้วยโรคเกี่ยวกับการอุดตันของทางเดินน้ำดี

รายที่ 3 ผู้ป่วยเพศชาย อายุ 71 ปี มีภูมิลำเนาอยู่ที่ ต.สารภี อ.เมือง จ.ขอนแก่น รับการรักษาด้วยโรค นิ่วในถุงน้ำดี

1.3 จากตับแฮมสเตอร์ ที่ถูกทำให้ติดเชื้อพยาธิ (infect) ด้วยระยะติดต่อของพยาธิ ดังนี้

1.3.1 วิธีการย่อยเอาพยาธิระยะติดต่อ (ซีสต์ระยะเมตาเซอคาเรีย)

นำปลาขาวนา ที่ได้จาก บ้านโนนสะอาด จ.ขอนแก่น ขนาดลำตัวกว้าง-ยาว เฉลี่ยประมาณ 2.2 x 8.3 ซม. ล้างให้สะอาด บดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า ในน้ำย่อยเปปซิน A ปริมาตรเท่าปลาที่บด (น้ำย่อยเปปซิน A เตรียมจาก เปปซิน A (BDH) 1.25 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 700 มล. เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.15 มล. และน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร) บดด้วยความแรงต่ำสุดนานประมาณ 30 วินาที เมื่อบดปลาละเอียดพอสมควรแล้ว เทใส่ในบิกเกอร์ขนาด 500 มล. เติมน้ำย่อยเปปซิน A ลงไปอีกสองเท่าของปริมาตรปลาบด คนให้เข้ากัน ปล่อยให้มีการย่อยในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking water bath) ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง น้ำย่อยเปปซินจะย่อยเนื้อปลา เพื่อให้ซิสต์ระยะเมตาเซอคาเรียของพยาธิ หลุดแยกออกจากกล้ามเนื้อปลา จากนั้นนำปลาบดที่ย่อยแล้วไปกรองผ่านตะแกรงลวดขนาดช่องประมาณ 1 x 1 มม. เพื่อแยกเอาชิ้นส่วนขนาดใหญ่ที่เหลือจากการย่อยออก นำส่วนที่ผ่านการกรองใส่เหยือกแก้วสำหรับตกตะกอนเติม 0.85 % สารละลายโซเดียมคลอไรด์-: Normal saline solution (NSS) ประมาณ 4 เท่าของปริมาตรของส่วนที่อยู่ในเหยือก ตั้งทิ้งไว้สักครู่ให้ซิสต์ตกตะกอน เทส่วนใสส่วนบนทิ้งจนเกือบหมด เหลือปริมาตรอยู่ประมาณ 1/5 ของปริมาตรเดิม เติม NSS ลงไปอีกพอสมควร ตั้งทิ้งไว้สักพัก เทส่วนบนทิ้ง ทำเช่นนี้สัก 1-2 ครั้งจน NSS ที่อยู่ชั้นบนค่อนข้างใส จึงนำไปกรองด้วยตะแกรงขนาดช่อง 300 ไมครอน นำส่วนที่ผ่านการกรองใส่เหยือกตกตะกอนใบใหม่ เติม NSS ลงไป 200 - 300 มล. ทิ้งไว้จนตกตะกอนดี ใช้พาสเจอร์ปิเปต ปลายเล็ก ๆ ดูดเอาส่วนที่อยู่ก้นเหยือก มาตรวจหาซิสต์ภายใต้กล้องสองตา แยกซิสต์ที่ได้ใส่ใน NSS แบ่งไว้ในจานแก้วเล็ก ๆ จานละ 100 ซิสต์

