บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 สารละลายสำหรับใช้ในเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์

3.1.1.1 สารละลายคาร์บอเนต - ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 9.6

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1.59 กรัม โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 2.93 กรัมและโซเดียมเอไซด์ 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 9.6 ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 1.0 โมลต่อลิตรเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใช้ภายใน 2 สัปดาห์

3.1.1.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีน ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร pH 7.4

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 8 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.15 กรัม โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม โซเดียมเอไซด์ 0.2 กรัมและทวีน 20 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.1.3 สารละลายไดเอธาโนลามีนบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 1.0โมลต่อลิตร pH9.8

ผสมไดเอธาโนลามีน 97 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมโซเดียมเอไซด์ 0.2 กรัม และแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 9.6 ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 1.0 โมลต่อลิตรเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตรเก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.1.4 สารละลายซับสเทรต

ละลายพารา - ไนโตรฟีนิลฟอสเฟตไดโซเดียม 5 มิลลิกรัมใน ไดเอธาโนลามีนบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1.3) 5 มิลลิลิตร สารละลายนี้เตรียมแล้วใช้ทันที

3.1.1.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 3 โมลต่อลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 12.0 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับใช้ควบคุมคุณภาพของการวัดปริมาณพิษงูเห่า โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์

เตรียมโดยละลายพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย (preimmunized serum) ให้มีปริมาณพิษงูต่างกัน 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง และสูง โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นของพิษงูเป็น 20 ,40 และ 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ผสมให้เข้ากันดี แบ่งใส่หลอดพลาสติกขนาด 12x75 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตรเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ (quality control) ในแต่ละการทดลอง

3.1.3 สารละลายสำหรับใช้ในอิมมูโนดิฟฟิวชัน

3.1.3.1 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 8.5

ละลายกรดบอริค 6.184 กรัม โซเดียมเทตราบอเรต 9.536 กรัมและโซเดียมคลอไรด์ 4.384 กรัม ในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตรปรับ pH ให้เป็น 8.5 ด้วยกรดเกลือ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3.2 สารละลายเมอร์ไธโอเลดความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์

ละลายเมอร์ไธโอเลต 1 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.3.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัมในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.3.4 สารละลายบอเรตเซไลน์

ผสมสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.5 (จากข้อ 3.1.2.1) 5 มิลลิลิตร สารละลายเมอร์ไธโอเลตความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (จากข้อ 3.1.2.2) 1 มิลลิลิตรและสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85เปอร์เซนต์(จากข้อ 3.1.3.3) จำนวน 94 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันสารละลายนี้เตรียมแล้วใช้ทันที

3.1.3.5 สารละลายสำหรับย้อมสีโปรตีน

ละลายโครแมซีบริลแลนท์บลูอาร์ (Cromassie Brillant Blue R) 0.25 กรัม ในสารละลายเมธานอล:น้ำ:กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 50:45:5 โดยปริมาตรจำนวน500 มิลลิลิตร

3.1.3.6 สารละลายล้างสีย้อมโปรตีน

ผสมเมธานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 30:10:60 โดยปริมาตรจำนวน 1 ลิตร

3.1.4 สารละลายสำหรับใช้ในการเตรียมอิมมูโนเจน

3.1.4.1 สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร pH 7.4

ละลายทริส Tris - (hydroxymethyl) - aminomethane 1.2114 กรัมและโซเดียมคลอไรด์ 0.5844 กรัมในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.4.2 สารละลายเบนโทไนท์ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์

ละลายเบนโทไนท์ 2 กรัมในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.5 สารละลายสำหรับใช้ในการแยกอิมมูโนโกลบุลิน (IgG) ให้บริสุทธิ์

3.1.5.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร pH 7.4

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 8 กรัม โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.15 กรัม โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัมและโซเดียมเอไซด์ 0.2 กรัมในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วยกรดเกลือที่มี

ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.5.2 สารละลายไกลซันบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 2.8

สารละลาย A ได้แก่สารละลายไกลซีนที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เตรียมโดยชั่งไกลซีน 15.01 กรัมละลายในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

สารละลาย B ได้แก่กรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.1โมลต่อลิตรนำสารละลาย A มา 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยสารละลาย B ให้เป็นpH 2.8 เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.5.3 สารละลายทริสบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร pH 8.0

ละลายทริส 0.6057 กรัม อัลบูมิน(bovine serum albumin) 1 กรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัม และโซเดียมเอไซด์ 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.01 โมล เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมไลโปโซมที่มุ้มพิษงูเห่าไว้ภายใน

3.2.1 ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (non-osmicated liposomes)

เตรียมตามวิธีของ New และคณะ (1985) ซึ่งดัดแปลงจากวิธี Reverse - phase evaporation (Szoka และ Papahadjopoulos,1978)

ละลายสฟิงโกมัยอิลิน 10 มิลลิกรัมและคอเลสเตอรอล 4 มิลลิกรัม ในคลอโรฟอร์ม 1.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองจุกเกลียวขนาด 16 x 100 มิลลิลิตร แล้วเติมอีเธอร์ 1.5 มิลลิลิตร เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วจึงเติมสารละลายพิษงูเห่า 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของพิษงูเห่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ จากนั้นพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนเหนือสารละลายเบา ๆ ประมาณ 10 วินาทีแล้วปิดฝา ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer)

ประมาณ 2 วินาที แล้วนำไปโซนิเคท (sonicate) ในเครื่องให้พลังเสียงความถี่สูง (sonicator bath) ประมาณ 3 นาที หรือจนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายนี้เทใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 x 110 มิลลิลิตร แล้วนำไประเหยโดยใช้เครื่องโรตารีอีแวพอเรเตอร์ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 450 มิลลิเมตรปรอท (mmHg) เพื่อระเหยเอาคลอโรฟอร์มและอีเธอร์ออกเมื่อได้ของเหลวหนืดลักษณะคล้ายครีมสีขาวข้น (gel) นำออกมาเขย่าเบา ๆ นานประมาณ 10 นาที จะมีส่วนน้ำใสเยิ้มออกมา เขย่าต่อไปอีกเล็กน้อยจนได้ของเหลวสีขาวขุ่นเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายนี้ไประเหยเอาคลอโรฟอร์มและอีเธอร์ออกอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้เครื่องโรตารีอีแวพอเรเตอร์ที่ความดัน 550 มิลลิเมตรปรอทเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไลโปโซมที่ได้เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ จนได้ปริมาตรเป็น 5.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นแยกเอาไลโปโซมออกจากพิษงูอิสระ ด้วยเครื่องอุลตราเซ็นตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 100,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ในกรณีเพื่อศึกษาลักษณะไลโปโซมแยกโดยวิธีผ่านคอลัมน์เซฟฟาโรส 4B (ข้อ 3.3.1)) แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์จนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1.0 มิลลิลิตร

3.2.2 <u>ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์</u> (osmicated liposomes) ดัดแปลงจากวิธีของ New และคณะ (1985)

3.2.2.1 ละลายสฟิงโกมัยอิลิน 10 มิลลิกรัมและคอเลสเตอรอล 4 มิลลิกรัมในคลอโรฟอร์ม 1.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองจุกเกลียวขนาด 16 x 100 มิลลิลิตร แล้วเติมอีเธอร์ 1.5 มิลลิลิตร เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ 0.5 มิลลิลิตรจากนั้นไล่ด้วยก๊าซไนโตรเจนเหนือสารละลายเบาๆ ประมาณ 10 วินาทีแล้วปิดฝา ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ประมาณ 2 นาที แล้วนำไปโซนิเคทในเครื่องให้พลังเสียงความถี่สูง ประมาณ 3 นาทีจนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.2.2 ละลายสฟิงโกมัยอิลิน 10 มิลลิกรัมและคอเลสเตอรอล 4 มิลลิกรัมในคลอโรฟอร์ม 1.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองจุกเกลียวขนาด 16 x 100 มิลลิลิตร แล้วเติมอีเธอร์ 1.5 มิลลิลิตร เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วเติมสารละลายพิษงูเห่า 0.5 มิลลิลิตร (ซึ่งประกอบด้วยสารละลายพิษงูเห่าที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์จำนวน 0.4 มิลลิลิตร และสารละลาย

ออสเมียมเทตรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์จำนวน 0.1 มิลลิลิตร) จากนั้นพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนเหนือสารละลายเบา ๆ ประมาณ10 วินาทีแล้วปิดฝา ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร(vortex mixer)นาน 2 นาทีแล้วนำไปโซนิเคทนาน 3 นาทีจนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

นำสารละลายจากข้อ 3.2.2.1 และ 3.2.2.2 เทรวมกันในหลอดทดลองขนาด 25 x 110 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันดี นำไประเหยโดยใช้เครื่องโรตารีอีแวพอเรเตอร์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ความดัน 450 มิลลิเมตรปรอทเพื่อระเหยเอาคลอโรฟอร์มและอีเธอร์ออกเมื่อได้ของเหลวหนืดลักษณะคล้ายครีมสีเทา นำออกมาเขย่าเบา ๆ นานประมาณ 10 นาทีจะมีส่วนน้ำใสเยิ้มออกมา เขย่าต่อไปจนได้ของเหลวเป็นเนื้อเดียวกันนำสารละลายนี้ไประเหยเอาคลอโรฟอร์มและอีเธอร์ออกอีกครั้งหนึ่งโดยเครื่องโรตารีอีแวพอเรเตอร์ ที่ความดัน 550 มิลลิเมตรปรอทนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไลโปโซมที่ได้มาเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์ จำนวน 0.1 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์จนได้ปริมาตรเป็น 2.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องนำสารละลายใส่ถุงไดอะไลซิสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.4 มิลลิเมตร นำไปไดอะไลส์ในน้ำกลั่น 2 ลิตร ซึ่งคนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำกลั่น 6 ครั้ง นำไปแยกพิษงูอิสระออกโดยใช้เครื่องปั่นเบคแมนที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 1,000 x g นาน 15 นาทีแยกส่วนน้ำใสออกจะได้ไลโปโซมอยู่ก้นหลอด เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์จนได้ปริมาตรครบ 2 มิลลิลิตร

3.3 <u>การศึกษาลักษณะและขนาดของไลโปโซม</u>

3.3.1 <u>ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์</u>

นำไลโปโซมที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 หลังจากที่ระเหยเอาคลอโรฟอร์มและอีเธอร์ออกหมดแล้ว ไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์จนได้ปริมาตรเป็น 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกไลโปโซมออกจากพิษงูอิสระโดยนำไปผ่านคอลัมน์เซฟฟาโรส 4B (ภาคผนวกข้อ 4) ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ (ข้อ 3.1.5.1) ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ไว้เป็นส่วน ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร และวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่นแสง 280 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องบันทึก A_{280} (UV recorder)จะปรากฏพีค(peak) ของการดูดกลืนแสงระหว่างหลอดที่ 40 ถึง 55 จากนั้นเลือกเอาหลอดที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (หลอดที่ 43)ไปดูลักษณะและขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน(Electron microscope) ด้วยวิธีเนกาทีฟสเตน (negative stain)โดยการเจือจางสารละลายด้วยกรดฟอสโฟทังสติก ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์เท่าตัวผสมให้เข้ากัน แล้วนำกริด(grid)ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ซึ่งเคลือบด้วยคาร์บอนมาแตะสารละลายที่เตรียมไว้ จากนั้นผึ่งให้แห้งไว้ภายใน เดสิเคเตอร์ (dessicator)เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

3.3.2 <u>ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์</u>

นำไลโปโซมที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาเจือจางลงประมาณ 5 เท่าด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85เปอร์เซนต์ แล้วนำไปดูลักษณะและขนาด ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1

3.4 <u>การหาปริมาณพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซม</u>

3.4.1 <u>ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์</u>

นำส่วนน้ำใส (supernatant) ของสารละลายที่ได้แยกเอาไลโปโซมออก ไปแล้วที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 มาหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (ภาคผนวกข้อ 1) และคำนวณหาร้อยละของพิษงูเห่าที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในไลโปโซม (% entrapped) ดังตัวอย่าง ข้อ 3.4.3

3.4.2 <u>ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์</u>

นำส่วนน้ำใสของสารละลายที่ได้แยกเอาไลโปโซมออกไปแล้ว ที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.2.2 มาหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (ภาคผนวกข้อ 1) และคำนวณหาร้อยละ ของพิษงูเห่าที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในไลโปโซม (% entrapped) เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

3.4.3 <u>การคำนวณหาร้อยละของพิษงูเห่าที่ถูกบรรจุในไลโปโซม</u> (% entrapped)

สมมติ ปริมาณพิษงูที่ใส่ลงไปทั้งหมด = x มิลลิกรัมต่อหลอดทดลอง

ปริมาณพิษงูที่เหลืออยู่ในส่วนน้ำใส = y มิลลิกรัมต่อหลอดทดลอง

$$\% \text{ entrapped} = 100 - \frac{100y}{x}$$

3.5 การหาความเป็นพิษ (Toxicity) ของพิษงูเห่า

โดยการหา LD_{50} ของพิษงูเห่าซึ่งอยู่ในรูปต่าง ๆ คือ

1 พิษงูเห่าอิสระ (lyophilized crude venom)

2 พิษงูเห่าที่ผสมกับออสเมียมเทตรอกไซด์ (ความเข้มข้นของออสเมียมเทตรอกไซด์ 0.01 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตร) (พิษงูเห่า/ออสเมียมเทตรอกไซด์)

3 พิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (พิษงูเห่า/ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์)

4 พิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (พิษงูเห่า/ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์)

3.5.1 สัตว์ทดลอง ใช้หนู (mice) ขนาด 18-21 กรัม

3.5.2 การหา LD_{50}ของพิษงูเห่าในรูปต่าง ๆ

เตรียมพิษงูเห่าซึ่งอยู่ในรูปต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 8 ความเข้มข้น โดยละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ ดังนี้

พิษงูเห่าอิสระ ความเข้มข้น	10-17.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
พิษงูเห่าที่ผสมกับออสเมียมเทตรอกไซด์	20-44.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
พิษงูเห่า/non - osmicated liposomes	75-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
พิษงูเห่า/osmicated liposomes	41-650 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

นำพิษงูเห่าที่เตรียมได้นี้ไปฉีดหนูโดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หางด้วยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/หนู(mice) และฉีดความเข้มข้นละ 3 ตัว จากนั้นนับจำนวนหนูที่ตายและอยู่รอดภายใน 24 ชั่วโมง แล้วคำนวณหา LD_{50} ของพิษงู ดังแสดงในตัวอย่างในภาคผนวกข้อ 2

3.6 การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า

3.6.1 การเตรียมอิมมูโนเจนสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง

3.6.1.1 ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์

นำไลโปโซมซึ่งกุ้มพิษงูเห่าไว้ภายในจากข้อ 3.2.1 มาทำให้มีความเข้มข้นของพิษงูเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์

3.6.1.2 ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์

นำไลโปโซมซึ่งหุ้มพิษงูเห่าไว้ภายในจากข้อ 3.2.2 มาทำให้มีความเข้มข้นของพิษงูเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์

3.6.1.3 พิษงูเห่าอิสระ

ละลายพิษงูเห่า (lyophilized crude venom)ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ ให้มีความเข้มข้นของพิษงู 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.6.2 การฉีดอิมมูโนเจนให้สัตว์ทดลอง

นำอิมมูโนเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1 ฉีดเข้ากระต่าย 2 ทาง คือ

3.6.2.1 เส้นเลือดดำที่หู (ear vein)

ใช้อิมมูโนเจนที่เตรียมได้ทั้ง 3 ชนิดจากข้อ 3.6.1 ชนิดละ 0.5 มิลลิลิตรฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หูของกระต่ายแต่ละตัวในกลุ่มที่ 1,2 และ 3 ตามลำดับ

3.6.2.2 ใต้ผิวหนัง (intradermal)

ใช้อิมมูโนเจนเฉพาะที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1.1 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ฉีดเข้าทางใต้ผิวหนังด้านหลังของกระต่ายหลาย ๆ จุด (intradermal multiple sites)จุดละประมาณ 0.1 มิลลิลิตรแต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 นิ้ว (กระต่ายกลุ่มที่ 4)

3.6.3 ระยะเวลาของการฉีดสัตว์ทดลอง

หลังจากฉีดอิมมูโนเจนให้กระต่ายครั้งแรกแล้วต้องฉีดซ้ำ (booster injection) อีกเป็นระยะ ๆ ดังนี้

กระต่ายใช้อักษรย่อ Rb แบ่งเป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 (Rb1,Rb2,Rb3) ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (ข้อ 3.6.1.1) ปริมาณ 500 ไมโครกรัมต่อตัว ทางเส้นเลือดดำที่หู โดยฉีดซ้ำหลังจากฉีดครั้งแรก 2 เดือน 3 เดือน และ 8 เดือน ตามลำดับ

กลุ่มที่ 2 (Rb4,Rb5,Rb6) ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (ข้อ 3.6.1.2) ปริมาณ 500 ไมโครกรัมต่อตัวทางเส้นเลือดดำที่หู โดยฉีดซ้ำหลังจากฉีดครั้งแรก 2 เดือน 3 เดือน และ 8 เดือน ตามลำดับ

กลุ่มที่ 3 (Rb7,Rb8,Rb9) ฉีดด้วยพิษงูเห่า 20 ไมโครกรัม ที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ทางเส้นเลือดดำที่หู โดยฉีดซ้ำหลังจากฉีดครั้งแรก 2 เดือน 3 เดือน และ 8 เดือน ตามลำดับ

กลุ่มที่ 4 (Rb10,Rb11,Rb12) ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ปริมาณ 325 ไมโครกรัมต่อตัวทางใต้ผิวหนัง โดยฉีดซ้ำหลังจากฉีดครั้งแรก 2 สัปดาห์ และ 1 เดือน

3.6.4 ระยะเวลาของการเจาะเลือดสัตว์ทดลอง

ในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดีกระต่ายทุกตัวจะถูกเจาะเลือดก่อนฉีดอิมมูโนเจนครั้งแรกเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม(control serum)หลังจากนั้นจะเจาะหลังจากฉีดซ้ำ 1 สัปดาห์ทุกครั้ง และเจาะต่อไปทุก ๆ สัปดาห์หรือทุก 2 สัปดาห์ แต่ละครั้งจะเจาะเลือดประมาณ 5 มิลลิลิตร และเมื่อพบว่ามีระดับแอนติบอดีสูงจะเจาะเลือดอีก 20 มิลลิลิตร เลือดที่เจาะได้จะถ่ายใส่หลอดแก้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว นำส่วนที่เป็นของเหลวมาปั่นแยกเซรุ่มออกจากเม็ดเลือดด้วยเครื่องปั่นเบคแมนที่ 4องศาเซลเซียส ใช้ความเร็ว 1,000 x g เป็นเวลา 10 นาที แยกเซรุ่มใส่หลอดพลาสติกขนาด 22 x 75 มิลลิเมตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.7 การหาปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย

3.7.1 วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ELISA) ดัดแปลงจากวิธีของ Voller& Bidwell (1986)

เจือจางพิษงูเห่าให้มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายคาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (จากข้อ 3.1.1.1)เคลือบเพลทด้วยพิษงูเห่าโดยเติมสารละลายพิษงูเห่าลงในฮิโลชาเพลทหลุมละ100 ไมโครลิตรแล้ววางเพลทในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูง (ใช้สำลีจุ่มน้ำจนชุ่มแล้ววางไว้ก้นกล่อง) ปิดกล่องแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง ล้างพิษงูที่เหลือด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีนpH 7.4 (จากข้อ 3.1.1.2) จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เติมแอนติเซรุ่มที่เจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีน pH 7.4 ในอัตราส่วนต่าง ๆ กันจำนวน 100 ไมโครลิตร อินคิวเบตที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีที่เหลือออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีน pH 7.4

เช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น เติมคอนจูเกต (goat- antirabbit IgG - alkaline phosphatase conjugate) ซึ่งเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ในอัตราส่วน 1:1000 หลุมละ 100 ไมโครลิตรอินคิวเบตที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างคอนจูเกตที่เหลือออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีน เช่นเดียวกับวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น เติมซับสเทรต (จากข้อ 3.1.1.4) หลุมละ 100 ไมโครลิตร อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 3 โมลต่อลิตรจำนวน 50 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร (A_{405}) โดยใช้เครื่องอ่านอิไลซาเพลท (Titertek Multiskan Plus Plate Reader) แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{405} และความเจือจางของแอนติเซรุ่ม ระดับแอนติบอดีที่วัดได้จะแสดงเป็นค่าไตเตอร์ (titer) ซึ่งไตเตอร์ของแอนติบอดีคือความเจือจาง (เป็นจำนวนเท่า)ของแอนติเซรุ่มที่ให้ค่า A_{405} สูงกว่า A_{405} ของ base line เท่ากับ 0.4 (Bunchuinและคณะ,1984)

3.7.1.1 <u>การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของพิษงูเห่าที่ใช้เคลือบเพลท</u>

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.7.1 แต่ใช้พิษงูเห่าที่เคลือบเพลทที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.125,0.25,0.5 และ 1ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายคาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์

3.7.1.2 <u>การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอนจูเกต</u>

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.7.1 แต่ใช้คอนจูเกตที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันโดยการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ ในอัตราส่วน 1:1,000 1:2,000 และ 1:4,000

3.7.1.3 <u>การหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบเพลท</u>

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.7.1 แต่ใช้เวลาและอุณหภูมิของการอินคิวเบตต่าง ๆ กันคือ 5 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส, 5 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส และ 18 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส

3.7.1.4 การหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการอินคิวเบตเซรุ่มกับพิษงูเห่า

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.7.1 แต่ใช้เวลาและอุณหภูมิของการอินคิวเบตแอนติเซรุ่มกับพิษงูเห่าต่าง ๆ กันคือ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส และ2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

3.7.1.5 การหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกตกับแอนติเซรุ่ม

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.7.1 แต่ใช้เวลาและอุณหภูมิของการอินคิวเบตคอนจูเกตกับแอนติเซรุ่มต่างกันคือ 1 หรือ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องและ 1 หรือ 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

3.7.2 วิธีนิวทรัลไลเซชัน (Neutralization test)

ผสมแอนติเซรุ่มที่ต้องการทดสอบจำนวน 1 มิลลิลิตรต่อสารละลายพิษงูเห่า 1 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายพิษงูเห่าที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 3 ความเข้มข้นเขย่าให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำพิษงูเห่าผสมกับเซรุ่มนี้จำนวน 0.5 มิลลิลิตรไปฉีดในหนู (mice) ทางเส้นเลือดดำที่หาง แต่ละความเข้มข้นใช้หนู 3 ตัว แล้วสังเกตดูว่าหนูตายหรืออยู่รอดเป็นจำนวนเท่าไรภายใน 24 ชั่วโมง นำผลการทดลองนี้ไปคำนวณหาว่าแอนติเซรุ่ม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่าได้เป็นกี่เท่าของค่า LD_{50} (ภาคผนวกข้อ 3)

3.8 การหาความจำเพาะของแอนติบอดี

ดัดแปลงจากวิธีของ Gopalakrishnakone และคณะ (1980)

3.8.1 วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (Immunodiffusion)

หลอมละลายวุ้น (noble agar) จำนวน 1 กรัมในสารละลายบอเรตเซไลน์ (ข้อ 3.1.3.4) 100 มิลลิลิตรเทลงในจาน (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตรจานละ 3 มิลลิลิตร ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว เจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ตรงกลาง 1 หลุมและรอบๆ 6 หลุมแต่ละหลุมอยู่ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร หลุมกลางเติมแอนติบอดีซึ่งไม่ต้องเจือจาง 20 ไมโครลิตร หลุมรอบ ๆ เติมพิษงูชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบซึ่งมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายบอเรตเซไลน์จำนวน 20

ไมโครลิตร แล้ววางในกล่องที่มีความชื้นสูงปิดให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ล้างโปรตีนส่วนที่เหลือออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ (ข้อ 3.1.5.1) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง ย้อมสีเส้นตะกอน (precipitin line) ด้วยสารละลายย้อมสีโปรตีน (ข้อ 3.1.3.5) จำนวน 3 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงล้างสีด้วยสารละลายล้างสีย้อมโปรตีน(ข้อ 3.1.3.6)จนเห็นเส้นตะกอนคมชัด

3.8.2 วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ELISA)

เคลือบอิไลซาเพลทด้วยพิษงูชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้นของพิษงู 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายคาร์บอเนต - ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.6 (ข้อ 3.1.1.1) จากนั้นทำตามวิธีในข้อ 3.7.1 แล้วเปรียบเทียบค่า A_{405} ที่ได้ระหว่างการใช้พิษงูชนิดต่าง ๆ เคลือบเพลทกับการใช้พิษงูเท่าเคลือบเพลท

3.9 การพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์สำหรับหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย

3.9.1 การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า

3.9.1.1 การเตรียมอิมมูโนเจนสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง

ละลายพิษงูเห่า 3.12 มิลลิกรัมในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.4(ข้อ 3.1.4.1) 4 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ขนาด 30 มิลลิลิตรเติมสารละลายเบนโซไนท์ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ (ข้อ 3.1.4.2) จำนวน 1.6 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ผสมกับแอดจูแวนท์ (Complete Freund adjuvant) จำนวน 4 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการโฮโมจิไนส์ด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Silverson) ที่มีความเร็วสูงสุดนานประมาณ 5 นาที ขณะเตรียมจะแช่บีกเกอร์อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา จะได้อิมัลชันลักษณะข้นหนืดสีขาวขุ่น เตรียมแล้วใช้ทันที

3.9.1.2 การฉีดอิมมูโนเจนให้กระต่าย

นำอิมมูโนเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.1.1 ฉีดเข้ากระต่าย 2 ตัว (Rb13 และ Rb14) ตัวละ 1 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังทางด้านหลังของกระต่ายหลาย ๆ จุด ตามวิธีในข้อ 3.6.2.2

3.9.1.3 ระยะเวลาของการฉีดกระต่าย

เมื่อฉีดอิมมูโนเจนครั้งแรกแล้วต้องฉีดซ้ำหลังจากฉีดครั้งแรก 2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ ตามลำดับ

3.9.1.4 ระยะเวลาของการเจาะเลือดกระต่าย

เจาะเลือดก่อนฉีดอิมมูโนเจนครั้งแรก และหลังฉีดอิมมูโนเจนซ้ำทุกสัปดาห์ประมาณครั้งละ 5 มิลลิลิตร นำมาแยกเซรุ่ม (ตามวิธีข้อ 3.6.4) แบ่งส่วนหนึ่งมาหาปริมาณแอนติบอดี (ตามวิธีข้อ 3.7.1) ถ้าพบว่ามีปริมาณแอนติบอดีสูงจะเจาะเลือดเพิ่มอีกครั้งประมาณ 20 มิลลิลิตร แยกเซรุ่มเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3.9.2 การแยกอิมมูโนโกลบุลิน (IgG) โดยใช้โปรตีนเอ-เซฟฟาโรสซีแอล-4บี

เจือจางเซรุ่มที่ได้จากข้อ 3.9.1.4 จำนวน 4 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ (ข้อ 3.1.5.1) เท่าตัวแล้วเติมลงในคอลัมน์โปรตีนเอเซฟฟาโรสซีแอล-4บี (ภาคผนวกข้อ 5)ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์(ข้อ 3.1.5.1) ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนกระทั่งโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ถูกชะออกมาจนหมดแล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 2.8 (ข้อ 3.1.5.2)เก็บสารละลาย IgG ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร และวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องบันทึก A_{280} (UV recorder) จะปรากฏพีคระหว่างหลอดที่ 45-70 รวมสารละลายส่วนนี้แล้ววัดปริมาตรทั้งหมดนำสารละลาย IgG ที่แยกได้ไปทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร แล้วนำไปใส่ถุงไดอะไลซิส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5/8 นิ้ว และไดอะไลส์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ 2 ลิตร เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงโดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยใช้เซนตริคอน (centricon) จนได้ความเข้มข้นเป็น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์แล้วเติมโซเดียมเอไซด์ให้มีความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.9.3 การเตรียมคอนจูเกตระหว่างอิมมูโนโกลบุลิน (IgG) กับอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส โดยวิธีของ Voller & Bidwell (1986)

ปั่นอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (จำนวน 5 มิลลิกรัม) ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายแอมโมเนียซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 3.2 โมลต่อลิตรที่ 1,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสที่ได้เติม IgG ที่ได้จากข้อ 3.9.2 จำนวน 2 มิลลิกรัมซึ่งละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์จนมีปริมาตรครบ 1.25 มิลลิลิตร เติมกลูตารอลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 25 เปอร์เซนต์จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไดอะไลส์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ 2 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 4 ครั้ง เจือจางคอนจูเกตที่ได้ให้มีปริมาตรครบ 4 มิลลิลิตรด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 (ข้อ 3.1.5.3) จะได้คอนจูเกต (IgG - alkaline phosphatase conjugate) สำหรับใช้ในการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์

3.9.4 การหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ ดัดแปลงจากวิธีของ Theakston และคณะ (1977) และ Silamut และคณะ (1987)

เจือจาง IgG (จากข้อ 3.9.2) ให้มีความเข้มข้น 10ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (ข้อ 3.1.1.1) แล้วเติมลงในอิไลซาเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูงประมาณ 48 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส ล้าง IgG ส่วนที่เหลือออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีน pH 7.4 (ข้อ 3.1.1.2) จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เติมเซรุ่มตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณพิษงูเห่าหลุมละ 100 ไมโครลิตรและเติมเซรุ่มก่อนฉีดอิมมูโนเจน (preimmunized serum) ลงในหลุมที่ต้องการให้เป็นเนกาตีฟคอนโทรล (negative control)หลุมละ 100 ไมโครลิตรเช่นกัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องล้างแอนติเจนส่วนที่เหลือออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีนจำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เติมคอนจูเกต (ข้อ3.9.3) ซึ่งเจือจางด้วยสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีนในอัตราส่วน 1:200 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างคอนจูเกตที่เหลือออกด้วยสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีนเช่นเดียวกันแล้วเติมซับสเทรต

(ข้อ 3.1.1.4) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3 โมลต่อลิตรหลุมละ 50ไมโครลิตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร (A_{405}) โดยใช้เครื่องอ่านอิไลซาเพลท (Titertek Multiskan Plus Plate Reader) ในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องเตรียมกราฟมาตรฐานควบคู่ไปด้วยโดยใช้พิษงูเห่าที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 2.5, 5,10,20,40,60,80 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเซรุ่มกระต่ายก่อนฉีดอิมมูโนเจน แทนเซรุ่มตัวอย่างแล้วนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{405} และความเข้มข้นของพิษงูเห่า (รูปที่ 22)

3.9.4.1 <u>การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG ที่ใช้เคลือบเพลทและของคอนจูเกต</u>

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.9.4 แต่ใช้ IgG (จากข้อ 3.9.2) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 2.5,5,10 และ 20ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายคาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.6 (ข้อ 3.1.1.1) และใช้คอนจูเกตที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันโดยการเจือจางคอนจูเกตด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีนในอัตราส่วน 1:100,1:200 และ 1:400

3.9.4.2 <u>การหาระยะเวลาของการอินคิวเบตที่เหมาะสมสำหรับสำหรับการเคลือบเพลทด้วย IgG</u>

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.9.4 แต่ใช้เวลาในการเคลือบเพลทด้วย IgG ต่าง ๆ กันคือ 18,24 และ 48 ชั่วโมง

3.9.4.3 <u>การหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการอินคิวเบตพิษงูเห่ากับ IgG</u>

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.9.4 แต่ใช้เวลาและอุณหภูมิในการอินคิวเบตพิษงูเห่ากับ IgG ต่างๆ กันคือ 1 และ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องและ 1 และ2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9.4.4 การหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกตกับพิษงูเห่า

วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.9.4 แต่ใช้เวลาและอุณหภูมิในการอินคิวเบตคอนจูเกตกับพิษงูเห่าต่างๆ กันคือ 1 และ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องและ 1 และ 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

3.9.5 การศึกษาความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ELISA)

3.9.5.1 ความไวของวิธีวัด (Assay Sensitivity)

หาความเข้มข้นของพิษงูเห่าจากกราฟมาตรฐาน ที่ค่า A_{405} ที่สูงกว่าเนกาทีฟคอนโทรล (negative control) เท่ากับ 0.1 ความเข้มข้นดังกล่าวถือว่าเป็นความไวของวิธีวัด

3.9.5.2 ความแม่นยำของวิธีวัด (Assay Precision)

นำเซรุ่มที่มีความเข้มข้นของพิษงูเห่าต่ำ กลาง และสูง (จากข้อ 3.1.2) มาศึกษาความแม่นยำของวิธีวัดได้ดังนี้

3.9.5.2.1 ความแม่นยำในการทดลองเดียวกัน (Intra-assay precision)

ทำการทดลองหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่ม ที่มีความเข้มข้นของพิษงูเห่าต่ำ กลางและสูงตามวิธีการในข้อ 3.9.4 โดยทำซ้ำในการทดลองเดียวกันตัวอย่างละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำ โดยคิดเป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, % cv) ได้จากสูตรดังนี้

$$\% \text{ cv} = \frac{\text{SD}}{\text{Mean}} \times 100$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17223698

3.9.5.2.2 ความแม่นยำระหว่างการทดลอง

(Inter-assay precision)

ทำการทดลองหาปริมาณพิษเห่างูที่มีความเข้มข้นต่ำ กลางและสูงตามวิธีการในข้อ 3.9.4 โดยทำซ้ำกันตัวอย่างละ 10 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งทำต่างวันและต่างการทดลองกัน แล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำ โดยคิดเป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% cv) เช่นเดียวกับข้อ 3.9.5.2.1

3.9.5.3 ความถูกต้องของวิธีวัด (Accuracy)

ความถูกต้องของวิธีวัดสามารถพิจารณาได้จากเปอร์เซนต์รีคอบเวอรี (% Recovery) ซึ่งทำการทดลองโดยใช้เซรุ่มที่มีความเข้มข้นของพิษงูเห่าค่อนข้างต่ำมาเติมพิษงูเห่ามาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 15 ถึง 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทรีน pH 7.4 แล้วนำไปหาปริมาตรพิษงูเห่าตามวิธีข้อ 3.9.4 แล้วคำนวณหาเปอร์เซนต์รีคอบเวอรีและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient)

การคำนวณหาเปอร์เซนต์รีคอบเวอรี

สมมติ ปริมาณพิษงูเห่าที่มีอยู่จริง a นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของเซรุ่ม

ปริมาณพิษงูเห่าที่วัดได้ b นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของเซรุ่ม

ดังนั้นเปอร์เซนต์รีคอบเวอร์รี = 100 b/a

การคำนวณสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

จากสูตร $$r = \frac{n\Sigma xiyi - (\Sigma xi)(\Sigma yi)}{\sqrt{n\Sigma xi^2 - (\Sigma xi)^2}\sqrt{n\Sigma yi^2 - (\Sigma yi)^2}}$$

r = สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

Xi = ปริมาณพิษงูที่มีอยู่จริง

Yi = ปริมาณพิษงูที่วัดได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย