บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมี

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Merck, Germany
Acetonitrile	Sigma Chemical Co.
Acetylthiocholine iodide	Sigma Chemical Co.
Bendiocarb	British Greyhound, U.K
Bio-rad dye reagent	Bio-rad Laboratories
Bovine serum albumin	Sigma Chemical Co.
1-Chloro 2, 4, dinitrobenzene	Sigma Chemical Co.
Chloroform	BDH
Dicofol	British Greyhound U.K
5,5'Dithio-bis(2-Nitrobenzoic acid)	Sigma Chemical Co.
[1,1-Dichloro-2,2-bi[p-Chlorophenyl]ethylene	British Greyhound U.K
Diazenon	British Greyhound U.K
Dithiothreitol	Sigma Chemical Co.
Ethylene diaminetetraacetic acid	Sigma Chemical Co.
Formic acid	Merck, Germany
Glutathione (reduced form)	Sigma Chemical Co.
Glycerol	Merck, Germany
Hydrochloric acid	Merck, Germany
Isopropanol	Merck, Germany
Methanol (HPLC grade)	JT Baker
Permethrin	British Greyhound U.K
Phenylmethylsulfonylfluoride	Sigma Chemical Co.
p-nitrophenyl acetate	Sigma Chemical Co.
Polyvinylpyrolidone	Aldrich Chemical Co.
Sumithion	British Greyhound U.K

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Sodium chloride	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate	Sigma Chemical Co.
Sodium hydrogen phosphate	Sigma Chemical Co.
Sodium dithionite	Riedl-Dettaen
Sodium hydroxide	Sigma Chemical Co.
Sucrose	Sigma Chemical Co.
Sulfuric acid	Merck, Germany
Temephos	British Greyhound
1,1,1 Trichloro-2,2-bi-[*p*-Chlorophenyl]ethylene	British Greyhound
Tris[hydroxymethyl]amino-methane)	Sigma Chemical Co.
Triton X-100	Merck, Germany

อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทที่ผลิต
เครื่องมือทดสอบขององค์การอนามัยโลก (WHO standard susceptibility test kit)	WHO
เครื่องชั่งอย่างหยาบ (2 ตำแหน่ง)	METTLER TOLEDO AG 204 U.S.A
เครื่องชั่งอย่างละเอียด (4 ตำแหน่ง)	METTLER TOLEDO PB1502 U.S.A
Centrifuge Model HN-S centrifuge	International equipment company U.S.A
Ceres UV 900 Hdi microplate reader	Bio-tek Instruments Inc, U.S.A
High speed centrifuge	Biofuge A ของ Hareus sepatech
Ultracentrifuge Centrikon T-1180	KONTRON, U.S.A
Scanning UV-VIS spectrophotometer	Bekman, U.S.A
pH meter	Bekman, U.S.A
Homogenizer	FISHER, U.S.A
Glass homogenizer with a motor-driven Teflon pestle	WHEATON, U.S.A
Electronic mixer JANKE and KUNKELGMBH CO.	IKA-Labortechnik, U.S.A
Magnetic stirrer	FISHER, U.S.A
เครื่อง HPLC	WATERS
- piston pump model 510	
- multiwavelength detector model 490	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

- automated gradient controller model 680
- data module model 745
- rheodyne fixed loop injector
- column NOVAPAK C18

2.2 ยุง

ชนิดและสายพันธุ์ยุง

ยุงลาย (*Ae. aegypti*) ที่นำมาศึกษามี 3 สายพันธุ์ คือ 1) สายพันธุ์ RddtSper เป็นยุงลายสายพันธุ์ที่ดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงดีดีทีแต่ไวต่อเพอร์เมทธิน 2) สายพันธุ์ RddtRper เป็นยุงลายสายพันธุ์ที่ดื้อต่อดีดีทีและเพอร์เมทธิน 3) สายพันธุ์ SddtSper เป็นยุงลายสายพันธุ์ที่ไวต่อสารเคมีฆ่าแมลงทั้งสองชนิด สายพันธุ์ที่ 1 และ 2 เป็นยุงที่จับจากหมู่บ้านป่างไม้แดง อ. เมือง จ.เชียงใหม่ และนำมาคัดเลือกโดย ผศ.ดร.ปรัชญา สมบูรณ์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสายพันธุ์ที่ 3 ได้มาจาก Professor. Janet Hemingway ; Cardiff School of Biosciences, Cardiff University U.K. ทั้งสามสายพันธุ์เลี้ยงในห้องเลี้ยงยุงของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มีอุณหภูมิ 25 - 27 ° C ความชื้นสัมพัทธ์ 70 - 80 % และแสงสว่าง 14 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงนำไข่ที่เก็บได้ใส่ลงในภาชนะที่มีน้ำใส สะอาด ภายใน 1 วันไข่จะแตกออกกลายเป็นลูกน้ำ จากนั้นให้อาหารเป็นอาหารสุนัขที่บดละเอียด ระยะลูกน้ำต้องระมัดระวังไม่ให้น้ำขุ่นและสกปรก หากสกปรกมีฝ้าต้องทำการเปลี่ยนน้ำทันที ลูกน้ำลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ประมาณ 5-7 วันก็จะเปลี่ยนแปลงเป็นตัวโม่งระยะนี้จะพักและไม่กินอาหารเลย ใช้หลอดดูดตัวโม่งใส่ถ้วยนำเข้ากรงที่มีขนาด 30 x 30 x 30 ซม. ใช้เวลา 3 - 4 วันตัวเต็มวัยจึงลอกคราบออกมา อาหารของตัวเต็มวัยคือน้ำหวานที่ผสมวิตามินรวม โดยนำเอาสำลีพันปลายไม้ แล้วจุ่มลงในขวดเล็ก ๆ ที่ใส่น้ำหวานที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว ทำการเปลี่ยนน้ำหวานทุก ๆ สองวัน ยุงลายจะผสมพันธุ์ทันทีที่กลายเป็นตัวเต็มวัยและยุงตัวเมียต้องการเลือดเพื่อนำโปรตีนจากเลือดไปทำให้ไข่สุก นำเอาหนู rat ที่วางยาสลบแล้วเข้ากรง เพื่อที่ยุงจะได้กินเลือดหนู ประมาณ 3 วันหลังจากกินเลือด ยุงจะวางไข่ให้เตรียมถ้วยใส่น้ำด้านข้างบุด้วยกระดาษและชุบน้ำให้เปียกชุ่มตั้งทิ้งไว้ให้ยุงได้วางไข่ ไข่ของยุงลายจะมีลักษณะสีดำ แยกเป็นฟองเดี่ยว ๆ ติดกับกระดาษที่เตรียมไว้ เก็บกระดาษที่มีไข่ยุงติดไว้ ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สามารถเก็บไข่ได้นานประมาณ 2-3 เดือน ยุงตัวเต็มวัยส่วนหนึ่งจะเก็บไว้ในกรงเป็นพ่อแม่พันธุ์ อีกส่วนหนึ่งจะเก็บใส่ตู้แช่แข็ง –70 °C เพื่อนำมาทำการทดลองต่อไป โดยเก็บที่ระยะต่างๆต่อๆไปนี้ :ลูกน้ำ, ตัวโม่ง, ตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน 7 วัน และ 14 วันใน

ตัวเต็มวัยจะแยกตัวผู้และตัวเมีย เก็บใน microtube ขนาด 1.5 ml 10 ตัวต่อหลอดในสภาวะที่ไม่มีน้ำ แช่แข็งที่อุณหภูมิ –70° C

อุปกรณ์ทดสอบความไวของยุง

อุปกรณ์ทดสอบความไวต่อสารเคมีฆ่าแมลงของยุงเรียกว่า WHO standard susceptibility test kit ประกอบด้วยหลอดพลาสติกกลมขนาดสูง 12.5 ซม. รัศมี 4.4 ซม. ปลายหลอดทั้งสองด้านเปิด-ปิดได้ โดยมีลักษณะเป็นเกลียวหมุน การทดลองแต่ละครั้งจะใช้หลอดพลาสติกซึ่งมีจุดกลมสีแดงกำกับไว้ข้างหลอด หลอดจุดสีแดงนี้จะใช้สำหรับใส่ยุงให้สัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่างๆ ในการทดลองนี้ใช้ DDT ในความเข้มข้นมาตรฐาน 4 % และ permethrin ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.25 % หลอดพลาสติกอีกอันหนึ่งจะมีจุดกลมสีเขียวกำกับไว้ข้างหลอดเป็นสัญลักษณ์ว่าปลอดจากสารเคมีที่ใช้สำหรับเป็นหลอดเปรียบเทียบ (control) และเป็นหลอดเก็บยุงหลังจากสัมผัสกับกระดาษทดสอบ แล้วนำไปเลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีฝาเลื่อนปิดเปิด ซึ่งด้านบนทาสีเขียวและด้านล่างทาสีแดงโดยทาไว้ที่มุมด้านหนึ่ง ฝาเลื่อนนี้จะมีเกลียวสำหรับหลอดพลาสติกกลมได้ทั้งสองด้าน มีห่วงสปริงเป็นวงกลมขนาดเท่าเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดพลาสติก ห่วงสปริงนี้ทำด้วยทองแดงใช้สำหรับหนีบกระดาษชุบสารเคมีฆ่าแมลงในหลอดพลาสติกจุดสีแดง ส่วนในหลอดจุดสีเขียวเป็นกระดาษธรรมดาที่ไม่มีสารเคมีฆ่าแมลงใด ๆ

2.3 วิธีการทดสอบความไวต่อสารเคมีฆ่าแมลงของยุงตัวเต็มวัย (WHO, 1963)

ขั้นตอนในการทดสอบมีดังต่อไปนี้

(1) เอากระดาษสะอาดบุหลอดพลาสติกที่มีจุดกลมเขียว ใช้ห่วงสปริงยึดกระดาษให้แนบสนิทกับหลอดพลาสติก

(2) บุหลอดพลาสติกที่มีจุดสีแดงด้วยกระดาษชุบสารเคมีฆ่าแมลงดีดีที 4 % หรือเพอร์เมทธิน 0.25% แล้วยึดด้วยห่วงกลมเช่นกัน

(3) ดูดยุงตัวเมียอายุ 1 วัน จำนวน 25 ตัว โดยใช้ sucking tube ดูดใส่ในหลอดที่มีจุดกลมเขียวซึ่งมีฝาเลื่อนปิดเปิด การดูดยุงควรทำเบาๆมิฉะนั้นยุงอาจบอบช้ำและตายได้

(4) นำหลอดที่มีจุดกลมแดงที่ใส่กระดาษชุบสารเคมีฆ่าแมลงที่ต้องการทดสอบมาต่อเข้าอีกด้านหนึ่งของฝาเลื่อน หมุนเกลียวให้แน่นแล้วเลื่อนฝาซึ่งมีรูขนาดใหญ่เท่ากับปากหลอดพลาสติกให้ตรงกันแล้วจึงเป่าเบาๆ เพื่อไล่ยุงจากหลอดจุดสีเขียวไปยังหลอดจุดสีแดงให้หมดแล้วจึงปิดฝากั้น

(5) ปล่อยให้ยุงสัมผัสกับกระดาษชุบสารเคมีฆ่าแมลงตามที่องค์การอนามัยโลกกำหนด สำหรับยุงลายให้สัมผัสดีดีทีนาน 30 นาที โดยให้หลอดอยู่ในแนวตั้ง ส่วนเพอร์เมทธินนาน 60 นาทีและให้หลอดอยู่ในแนวนอน เมื่อครบกำหนดแล้วเป่ายุงกลับไปยู่ในหลอดจุดสีเขียว

(6) เลี้ยงยุงในหลอดจุดเขียว 24 ชั่วโมงด้วยน้ำหวาน หลังจากนั้นนับจำนวนยุงที่ตายรวมทั้งที่บินไม่ได้

ในการทดสอบแต่ละครั้งต้องมีการทดสอบเปรียบเทียบ เพื่อนำไปคำนวณอัตราการตาย (mortality rate) ต่อไป

อัตราการตายคำนวณจากสูตร

$$\text{อัตราตายของยุง} = \frac{\text{จำนวนยุงที่ตาย} \times 100}{\text{จำนวนยุงที่ต้องทดสอบ}}$$

ในการทดลองแต่ละครั้งจะมีการทดลองเปรียบเทียบ (control) ถ้าหากอัตราการตายของกลุ่มยุงเปรียบเทียบมากกว่า 20 % ถือว่าการทดสอบในครั้งนั้นใช้ไม่ได้ แต่ถ้าอัตราการตายของยุงเปรียบเทียบอยู่ระหว่าง 5 –20 % จะต้องแก้ไขอัตราการตายของยุงทดสอบด้วย Abbort 's formula เพื่อให้ได้อัตราการตายที่แท้จริงของยุงทดสอบดังนี้

$$\text{อัตราการตายที่แท้จริง} = \frac{\text{อัตราตายจากหลอดทดสอบ} - \text{อัตราตายจากหลอดเปรียบเทียบ} \times 100}{100 - \text{อัตราตายจากหลอดเปรียบเทียบ}}$$

2.3.1 การหาค่า LT_{50} และ resistance ratio

ทำการทดลอง bioassay แต่เปลี่ยนแปลงระยะเวลาที่ยุงได้รับสารเคมีฆ่าแมลง โดยแบ่งระยะเวลาเป็นช่วง ในสารเคมีฆ่าแมลงดีดีทีเริ่มสังเกตอัตราการตายทุก 30 นาที จนกระทั่งยุงตายหมด ส่วนสารเคมีฆ่าแมลงเพอร์เมทธินเริ่มสังเกตอัตราการตายในชั่วโมงแรก จากนั้นสังเกตทุกๆ 4 ชั่วโมงจนยุงตายหมด ทำในยุงอายุ 1 วัน นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log time กับอัตราการตาย เพื่อนำมาคำนวณหาค่า LT_{50} และ resistance ratio ของยุงทั้งสามสายพันธุ์

2.4 การหาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนหาโดยวิธีของ Bradford (1976) เพื่อนำไปคำนวณหาค่า specific activity ของเอนไซม์ต่างๆ โดยใช้ bovine albumin serum (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้นที่ใช้คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg / ml นำน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับหาปริมาณโปรตีนของ Bio-Rad นำมาเจือจางลง 5 เท่าด้วยน้ำกลั่น นำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 เพื่อกำจัดตะกอนสีที่ไม่ละลายออก นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 10 µl ผสมกับน้ำยาที่เจือจางแล้ว 300 µl นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (automatic shaker) จากนั้นทิ้งไว้ 5 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง Ceres UV 900 Hdi microplate reader โปรแกรม KCJR เครื่องจะคำนวณและสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

2.5 การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส

2.5.1 สารเคมี

10 mM Glutathione (GSH)ใน 0.10 M sodium phosphate buffer pH 6.5

21 mM 1,-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ในเอธานอล

2.5.2 วิธีการ

นำยุงระยะต่างๆที่ต้องการทดสอบบดกับสารละลายบัฟเฟอร์ (0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.5 ที่มี GSH 10 mM) โดยเติมทีละ 100 µl. และบดโดยเครื่องบด จนใส่บัฟเฟอร์ครบ 500 µl ขั้นตอนดังกล่าวทำในถังน้ำแข็งอุณหภูมิประมาณ 4 °C ตลอดเวลา เพื่อไม่ให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี้ นำไปปั่นแยกเอาส่วนใส (supernatant) ด้วยเครื่อง high speed centrifuge ยี่ห้อ Biofuge A แรงเหวี่ยงเท่ากับ 10,000 g นาน 10 นาที ในห้องเย็นอุณหภูมิประมาณ 4-10 °C จากนั้นแยกเอาส่วนใสใส่ microtube ใหม่ เพื่อนำไปหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสใช้วิธีของ Prapanthadara et al.,(1996) ผสมสับสเตรททั้งสองอย่างคือ GSH และ CDNB ในอัตราส่วน 1,000 : 50 ตามลำดับเข้าด้วยกัน จากนั้นดูดสารละลายสับสเตรทที่ผสมกันนี้ 200 µl ผสมกับสารละลายเอนไซม์ 10 µl วัดการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนของแสงของผลิตภัณฑ์ที่ความยาวคลื่น 340 nm เทียบกับ blank โดยใช้เครื่อง Ceres UV 900 Hdi microplate reader ที่มีโปรแกรมติดตามจลน์ศาสตร์ เป็นเวลา 2 นาที ระยะห่างของเวลา 5 วินาที 10 จุด

<u>การคำนวณหาค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส</u>

แอคติวิตี้ของเอนไซม์หาได้จากกฎของเบียร์คือ

$O.D = \varepsilon bc$

O.D = ค่าการดูดกลืนของแสง (optical density)

ε = molar extinction coefficient สำหรับ CDNB-GSH = 9.6 $mM^{-1}cm^{-1}$

b = path length ในที่นี้เท่ากับ 0.6 cm

c = ความเข้มข้น (concentration)

$$\Delta c = \frac{\Delta O.D.}{\varepsilon b} = \frac{\Delta O.D.}{9.6\ mM^{-1}cm^{-1} \times 0.6\ cm} \quad \text{.....(1)}$$

เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารละลายที่หาแอคติวิตี้ = $\frac{10\ \mu l}{210\ \mu l} = \frac{1}{21}$ คือเจือจางลง 21 เท่า

เพราะฉะนั้นสมการที่ 1 จึงต้องคูณด้วย dilution factor นี้ด้วยจะได้สมการที่ใช้หาค่าแอคติวิตี้คือ

$$\Delta c = \frac{\Delta O.D. \times 21}{9.6 \times 0.60} \frac{mM}{min} \quad .....(2)$$

เมื่อหารสมการ(2) ด้วยปริมาณโปรตีนจะได้ specific activity สมการเป็น

$$\text{specific activity} = \frac{\Delta \text{ O.D.} \times 21}{9.6 \times 0.6 \times \text{protein}} \frac{\mu \text{ mole}}{\text{min/mg}} \quad .....(3)$$

2.6 การทำ DDTase assay (Prapanthadara et al., 1996)

2.6.1 สารเคมี 0.1 M sodium phosphate buffer

10 mM GSH

0.1 M DDT

0.1 mM dicofol

0.1 mM DDE

2.6.2 การหาปริมาณ DDTase activity

ในหลอดทดลองซึ่งเป็นหลอดแก้วมีสารละลาย 1 ml ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ 100 µl สารละลายบัฟเฟอร์ (0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.5 ที่มี GSH 10 mM) 850 µl และ ดีดีทีความเข้มข้น 1 mM 100 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปทิ้งไว้ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 28 °C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย dicofol 0.1 mM 50 µl เพื่อใช้เป็น internal standard แล้วทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 1.5 ml เขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 5 นาที จากนั้นนำไปแยกชั้นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 750 rpm 10 นาทีแล้วดูดถ่ายชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มใส่ในหลอดแก้วใหม่ ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้งโดยรวมคลอโรฟอร์มในหลอดเดียวกันตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันให้แห้ง ณ อุณหภูมิห้อง ปิดจุกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 70 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

<u>ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC</u>

นำเอาหลอดแก้วที่มีสารละลาย DDT, DDE และ dicofol มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 50 µl ที่ทำให้แห้งแล้ว เติมสารละลาย isopropanol 100 µl กลิ้งหลอดแก้วไปมาประมาณ 5 - 10 ครั้ง ให้สารละลายสารมาตรฐานที่อยู่ในหลอดแก้วละลายออกมา แล้วเติม mobile phase ที่มี metanol : acetonitril : distilled water เท่ากับ 63 : 25 : 12 ปริมาตร 100 µl ในหลอดแก้วตัวอย่างก็ทำเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน

<u>วิธีการคำนวณ DDTase activity</u>

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดและทำให้แห้งแล้วละลายด้วย isopropanol 100 µl และ mobile phase 100 µl ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 200 µl ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพียง 20 µl

ถ้าปริมาณ การเกิด DDE ที่วัดได้เท่ากับ Y nmole

ปริมาณการเกิด DDE ทั้งหมดต่อปฏิกิริยาเท่ากับ $\frac{200 \times Y}{20}$ หรือ 10Y คือ 10 เท่าของ DDE formation

DDTase activity คือ $\frac{\text{ปริมาณ DDE ทั้งหมดที่เกิดขึ้น}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}}$

แต่ในหนึ่งปฏิกิริยาที่เราเตรียมเท่ากับ 1 ml และใส่สารละลายเอนไซม์เพียง 100 µl

ถ้าใช้สารละลายเอนไซม์ 100 µl ได้มีปริมาณโปรตีน $\frac{X}{10}$ mg/ml

ดังนั้นปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ $\frac{X}{10}$ mg หรือ 10 เท่าของปริมาณโปรตีนที่วัดได้

สรุปปริมาณ DDTase activity = $\frac{\text{ปริมาณ DDE ที่วัดได้} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนที่วัดได้}}$

หน่วยเป็น nmole/DDE ที่เกิดขึ้นต่อปริมาณโปรตีน

2.7 การหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (EST)

2.7.1 สารเคมี

stock 100 mM *p*-nitrophenyl acetate

50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4

2.7.2 วิธีการหาค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส (Karunaratne, 1994)

เตรียม working solution ของ *p* - nitrophenyl acetate 1 mM โดยใช้ stock solution 100 mM 10 µl ผสมกับ 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 990 µl เตรียมแล้วใช้ทันที ดูดสารละลายเอนไซม์ 10 µl ผสมกับ working solution 200 µl อ่านด้วยเครื่อง Ceres UV 900 HDi microplate reader แบบจลน์ศาสตร์ นาน 2 นาที

<u>การคำนวณหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเตอเรส</u>

แอคติวิตี้ของเอนไซม์หาได้จากกฎของเบียร์

O.D = ε bc

O.D = ค่าการดูดกลืนของแสง

ε = molar extinction coefficient สำหรับ *p* - nitrophenyl acetate คือ 6.53 $mM^{-1}cm^{-1}$

b = path length ในที่นี้ = 0.6 cm

C = ความเข้มข้น

$$\Delta c = \frac{\Delta O.D.}{\varepsilon b} = \frac{\Delta O.D.}{6.53\ mM^{-1}cm^{-1}} \quad \text{.....(1)}$$

เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารละลายที่หาแอคติวิตี้ = $\frac{10\ \mu l}{210\ \mu l} = \frac{1}{21}$ คือเจือจางลง 21 เท่า

เพราะฉะนั้นสมการที่ 1 จึงต้องคูณ dilution factor นี้จึงจะได้สมการที่ใช้หาแอคติวิตี้

$$\Delta c = \frac{\Delta O.D. \times 21}{6.53 \times 0.6}\ \frac{mM}{min} \quad \text{.....(2)}$$

เมื่อหารสมการ (2) ด้วยปริมาณโปรตีนจะได้ค่า specific activity สมการเป็น

$$\text{specific activity} = \frac{O.D. \times 21\ mM}{6.53 \times 0.6\ min} \text{ หาร } \frac{\text{protein mg}}{\text{ml}}$$

$$= \frac{\Delta O.D. \times 21}{6.53 \times 0.6 \times \text{protein}}\ \frac{mM}{min} \times \frac{ml}{mg}$$

$$\text{เพราะฉะนั้นค่า specific activity} = \frac{\Delta m\ O.D. \times 21}{6.53 \times 0.6 \times \text{protein}}\ \frac{\mu mole}{min.\ mg} \quad \text{.....(3)}$$

2.8 การหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (CYP450)

2.8.1 สารเคมี

homogenizing buffer ประกอบด้วย 0.05 M Tris, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT และ 1 % polyvinylpyrolidone

sodium dithionite

แก๊สคาร์บอนมอนน็อกไซด์

<u>การเตรียมแก๊สคาร์บอนมอนน็อกไซไซด์</u> (วีรวรรณ เรืองยุทธิการณ์และคณะ, 2538)

แก๊สคาร์บอนมอนน็อกไซด์เป็นแก๊สพิษ ดังนั้นจึงต้องเตรียมในตู้ดูดควัน การผลิตแก๊สนี้อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดฟอร์มิคและกรดซัลฟูริคเข้มข้น และใช้ dithionite 0.5 % เป็นตัวดักจับอ๊อกซิเจนและ oxidizing agents อื่นๆที่ปนเปื้อน ก่อนที่จะนำแก๊สนี้ไปใช้

2.8.2 การเตรียมไมโครโซมและการวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซโตโครมพี450 (วีรวรรณ เรืองยุทธิการณ์และคณะ, 2538)

เนื่องจากเอนไซม์นี้มีมากในไมโครโซมซึ่งเป็นออร์แกเนลเล็กๆในเซลล์ จึงต้องแยกเอาส่วนไมโครโซมนี้มาศึกษา การทดลองนี้ตรวจหาเฉพาะระยะลูกน้ำ เนื่องจากระยะอื่นๆของยุงลายมีเม็ดสี (pigment) มากทำให้ขัดขวางการดูดกลืนแสงของเอนไซม์นี้ นำลูกน้ำปริมาณ 2- 3 กรัมที่

แช่แข็งในหลอดพลาสติกที่อุณหภูมิ –70 °C ทิ้งไว้ในถังน้ำแข็งเพื่อให้ตัวอย่างอ่อนตัว ใส่ homogenizing buffer คือ Tris buffer pH 7.6 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสทำหน้าที่กำจัด heme pigment EDTA เพื่อลดกระบวนการ lipid peroxidation PMSF เป็น protein inhibitor กำจัดเอนไซม์ protease และ polyvinylpyrolidone เป็นตัวช่วยให้เอนไซม์คงตัวโดยกำจัดหมู่ฟีนอลออกไป (Omura and Sato, 1984) ใส่ บัฟเฟอร์ทีละ 1 ml บดตัวอย่างลูกน้ำด้วย glass homogenizer อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับสารละลายบัฟเฟอร์ 1 : 3 (น้ำหนัก : ปริมาตร) บดขึ้นลงอย่างน้อย 6 ครั้ง แล้วนำไปแยกส่วนประกอบของเซลล์ที่ไม่ต้องการออกที่ความเร็ว 2500 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นนำส่วนใสไปปั่นอีกในเครื่อง ultracentrifuge ยี่ห้อ KONTRON 37,500 rpm นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งส่วนใสและเหลือตะกอนซึ่งเป็น microsomal pellets ล้างตะกอนด้วย homogenizing buffer ปริมาตรหนึ่งเท่าของน้ำหนักตัวอย่าง เก็บไมโครโซมใน homogenizing buffer ที่มี 20 % glycerol ที่อุณหภูมิ –70°C ก่อนนำไปวัดระดับโปรตีน (Bradford, 1976) และไซโตโครม พี 450

การวัดปริมาณไซโตโครม พี450 อาศัยปฏิกิริยาการจับแก๊สคาร์บอนมอนน็อกไซด์ของเอนไซม์ไซโตโครม พี450 หลังจากเปลี่ยนอนุมูลของเหล็กที่เป็นส่วนสำคัญของเอนไซม์ให้อยู่ในรูปของเฟอรัส โดยการเติม sodium dithionite ลงไปใน microsomal suspension ซึ่งเป็นส่วนของเซลล์ที่มีปริมาณของเอนไซม์ไซโตโครม พี450 มากกว่าส่วนอื่นๆ ซึ่งเมื่อจับกับแก๊ส CO จะให้ maximum wavelength absorbance ที่ 450 nm นำ microsomal suspension ใส่ cuvette เป่าแก๊ส CO ลงในสารละลายตลอดเวลา 3 นาที แล้ววัดค่า base line ของเอนไซม์นี้ที่ความยาวคลื่น 490 nm ด้วยเครื่อง scanning UV-VIS spectrophotometer ยี่ห้อ Bekman DU650 หลังจากนั้นเติม sodium dithionite ขนาดเท่าหัวไม้ขีดไฟ ปิดด้วยพาราฟิล์ม ผสมให้เข้ากัน และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนของแสงที่ 450 nm ค่า extinction coefficient ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 มีค่าเท่ากับ 91 mM^{-1} cm^{-1} (Johannesen and De Pierre, 1978)

<u>การคำนวณค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไซโตโครม พี450</u>

คำนวณจากค่า maximum absorbance ที่ 450 nm ลบด้วยค่า absorbance ที่ 490 nm (ที่เป็น base line) หารด้วยค่า extinction coefficient ของเอนไซม์ คำนวณค่า CYP450 หน่วยเป็น nmol / mg protein

$$\text{cytochrome P450 activity} = \frac{\text{A(450-490) nm} \times 1000}{\text{ปริมาณโปรตีน} \times 91}$$

2.9 Altered acetylcholinesterase (AchE)

ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำ altered acetylcholinesterase assay

2.9.1 สารเคมี 0.01 M 5,5' –dithio-bis(2-Nitrobenzoic acid) หรือ DTNB

0.36 M Acetylthiochlorine iodide หรือ ASCHI

สารละลาย sodium phosphate บัฟเฟอร์ที่มี triton X-100

สารเคมีฆ่าแมลง :sumithion, temephos, bendiocarb, permethrin

2.9.2 การเตรียมวิธีการทำ assay

เนื่องจากการทำ altered acetylcholinesterase เป็นกลไกการดื้อสารเคมีฆ่าแมลงแบบเปลี่ยนแปลงบริเวณออกฤทธิ์ แต่สามารถใช้วิธีทางชีวเคมีเพื่อหาเปอร์เซนต์การยับยั้ง (% inhibition) ของเอนไซม์เมื่อมีการแย่งจับกับเอนไซม์นี้ได้ แต่วิธีนี้ยังไม่มีการทดลองมาก่อนในห้องปฏิบัติการ จึงทำการศึกษาวิธีการเตรียมสารเคมีและเทคนิคการทำใหม่ โดยปรับปรุงจากวิธีการทดลองของ Ffrench – constant and Bonning, 1989 ; Hemingway and Peiris, 1990 ; Penilla et al., 1997) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆในการทดลอง

(1) <u>การศึกษาผลของความเข้มข้นสับสเตรท</u>

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสับสเตรทในการทำปฏิกิริยา ในที่นี้คือ acetylthiochlorine iodide ซึ่งมีคุณสมบัติคล้าย acetylchlorine ซึ่งเป็นตัวสื่อสัญญาณประสาท นำเอา acetylthiochlorine ละลายในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 0.36-0.0036 M ดังแสดงในตารางที่ 2.1 จากนั้นนำตัวอย่างลูกน้ำมาทิ้งไว้ในถังน้ำแข็งให้อ่อนตัว เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี triton X-100 (1 % triton X – 100 ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.8) ทีละ 100 µl นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ยี่ห้อ Biofuge A 10,000 g 5-10 นาที แยกส่วนใสใส่ microtube อันใหม่ แล้วดูด 30 µl ลงใน microtitre plate ตามด้วยสารละลาย DTNB ความเข้มข้น 0.01 M 10 µl ที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี Triton X-100 135 µl หลังจากนั้นเติม acetylthiochlorine iodide ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.36, 0.18, 0.036, 0.018 และ 0.0036 M วัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Ceres UV 900 Hdi microplate reader โปรแกรม KCJR อ่านแบบจลน์ศาสตร์ทุกๆ 30 วินาทีเป็นเวลา 5 นาที ทั้ง ASCHI และ DTNB ต้องเตรียมแล้วใช้ทันทีและเก็บในภาชนะสีชา เนื่องจากอาจสูญเสียคุณสมบัติสารเมื่อถูกแสง

ตารางที่ 2.1 แสดงความเข้มข้นของสับสเตรทที่เตรียม

TUBE	[ASCHI]=0.36 M	DDW(µl)	[ASCHI](M)	Final conc.(mM)
1	100	0	0.36	15
2	100	400	0.18	7.5
3	100	900	0.036	1.5
4	100	4900	0.018	0.75
5	100	9900	0.0036	0.15

(2) การศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายเอนไซม์

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อต้องการทราบกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสับสเตรทความเข้มข้น 0.036 M เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่เจือจางลงเป็นอย่างไร นำเอาสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี triton X-100 ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1

ตารางที่ 2.2 แสดงอัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางลง

Diluted enzyme	Supernatant(µl)	1% triton sodium phosphate buffer(µl)
Supernatant	100	0
1:1	100	100
1:2	100	200
1:3	100	300
1:4	100	400
1:5	100	500
1:10	100	1000

(3) การศึกษาผลของชนิดตัวยับยั้ง

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาว่าเมื่อใช้สารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่างๆเป็นตัวยับยั้ง สารเคมีฆ่าแมลงชนิดใดจะสามารถยับยั้งได้มากที่สุด โดยมีค่า % inhibition สูงสุด แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีฆ่าแมลงที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของสารเคมีฆ่าแมลง	ความเข้มข้นที่เติม (mM)
Temephos	0.4
Bendiocarb	0.4
Diazenon	0.4
Permethrin	0.4
Sumithion	0.4

วิธีการทดลองทำโดยนำเอาสารละลายเอนไซม์ 30 µl เติมสารละลาย DTNB ที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี triton X-100 135 µl และใส่ ASCHI 0.036 M ผสม sodium phosphate buffer pH 7.0 อัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 25 µl ที่ผสมกับตัวยับยั้งคือสารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 0.4 mM ซึ่งเป็นกลุ่มยับยั้ง (inhibit) เปรียบเทียบกับกลุ่มไม่ยับยั้ง (noninhibit) คือมีแต่ ASCHI กับ sodium phosphate buffer pH 7.0 แทน นำมาคำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{O.D. กลุ่มควบคุม} - \text{O.D. กลุ่มยับยั้ง}) \times 100}{\text{O.D. กลุ่มควบคุม}}$$

(4) ผลของความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่เลือก

ได้เลือกเอา bendiocarb มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเอธานอล ตั้งแต่ 0.02, 0.24, 1.2 และ 2.4 M เพื่อหาว่าความเข้มข้นระดับใดจึงจะเหมาะสมที่สุด โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3

ตอนที่ 2 การทำ altered acetylcholinesterase assay

นำตัวอย่างยุงลายระยะต่างๆที่ศึกษา บดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี triton X-100 ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.8 ทีละ 100 µl นำไปปั่นด้วยเครื่อง high speed centrifuge ยี่ห้อ biofuge A 10,000 g 5-10 นาที แยกส่วนใสใส่ใน microtube อันใหม่ แล้วดูดสารละลายเอนไซม์ 30 µl ลงใน microtitre plate ตามด้วยสารละลาย DTNB 0.01 M 10 µl ที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี triton X-100 135 µl หลังจากนั้นเติม ASCHI 0.036 M ซึ่งผสมใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 อัตราส่วน 2 : 1 เป็นหลุม control เปรียบเทียบระหว่าง ASCHI ที่

ผสม bendiocarb อัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 25 µl เช่นเดียวกับหลุมยับยั้ง วัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Ceres UV 900 Hdi microplate reader โปรแกรม KCJR อ่านแบบจลน์ศาสตร์ทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที นำมาคำนวณหา % inhibition

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University