1.3.2 การทำให้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในแฮมสเตอร์

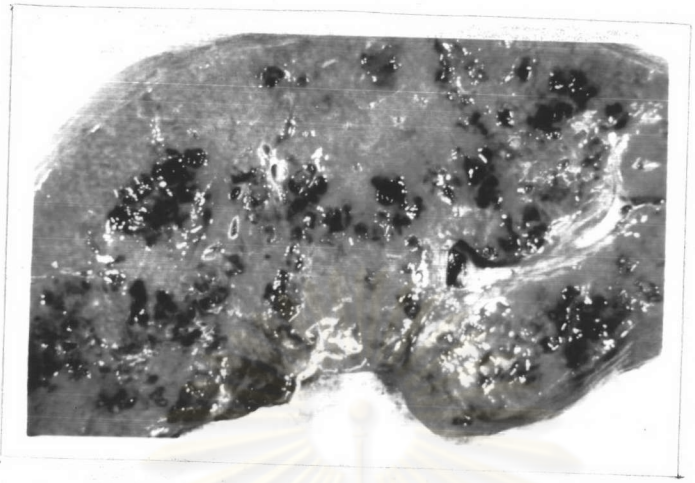
ใช้กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มล. ที่ต่อปลายเข็มด้วยท่อพลาสติกสีขาวเล็ก ยาว 3 นิ้ว ดูดซิสต์ทั้งหมดที่แยกไว้ ฉีดเข้าไปในกระเพาะอาหารของแฮมสเตอร์ตัวผู้ อายุประมาณ 3 เดือน ตามด้วย NSS ที่สะอาดฉีดอีกครั้ง แยกเลี้ยงแฮมสเตอร์แต่ละตัวนานประมาณ 4 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาที่พยาธิจะเจริญเติบโตจากระยะเมตาเซอคาเรียจนเป็นตัวโตเต็มวัย และสืบพันธุ์ออกไข่ได้ ตรวจหาไข่ของพยาธิจากอุจจาระแฮมสเตอร์โดยวิธีฟอร์มาลิน-อีเธอร์ เทคนิค (formalin-ether technique)

(Wykoff et al, 1965) ถ้าพบไข่พยาธิ แสดงว่าการทำให้ติดเชื้อได้ผล และพยาธิที่อยู่ในตับเจริญเป็นตัวโตเต็มวัยแล้ว แต่เพื่อให้พยาธิมีขนาดโตขึ้น จึงเลี้ยงแฮมสเตอร์อีกนาน 12 สัปดาห์ ก่อนที่จะฆ่าเพื่อผ่าเอาตับออกมาเก็บตัวอย่างพยาธิมาศึกษา

2. วิธีเก็บตัวอย่างพยาธิ

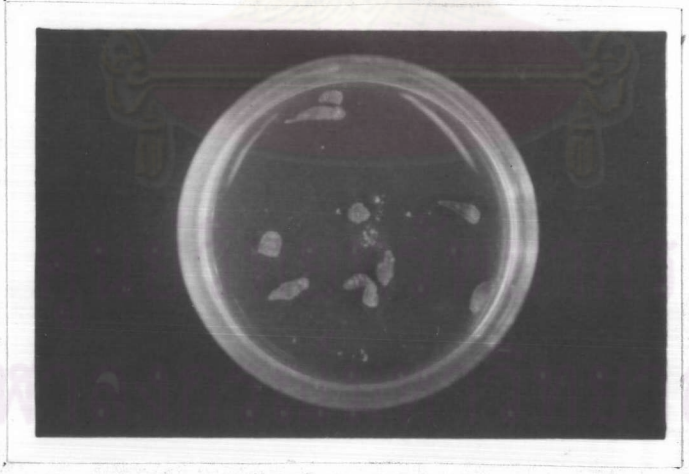
2.1 จากท่อน้ำดีภายในตับของศพที่ถูกผ่าเพื่อชันสูตร

นำตับที่ได้มาหั่นตามขวางเป็นชิ้น ๆ หนาประมาณ 2 ซม. ใส่ในถาดอลูมิเนียมขนาดกว้าง 10.5 นิ้ว ยาว 16.5 นิ้ว สูง 3 นิ้ว ที่มี NSS อยู่มากพอ ท่วมชิ้นตับที่ใส่ลงไป ค่อย ๆ บีบชิ้นตับที่หั่นไว้ที่ละชิ้น โดยมีบีบเข้าหากันทางด้านข้างหรือค่อย ๆ กดลงบนด้านหน้าตัดของชิ้นตับด้านใดด้านหนึ่ง เพื่อให้พยาธิที่อยู่ตามท่อน้ำดีภายในตับหลุดออกมาจากตับ ทั้งนี้การบีบตับจะต้องทำภายใต้ NSS ที่ท่วมอยู่เสมอ พยาธิที่หลุดออกมาจะตกสู่ก้นถาด ตั้งถาดทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้พยาธิตกสู่ก้นถาดให้หมดค่อย ๆ เทเปลี่ยน NSS ใหม่หลาย ๆ ครั้งจนหมดสีของเลือดที่ปนเห็นพยาธิที่อยู่ก้นถาดได้ชัดเจน ใช้พู่กันเขี่ยพยาธิที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งสังเกตจากสีของตัวพยาธิ และการเคลื่อนไหวใส่ใน NSS ที่ปราศจากเชื้อ และมียาปฏิชีวนะ ซึ่งได้แก่ เพนนิซิลิน (pennicilin) ในปริมาณ 200 หน่วยต่อมล. และสเตร็ปโตมัยซิน (streptomycin) 200 ไมโครกรัมต่อมล. ประมาณ 5 มล. โดยแช่พยาธิไว้นานประมาณ 10 นาที ต่อจากนั้นใช้พู่กันค่อย ๆ เขี่ยพยาธิไปใส่แช่ใน NSS ที่ปราศจากเชื้อและมียาปฏิชีวนะในภาชนะใหม่ แช่ไว้อีก 20 นาที แล้วทำเช่นนี้อีกครั้งเพื่อล้างพยาธิให้สะอาด ต่อจากนั้นจึงนำพยาธิมาแช่ในน้ำเลี้ยงพยาธิ (Basal Medium Eagle (BME) ซึ่งเตรียมโดยใช้อาหารสำเร็จ BME ของบริษัท Gibco 1 ซอง (มีน้ำหนัก 9.2 กรัม ประกอบด้วย Earle's salt และL-glotamine) ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 700 มล. แล้วเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไป 2.2 กรัม ปรับความเป็นกรดด่าง ด้วย 1 N. HCl ให้เป็น 7.2 เติมเพนนิซิลิน และสเตร็ปโตมัยซิน ในอัตราส่วน 200 หน่วยต่อมล. และ 200 ไมโครกรัมตามลำดับ เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านเครื่องกรองมิลลิพอร์ (millipore) ขนาดช่อง 45 ไมครอน แช่พยาธิไว้ประมาณ 10 นาที จนพยาธิสามารถปรับตัวได้ดีแล้ว ใช้พู่กันที่สะอาดเขี่ยพยาธิใส่หลอดทดลองเลี้ยงเชื้อที่สะอาดปราศจากเชื้อหลอดละประมาณ 20 ตัว โดยใช้น้ำเลี้ยงอย่างน้อยประมาณ 0.25 มล. ต่อพยาธิ 1 ตัว (Tuti et al, 1982) ปิดฝาเกลียวหลอดหลวม ๆ เพื่อให้มีการถ่ายเทก๊าซได้ รีบนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37^{o}C ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 5 % ก่อนนำมาทำการศึกษาอีเล็คโตรฟอรีซีส



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงภาพถ่ายตับของคนที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับอาการรุนแรง



รูปที่ 4 แสดงภาพถ่ายพยาธิระยะโตเต็มวัยที่ได้จากตับศพที่ถูกผ่าเพื่อชันสูตร และเลี้ยงไว้ในน้ำเลี้ยง BME

2.2 จากน้ำดีของผู้ป่วยรับการผ่าตัด

พยาธิตัวโตเต็มวัยจะปะปนมากับน้ำดีที่ดูดออกมาจากท่อน้ำดีในตับของผู้ป่วยขณะทำการผ่าตัด จะต้องรีบนำมาแยกพยาธิออกจากน้ำดี โดยใช่พู่กันค่อย ๆ เขี่ยพยาธิออกจากน้ำดี มิให้พยาธิได้รับการบอบช้ำ นำไปใส่ใน NSS ที่ปราศจากเชื้อ แล้วดำเนินขั้นตอนการล้างและแยกเลี้ยงพยาธิเหมือนกับที่ทำในการเก็บพยาธิจากตับศพที่ผ่าเพื่อชันสูตรดังกล่าวแล้วใน 2.1

2.3 จากตับของแฮมสเตอร์

ฆ่าแฮมสเตอร์ที่ได้ทำให้มีการติดเชื้อพยาธิไว้นาน 12 สัปดาห์ ผ่าเอาตับออกมาแช่ใน NSS ใช้ปากคีบฉีกตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อให้พยาธิหลุดออกมา เขี่ยหาพยาธิด้วยเข็มเขี่ยและพู่กัน ใส่ใน NSS ที่สะอาดเพื่อนำไปศึกษาเอนไซม์โดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซีสต่อไป

3. วิธีเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับเซลลูโลสอะซีเตท อีเล็คโตรฟอรีซีส

3.1 ศึกษาเอนไซม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (GPI)

บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับแช่แผ่นเซลลูโลส อะซีเตท และอีเล็คโตรฟอรีซีส สำหรับศึกษาเอนไซม์นี้ เป็นบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน และมีความเข้มข้นเท่ากัน เตรียมจากบัฟเฟอร์สำเร็จรูป Supre-Heme Buffer No. 5802 ของบริษัท Helena Laboratries 1 ซอง ประกอบด้วย Tris EDTA และ Boric acid น้ำหนักรวมกัน 14.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร pH 8.3 เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4^{o} C ก่อนนำมาใช้

3.2 ศึกษาเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (PGM) และกลูโคส - 6 - ฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส (G-6PD)

บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับแช่แผ่นเซลลูโลส อะซีเตท และอีเล็คโตรดบัฟเฟอร์ สำหรับศึกษาเอนไซม์ทั้งสองนั้น เป็นบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน และความเข้มข้นเท่ากัน เตรียมตามวิธีของ Agatsuma และ Suzuki (1980) ดังนี้

สต๊อกบัฟเฟอร์

0.1 M Tris	หรือ	12.11	กรัม
0.1 M Maleic acid		11.6	กรัม
0.01 M Na_2EDTA		3.72	กรัม
0.01 M $MgCl_2$		2.03	กรัม
0.128 M NaOH		5.12	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร มี pH 7.1

เมื่อจะใช้เจือจาง 4 เท่า โดยใช้สต๊อกบัฟเฟอร์ 1 ส่วน น้ำกลั่น 3 ส่วน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^{o} C ก่อนนำมาใช้

4. วิธีเตรียมแชมเบอร์และแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท สำหรับทำอีเล็คโตรฟอรีซีส

4.1 เตรียมแชมเบอร์สำหรับทำอีเล็คโตรฟอรีซีส โดยเทบัฟเฟอร์ลงในช่องทั้งสองข้างของแชมเบอร์ (Gelman Instrument Co.) ข้างละประมาณ 50 มล. (ระดับบัฟเฟอร์สูงท่วมขดลวดตัวนำไฟฟ้าประมาณ 1/4 นิ้ว) แช่แผ่นกระดาษกรอง Whatman No. 4 ที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาดยาวด้านละ 5.8 ซม. ลงไปในแชมเบอร์ด้วยด้านละแผ่น เพื่อใช้เป็นสะพานให้ประจุไฟฟ้าเคลื่อนที่ได้ครบวงจร ปิดฝาครอบแชมเบอร์นำเข้าไว้ในตู้เย็น

4.2 แผ่นเซลลูโลสอะซีเตท

นำแผ่นเซลลูโลส อะซีเตท ชนิด Titan III Iso-Vis Cat No. 3000 ของบริษัท Helena Laboratries ซึ่งมีขนาด 76 x 60 มม. วางในตะแกรงสำหรับแช่แผ่นเซลลูโลสอะซีเตท (Soaking rack) แล้วนำไปวางไว้ในส่วนล่างของกล่องสำหรับใส่บัฟเฟอร์ ซึ่งมี 2 ส่วน แยกกันได้ เทบัฟเฟอร์ที่จะใช้ลงในกล่องส่วนบน บัฟเฟอร์จะค่อย ๆ ไหลลงสู่ส่วนล่าง และค่อย ๆ เพิ่มระดับในกล่องส่วนล่างทำให้แผ่นเซลลูโลส อะซีเตท ชุ่มด้วยบัฟเฟอร์อย่างสม่ำเสมอ การใช้เครื่องมือนี้ ช่วยให้แช่แผ่นเซลลูโลส อะซีเตทได้ดี ป้องกันมิให้อากาศแทรกอยู่ในแผ่นเซลลูโลส อะซีเตท ด้วย เมื่อบัฟเฟอร์ท่วมแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทดีแล้ว ทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที จึงนำมาใช้ได้

5. วิธีเตรียมไฮโมจิเนทของพยาธิเพื่อใช้ทดสอบเอนไซม์

ใช้ผู่กันเขี่ยพยาธิที่จะศึกษามาล้างด้วย NSSแล้วใส่ในสไลด์แก้วหลุมลึก หลุมละ 1 ตัว เติมสารละลาย 1 % Triton X 100 ใน Tris-Citric acid บัฟเฟอร์ (0.25 m Tris) ปรับความเป็นกรดเบสด้วย citric acid จนเป็น 7.4) ลงไป 8-10 ไมโครลิตร รีบบดพยาธิด้วยแท่งแก้วปลายมน จนได้ไฮโมจิเนทของพยาธิ ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดไฮโมจิเนทที่ได้ไปใส่ในช่องใส่สารตัวอย่าง ของแอพพลิเคเตอร์ (Gelman Instrument Co.) โดยใส่ไฮโมจิเนทจากพยาธิ 1 ตัว ใน 1 ช่องจะเป็นหมายเลขกำกับอยู่ตั้งแต่ช่อง 1 ถึง 8 จนครบทุกช่อง ทุกขั้นตอนต้องทำบนน้ำแข็ง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสูญเสียคุณสมบัติของเอนไซม์

6. วิธีแยกแถบไอโซไซม์ โดยเซลลูโลส อะซีเตท อีเล็คโตรฟอรีซีส

6.1 การแอพพลาย (apply) ไฮโมจิเนทของพยาธิบนแผ่นเซลลูโลส อะซีเตท แล้วแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

นำแผ่นเซลลูโลสที่แช่ไว้มา 1 แผ่น ตัดปลายด้านที่จะแอพพลาย หมายเลข 1 เพื่อเป็นที่สังเกต ซับด้วยกระดาษกรองอย่างหนา What man No.1 แล้วรีบนำไปวางบนแท่นสำหรับแอพพลาย กดแอพพลิเคเตอร์ (applicator) ลงในช่องใส่ตัวอย่างที่ใส่ไฮโมจิเนทของพยาธิไว้เรียบร้อยแล้ว 1 ครั้ง รีบนำไปกดลงบนแผ่นเซลลูโลส อะซีเตท 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันประมาณ 2 วินาที แอพพลายครั้งหนึ่งจะได้ 8 ตัวอย่าง ใช้ปากกาสีจุดทำเครื่องหมายแนบที่แอพพลายไว้ด้านหลัง แผ่นเซลลูโลส อะซีเตท เพื่อเป็นที่สังเกตแนวเริ่มต้นการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ ควำด้านที่แอพพลายลงบนแท่นให้สัมผัสกับแผ่นกระดาษกรองที่ทำหน้าที่เป็นสะพานไฟซึ่งได้แช่ไว้ในแชมเบอร์ และนำขึ้นมาวางทาบบนแท่นทั้ง 2 ด้าน โดยให้ปลายทั้งสองด้านของแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทสัมผัสกับแผ่นสะพานอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษามีการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปหาขั้วบวกทั้งหมด ดังนั้นการแอพพลาย และการวางแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทเพื่อทำอีเล็คโตรฟอรีซีส จึงวางให้ด้านที่แอพพลาย อยู่ใกล้มาทางขั้วลบให้มาก ให้แนวการแอพพลายห่างจากแนวสะพานไฟประมาณ 5 มม. ถ้าแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทไม่เรียบตรงและไม่สัมผัสกับกระดาษกรองที่เป็นสะพานไฟอย่างสม่ำเสมอ ใช้แผ่นพลาสติกเล็ก ๆ ทับด้านบนอีกที ปิดฝาครอบแชมเบอร์ต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ให้กระแสไฟฟ้าชนิดตรง ปรับความ

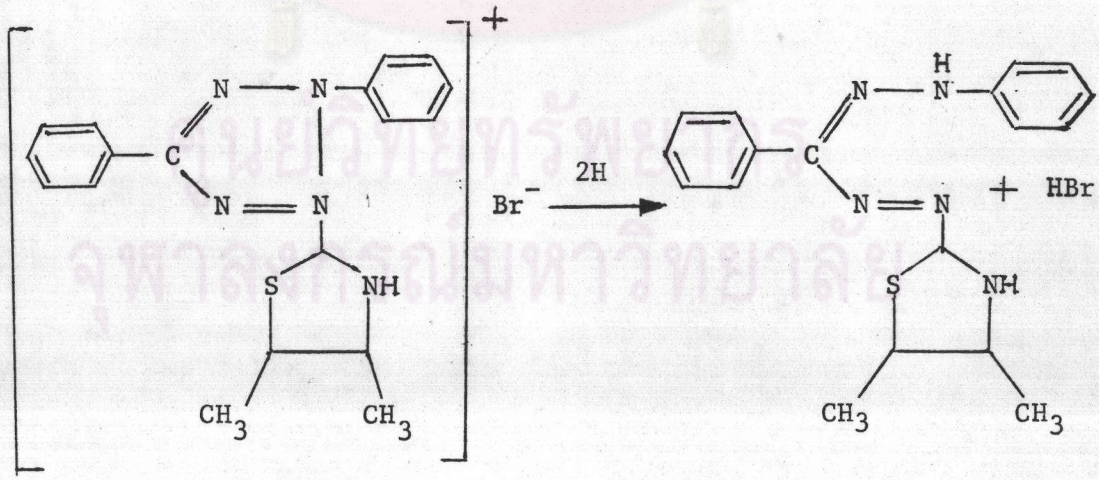
ต่างศักย์ และใช้เวลาในการทำอีเล็คโตรฟิรีซีส สำหรับแต่ละเอนไซม์ดังนี้

เอนไซม์ กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใช้ความต่างศักย์คงที่ที่ 250 โวลท์ นาน 40 นาที มีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านประมาณ 2 มิลลิแอมแปร์

เอนไซม์ ฟอสโฟกลูโคมิวเตส และเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส ใช้ความต่างศักย์คงที่ที่ 150 โวลท์ นาน 30 นาที มีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านประมาณ 5-6 มิลลิแอมแปร์

6.2 การย้อมสีเพื่อหาตำแหน่งของไอโซไซม์

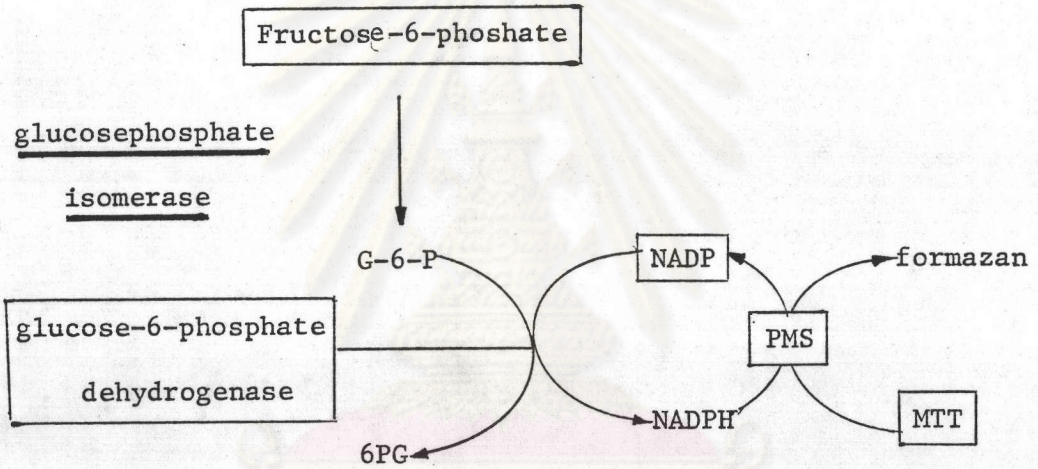
ย้อมสีโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ (activity stain) ด้วยสีประเภทอีเล็คตรอน ทรานสะเฟอ ดาย สเตนนิ่ง (electron transfer dye staining) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Harris and Hopkinson (1976) สีที่ใช้ย้อมคือ เมชิลไทอะโซลิล เตตระโซเลียม (methyl thiazolyl tetrazolium หรือ MTT) เป็นตัวรับอีเล็คตรอนสำหรับปฏิกิริยา ดีไฮโดรจิเนส ซึ่ง MTT จะถูกรีดิวส์ โดยอีเล็คตรอนโดนเนอร์ไปเป็นฟอร์มาซาน (formazan) ที่ไม่ละลายน้ำมีสีม่วงแกมน้ำเงิน ปฏิกิริยานี้มีฟีนาซีน เมโธซัลเฟต (phenazine methosulfate หรือ PMS) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (แผนภาพที่ 2)



แผนภาพที่ 2 แสดงการเกิดฟอร์มาซานโดยปฏิกิริยารีดักชันของ MTT

6.2.1 ย้อมเอนไซม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (GPI)

เอนไซม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (F-6-P) เป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต (G-6-P) สามารถตรวจหาไอโซไซม์โดยดูสีม่วงของฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ดำเนินต่อไปโดย เอนไซม์ กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนสที่เติมไปในสีย้อม จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคส-6-ฟอสเฟต เป็น 6-ฟอสโฟ-กลูโคเนท ซึ่งเป็นปฏิกิริยา ออกซิไดรีดักชั่น และมีการส่งผ่านอีเล็คตรอนให้ MTT โดยมี NADP เป็นโคเอนไซม์ เกิดเป็นฟอร์มาซานดังแผนภาพที่ 3



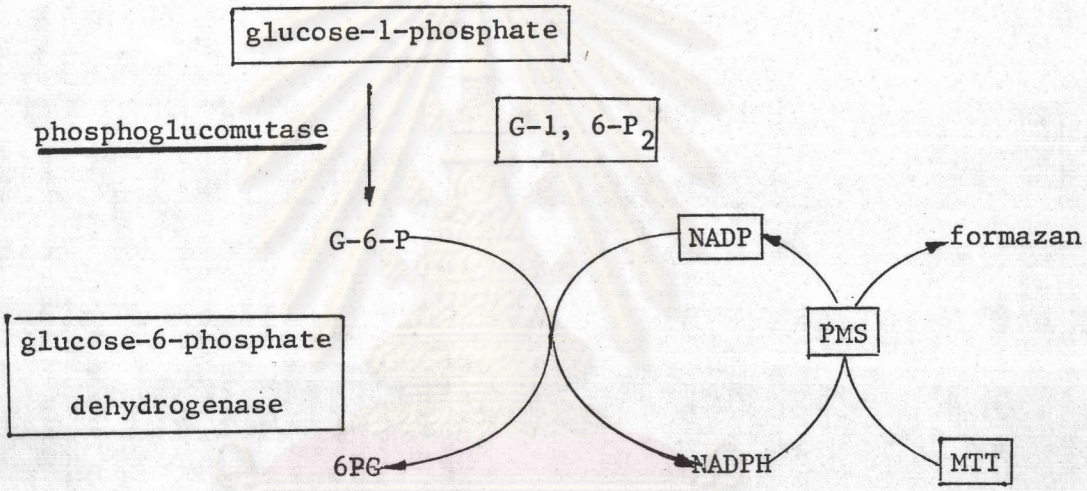
แผนภาพที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการเกิดฟอร์มาซานในการย้อมเอนไซม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส

ส่วนประกอบของสีย้อม

tris-HCl buffer pH 8.0	2	มล.
fructose-6-phosphate	25	มก.
NADP	5	มก.
MTT	5	มก.
PMS	2	มก.
glucose-6-phosphate dehydrogenase	10	ไมโครลิตร

6.2.2 ย้อมเอนไซม์ฟอสโฟกลูโค มิวเตส (PGM)

เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน กลูโคส-1-ฟอสเฟต (G-1-P) เป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต (G-6-P) ร่วมกับกลูโคส-1,6-ไดฟอสเฟต ($G-1,6-P_2$) การตรวจหาไอโซไซม์อาศัยการเกิดฟอร์มาซาน จากปฏิกิริยาออกซิไดรีดักชันของการเปลี่ยนกลูโคส-6-ฟอสเฟต ที่เกิดขึ้นเป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนท ซึ่งมีเอนไซม์ กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ที่เติมไปในสีย้อม เร่งปฏิกิริยาอีกทอดหนึ่ง โดยมี NADP เป็นโคเอนไซม์ ส่งผ่านอีเล็คตรอนให้ MTT เกิดเป็นฟอร์มาซานดังแผนภาพที่ 4



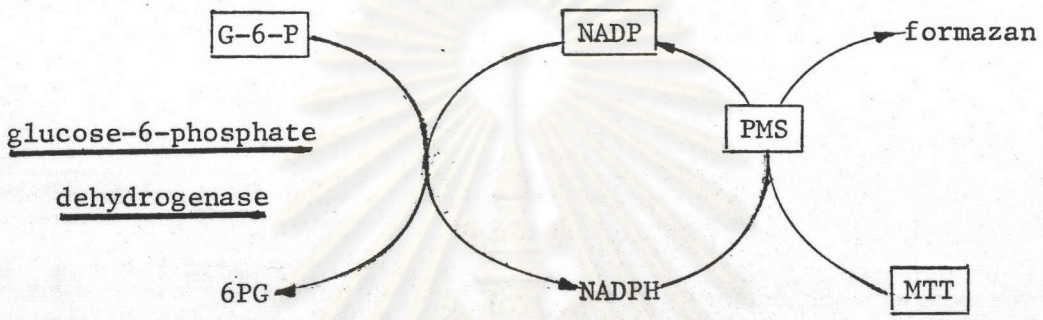
แผนภาพที่ 4 แสดงปฏิกิริยาการเกิด ฟอร์มาซานในการย้อมเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส

ส่วนประกอบของสีย้อม

tris-HCl buffer pH 8.0	2	มล.
glucose-1-phosphate	5	มก.
NADP	5	มก.
MTT	5	มก.
PMS	2	มก.
$MgCl_2$	10	มก.
glucose-6-phosphate - dehydrogenase	10	ไมโครลิตร

6.2.3 ย้อมเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส (G-6PD)

เอนไซม์-กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน กลูโคส-6-ฟอสเฟต (G-6-P) เป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนท ตรวจหาไอโซไซม์ โดยอาศัยการเกิดฟอร์มาซาน จากปฏิกิริยาออกซิโดรีดักชัน ซึ่งมี NADP เป็นโคเอนไซม์ ส่งผ่านอีเล็คตรอนให้ MTT เกิดเป็นฟอร์มาซานดังแผนภาพที่ 5



แผนภาพที่ 5 แสดงการเกิดฟอร์มาซานในการย้อมเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส

ส่วนประกอบของสีย้อม

tris-HCl buffer pH 8.0	2	มล.
glucose-6-phosphate	10	มก.
NADP	5	มก.
MTT	5	มก.
PMS	2	มก.
$MgCl_2$	10	มก.

6.2.4 วิธีเตรียมสารละลายสีย้อมและเทคนิคการย้อม

ละลายส่วนประกอบสีย้อมใน 0.05 M tris-HCl buffer pH 8.0 2 มล. นอกจาก PMS และเอนไซม์ ที่ต้องเติมในตอนหลังนำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทที่ผ่านกระแสไฟฟ้าแล้ว และอีกแผ่นที่แช่ด้วยบัฟเฟอร์เดียวกัน ตั้งแต่เริ่มการทดลอง มาซับให้หมาด ๆ วางแผ่นเซลลูโลส อะซีเตท ที่ผ่านกระแสไฟฟ้าแล้วบนกระดาษกรองซึ่งวางอยู่บนแผ่นกระจก เทสีย้อม

ซึ่งใส่ PMS (และบางกรณีที่มีเอนไซม์เพิ่ม) แล้ว บนแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทที่วางอยู่บนกระจกดังกล่าว แล้วนำแผ่นเซลลูโลส อะซีเตท อีกแผ่นวางประกบจากขอบบนก่อน แล้วค่อย ๆ ไล่ลงมา ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปิดทับด้วยกระดาษกรอง และแผ่นกระจกใสอีกแผ่น นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37^{o}C ทับกระจกที่ประกบแผ่นคู่ของเซลลูโลส อะซีเตท ด้วยวัตถุหนักประมาณ 9 กก. ใช้เวลาย้อม 3-6 นาที แล้วแต่เอนไซม์ นำแผ่นเซลลูโลสทั้ง 2 แผ่น แช่ในน้ำสะอาด เขย่าไปมาเพื่อล้างเอาสีย้อมส่วนเกินที่เหลือออกไป จนน้ำที่ล้างใส จะเห็นแถบสีม่วงน้ำเงินของไอโซไซม์ได้ชัดเจน ทำการบันทึกผลได้ ถ้าต้องการเก็บไว้นาน ๆ ควรนำแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทนั้นไปแช่ใน 75 % glycerol สัก 5-10 นาที จึงเก็บใส่ของพลาสติกที่ปิดสนิท

7. วิธีอ่านและบันทึกผลการทดลอง

7.1 การอ่านผลการทดลอง ดูแถบสีม่วงของฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นดังนี้

1. ดูทิศทางการเคลื่อนที่ของแถบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นว่าเคลื่อนที่ห่างจากแนวเริ่มต้นหรือไม่ ไปทางขั้วบวกหรือขั้วลบ

2. นับจำนวนแถบไอโซไซม์ที่ปรากฏบนแผ่นเซลลูโลส อะซีเตท และวัดระยะทางที่แต่ละแถบเคลื่อนห่างจากแนวเริ่มต้น

3. ดูประสิทธิภาพการทำงานของแต่ละแถบไอโซไซม์ โดยดูจากความเข้มของสีฟอร์มาซาน ถ้าเข้มแสดงว่าทำงานได้ดี ถ้าสีจางแสดงว่าประสิทธิภาพการทำงานไม่ดีนัก

4. เรียกชื่อรูปแบบของไอโซไซม์ที่พบในเอนไซม์แต่ละชนิดจากความแตกต่างที่สังเกตได้จากข้อ 1 ถึง 3 เป็นรูปแบบที่ 1, 2 ตามลำดับการพบไอโซไซม์แบบนั้น ๆ ตามลำดับก่อนหลังในการศึกษา

5. จำแนกพยาธิที่นำมาศึกษาทั้ง 168 ตัว ออกเป็นไทพ์ย่อย ตามรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ทั้งสามชนิดที่พบในพยาธิแต่ละตัว

7.2 การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกจำนวนแถบของไอโซไซม์ ตลอดจนระยะทางที่เคลื่อนที่ห่างจากแนวเริ่มต้น ในไอโซไซม์แต่ละรูปแบบ

2. เขียนแผนภาพแสดงความแตกต่างของกลุ่มไอโซไซม์ของแต่ละเอนไซม์

3. แสดงผลการตรวจพบรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์แต่ละชนิดในพยาธิแต่ละตัวที่นำมาศึกษา ว่าพบรูปแบบไอโซไซม์เป็นแบบใด

4. แสดงตารางการจำแนกพยาธิออกเป็นไทพ์ต่อย ตามผลที่ได้จากการอ่านผลการทดลองในข้อ 5

5. ถ่ายภาพขาวดำ และสไลด์ของตัวอย่างรูปแบบไอโซไซม์ไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย