บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับทำนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินให้บริสุทธิ์

3.1.1 สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 0.08 โมลต่อลิตร pH 6.5

ละลาย 98% แอมโมเนียมอะซีเตต 6.3 กรัมในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วยกรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 0.2โมลต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.2 สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 1.4 โมลต่อลิตร pH 6.5

ละลาย 98% แอมโมเนียมอะซีเตต 110.1 กรัมในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pHให้เป็น 6.5 ด้วยกรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.3 สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร pH 6.5

ละลาย 98% แอมโมเนียมอะซีเตต 15.7 กรัมในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วยกรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.4 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

ผสมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 37% ปริมาตร 98.5 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 901.5 มิลลิลิตร

3.1.5 สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร

ผสมสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 32% ปริมาตร 219 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 781 มิลลิลิตร

3.1.6 สารละลายกรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

ผสมสารละลายกรดอะซีติกเข้มข้น 100%ปริมาตร 60 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 940มิลลิลิตร

3.1.7 สารละลายกรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร

เจือจางสารละลายกรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 1โมลต่อลิตร(ข้อ 3.1.6)ปริมาตร 40 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 160 มิลลิลิตร

3.2 สารละลายสำหรับทดสอบสมบัติการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

3.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 8 กรัม โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมและไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.15 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ

3.3.1 สารละลายเลซิติน

ละลายเลซิติน 1 กรัมในเมธานอล 10 มิลลิลิตร ผสมกับทวีน-20 (TWEEN 20) 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.3.2 สารละลายอินดิเคเตอร์

ละลายครีซอลเรด (Cresol red) 6 มิลลิกรัม ในเมธานอล 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.3.3 สารละลายไกลซิลไกลซีนที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร

ละลายไกลซิลไกลซีน 843 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

3.3.4 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 90 มิลลิโมลต่อลิตร

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร

3.3.5 สารละลายบัฟเฟอร์ซับสเทรต

ผสมสารละลายเลซิติน (ข้อ 3.3.1)	4	มิลลิลิตร
สารละลายอินดิเคเตอร์ (ข้อ 3.3.2)	7	มิลลิลิตร
สารละลายไกลซิลไกลซีน (ข้อ 3.3.3)	3	มิลลิลิตร

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (ข้อ 3.3.4) 1 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 9.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 30 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เตรียมแล้วใช้ทันที

3.3.6 การเตรียมสารตัวอย่าง

ละลายสารที่ต้องการทดสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ ในน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนทดสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์ให้เจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่น

3.4 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบความบริสุทธิ์ของทอกซินโดยวิธีอีเลคโตรโฟรีซิส

3.4.1 สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ pH 4.5

ละลายบีตา-อลานีน 31.2 กรัม และกรดอะซีติกเข้มข้น 8.0 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 4.5 ด้วยกรดอะซีติก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.4.2 สารละลายรีโซลวิงเจลบัฟเฟอร์ pH 4.3

ผสมสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1โมลต่อลิตร ปริมาตร 48 มิลลิลิตรกับกรดอะซีติกเข้มข้น 17.2 มิลลิลิตรเติมสารละลายเทตราเมธิลลีนไดอะมีน 4 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.4.3 สารละลายสแตคกิงเจลบัฟเฟอร์ pH 6.7

ผสมสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 48 มิลลิลิตร กับกรดอะซีติกเข้มข้น 2.87 มิลลิลิตร เติมสารละลายเทตราเมธิลลีนไดอะมีน 0.46 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.4.4 สารละลายรีโซลวิงเจลอะครีลาไมด์เข้มข้น

ละลายอะครีลาไมด์ 60 กรัม และเมธิลลีนบิสอะครีลาไมด์ 0.4 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.5 สารละลายสแตคกิงเจลอะครีลาไมด์เข้มข้น

ละลายอะครีลาไมด์ 10 กรัม เมธิลลีนบิสอะครีลาไมด์ 2.5 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.6 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.28 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรเตรียมแล้วใช้ทันที

3.4.7 สารละลายไรโบฟลาวิน-5'-ฟอสเฟต

ละลายไรโบฟลาวิน-5'-ฟอสเฟต 0.4 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.4.8 สารละลายรีโซลวิงเจล

ผสมสารละลายรีโซลวิงเจลบัฟเฟอร์(ข้อ 3.4.2) 5 มิลลิลิตร สารละลายรีโซลวิงเจลอะคริลาไมด์เข้มข้น(ข้อ 3.4.4) 10 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต(ข้อ 3.4.6) มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน เตรียมแล้วใช้ทันที

3.4.9 สารละลายสแตคกิงเจล

ผสมสารละลายสแตคกิงเจลบัฟเฟอร์(ข้อ 3.4.3) 2.5 มิลลิลิตร สารละลายสแตคกิงเจลอะคริลาไมด์เข้มข้น(ข้อ 3.4.5) 5 มิลลิลิตร สารละลายไรโบฟลาวิน-5'-ฟอสเฟต (ข้อ 3.4.7) 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน เตรียมแล้วใช้ทันที

3.4.10 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับละลายสารตัวอย่าง

ผสมสารละลายสแตคกิงเจลบัฟเฟอร์(ข้อ 3.4.3) 25 มิลลิลิตร กับสารละลายกลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 100 มิลลิลิตร

3.4.11 สารละลายสีตามรอย (tracking dye)

ละลายเบสิกฟุคซิน(Basic fuchin) 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.4.12 น้ำยาย้อมสีโปรตีน

ละลายโคแมสซีบริลเลียนท์บลูอาร์(Comassie Brilliant blue R) 0.25กรัม ในส่วนผสมของเมธานอล 7.5 มิลลิลิตร กรดอะซีติกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 87.5 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ก่อนนำไปใช้

3.4.13 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

ผสมเมธานอล 50 มิลลิลิตร กับกรดอะซีติกเข้มข้น 75 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 875 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน

3.5 สารละลายสำหรับทำเอสดีเอสโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส

3.5.1 สารละลายอะคริลาไมด์

ละลายอะคริลาไมด์ 50 กรัม เมธิลลีนบิสอะคริลาไมด์ 5 กรัม และยูเรีย 192 กรัม

ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 352 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

3.5.2 สารละลายทริสมาเบสที่มีความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

ละลายทริสมาเบส 121.1กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1ลิตร

3.5.3 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง

ละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 2 กรัม ยูเรีย 96.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม 2-เมอร์แคปโทเอธานอล 2 มิลลิลิตร และกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.125 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยสารละลายทริสมาเบสที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตรแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.5.4 สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์

ละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 กรัม ทริสมาเบส 200 กรัม ในน้ำกลั่น 650 มิลลิลิตรเติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 62.5 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยสารละลายทริสมาเบส(ข้อ 3.5.2) ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.5.5 สารละลาย N,N,N',N'-TETRAMETHYL-ETHYLENEDIAMINE(TEMED)

เจือจางสารละลาย TEMED 0.3 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 4 มิลลิลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3.5.6 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 200 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3.5.7 สารละลายฟิกเซทีฟ (Fixative solution)

ละลายกรดซัลโฟซาลิซิลิก 15 กรัม และกรดไตรคลอโรอะซีติก 50 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 500 มิลลิลิตร

3.5.8 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

ผสมเมธานอล 50 มิลลิลิตร กับกรดอะซีติกเข้มข้น 75 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน

3.5.9 น้ำยาย้อมสีโปรตีน

ละลายโคแมสซีบริลเลียนท์บลูอาร์(Comassie Brilliant blue R)1.25 กรัม ในสารละลายข้อ 3.5.8 500 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ก่อนนำไปใช้

3.5.10 สารละลายสีตามรอย

ละลายบรอมฟีนอลบลู (Bromphenol blue) 40 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.5.11 สารละลายรีโซลวิงเจล

ผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ข้อ 3.5.1) 17.6 มิลลิลิตร สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ข้อ 3.5.4) 2 มิลลิลิตร สารละลายTEMED (ข้อ 3.5.5) 0.2 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ข้อ 3.5.6) 0.2 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน เตรียมแล้วใช้ทันที

3.6 การเตรียมสารละลายสำหรับติดฉลากนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินด้วยไอโอดีน-125

3.6.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร

ละลายโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.708 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.68 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วยสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.6.2 สารละลายคลอรามีนที่

ละลายคลอรามีนที่ 20 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ข้อ 3.6.1) 20 มิลลิลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3.6.3 สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์

ละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 10 มิลลิกรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ข้อ3.6.1) 5 มิลลิลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3.6.4 สารละลายนิวโรทอกซิน

ละลายนิวโรทอกซินในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ข้อ3.6.1) ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.6.5 สารละลายคาร์ดิโอทอกซิน

ละลายคาร์ดิโอทอกซินในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ข้อ3.6.1) ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7 การเตรียมสารละลายสำหรับทำเอาซ์เทอโลนีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (Ouchterlony immunodiffusion)

3.7.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4

วิธีเตรียมเหมือนข้อ 3.2.1

3.8.2 สารละลายเจลที่มีความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซนต์

ละลายเอการ์โนเบิล (AGAR NOBLE) 1.2 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (ข้อ 3.7.1) 100 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำไปเตรียมเพลททันที

3.8 การเตรียมสารละลายสำหรับหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA

3.8.1 สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.6 (Coating buffer)

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1.59 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต 2.93 กรัม และโซเดียมเอไซด์ 0.2 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร

3.8.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH7.4 (PBS)

วิธีเตรียมเหมือนข้อ 3.2.1

3.8.3 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ทวีน (PBS-TWEEN)

วิธีเตรียมเหมือนข้อ 3.8.2 แต่ก่อนจะปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรเติม TWEEN-20 0.5 มิลลิลิตร

3.8.4 สารละลายไดเอทาโนลามีนบัฟเฟอร์ pH 9.8

ละลายไดเอทาโนลามีน 97มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตรเติมโซเดียมเอไซด์ 0.2 กรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิกรัม ปรับpH ให้เป็น 9.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.8.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 โมลต่อลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรัมในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร

3.8.6 สารละลายพาราไนโตรเฟนิลฟอสเฟต

ละลายพาราไนโตรเฟนิลฟอสเฟต ในสารละลายไดเอทาโนลามีนบัฟเฟอร์ (ข้อ3.8.4) ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

018914

3.9 วิธีแยกนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินออกจากพิษงูเห่าโดยคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 (Harvey , Karlsson,1982)

3.9.1 การเตรียมคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 (Karlsson,1971)

แช่เรซินไบโอเร็กซ์-70 300 กรัมในน้ำกลั่น 3 ลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน กรองเรซินแล้วแช่ในกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร 3 ลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเรซินด้วยน้ำกลั่น 3 ลิตร 1ครั้ง แล้วแช่ในกรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร 3 ลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น3 ลิตร 1 ครั้ง แช่ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร 3 ลิตร ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ลิตร 1 ครั้ง หลังจากนั้นกระจายเรซินในสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร(ข้อ 3.1.3) ปรับ pH ให้เป็น6.5 ด้วยกรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำมาบรรจุในคอลัมน์ขนาด 2.6 X 30 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร(ข้อ 3.1.3)ประมาณ 3-5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราไหล 48 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

3.9.2 การแยกนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินออกจากพิษงูเห่า

ละลายพิษงูเห่า 0.61 กรัมในน้ำกลั่น 9.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 20,000 x g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสเติมลงในคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70(ข้อ 3.10.1) แล้วชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 0.08 โมลต่อลิตร(ข้อ3.1.1) 400 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นชะด้วยคอนเคฟซอลท์เกรเดียนท์(Concave salt gradient.) ที่ไหลออกมาจากส่วนผสมระหว่างสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 0.08 โมลต่อลิตร 1,200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในโถแก้วทรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร กับสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 1.4 โมลต่อลิตร 300 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในโถแก้วทรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตรด้วยอัตราไหล 48 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องบันทึกการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร(UVICORD) จนกระทั่งไม่มีโปรตีนออกมา นำแต่ละส่วนไปวัดค่าสภาพนำ (conductivity) หลังจากนั้นรวมแต่ละพีค(peak)ของโปรตีนเข้าด้วยกันนำไปหาปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก) . แล้วนำไปทำให้แห้งขณะแข็ง(lyophilize) หลังจากนั้นนำไปทดสอบสมบัติการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (ข้อ 3.10) และหาแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ(ข้อ 3.11)

3.9.3 การเตรียมคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50

แช่เซฟาเด็กซ์จี-50 จำนวน 25 กรัม ในสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร 300 มิลลิลิตร (ข้อ 3.1.3) นำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองเต็มที่ หลังจากทิ้งให้เย็นนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.9 x 67.5 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตต (ข้อ 3.1.3) ประมาณ 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ด้วยอัตราไหล 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวในสภาพสมดุลย์ หา void volume (V_o) ของคอลัมน์ และปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ (V_t) ด้วยสารละลายบลูเด็กซ์แทรนที่มีความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซนต์ และโปตัสเซียมไดโครเมตที่มีความเข้มข้น 9.7 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ

3.9.4 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเซฟาเด็กซ์จี-50

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ สารละลายไดโฟรินิลโมเจน (น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน) ไซโตโครมซี (น้ำหนักโมเลกุล 12,400 ดาลตัน) ไมโอโกลบิน (น้ำหนักโมเลกุล 17,800) บาซิตราซิน (น้ำหนักโมเลกุล 1,450 ดาลตัน) ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 (ข้อ 3.9.3) แล้วชะคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ด้วยอัตราไหล 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องบันทึกการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (UVICORD) แล้ววัดปริมาตรของสารละลายที่ใช้ชะโปรตีนตั้งแต่เริ่มแรกจนกระทั่งโปรตีนเริ่มออกจากคอลัมน์ (V_e) นำไปคำนวณค่า K_{av} ตามสูตร

$$K_{av} = V_e - V_o / V_t - V_o$$

V_e คือ elution volume ของโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์

V_o คือ void volume ของคอลัมน์

V_t คือ total bed volume ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า K_{av}

3.9.5 การทำนิวโรทอกซินให้บริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุล

นำสารละลายนิวโรทอกซินที่ได้จากคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 (ข้อ3.9.1) ให้เข้มข้นขึ้นโดย

กรองผ่านเมมเบรน (Amicon YM-5 membrane) ด้วยเครื่องอุลตราฟิลเตรชัน ภายใต้ความดันของก๊าซไนโตรเจน 1 กิโลกรัมต่อตารางนิ้ว (Cherdchu, Viriyakijja และ Ratanabanangkoon, 1978) นำสารละลายนิวโรทอกซินที่ทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วจำนวน 4 มิลลิลิตร ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 (ข้อ 3.9.4) ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตต (ข้อ 3.1.3) ด้วยอัตราไหล 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ส่วนละ 2 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วัดปริมาตรของสารละลายที่ใช้ชะนิวโรทอกซินออกจากคอลัมน์ (V_e) แล้วนำไปคำนวณค่า K_{av} และหาน้ำหนักโมเลกุลของนิวโรทอกซินจากกราฟมาตรฐาน (ข้อ 3.9.4)

3.9.6 <u>การทำดาร์ติโอทอกซินให้บริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุล</u>

นำสารละลายดาร์ติโอทอกซินที่ได้จากคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 (ข้อ 3.9.2) ไปเข้มข้นขึ้นโดยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน นำสารละลายที่ทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วจำนวน 5 มิลลิลิตร ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 (ข้อ 3.9.3) และคำนวณหาค่า K_{av} และหาน้ำหนักโมเลกุลของดาร์ติโอทอกซินเช่นเดียวกับวิธีทำในข้อ 3.9.4

3.10 <u>การทดสอบสมบัติการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก</u> (Karlsson, 1971)

3.10.1 <u>การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง</u>

นำเลือดคนมาเติมเอซิลีนไดอามีนเตตราละซีติกแอซิดให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด หลังจากนั้นนำเลือดมาปั่นแยกเอาเซลล์เม็ดเลือดแดงออก ด้วยความเร็ว 1,000X g เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Kokusan) ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ข้อ 3.2.1) 5 ครั้ง ปั่นแยกเอาเซลล์เม็ดเลือดแดงออกเช่นเดียวกับข้างต้นและนำไปใช้ในการทดลองต่อไปทันที

3.10.2 <u>การหาความเข้มข้นของเซลล์เม็ดแดงที่เหมาะสม</u>

กระจายเซลล์เม็ดเลือดแดงจากข้อ 3.10.1 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ข้อ3.2.1) ให้มีเปอร์เซนต์ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 1-5 % นำสารแขวนลอยเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 มิลลิลิตรมาทำให้แตก 100 % โดยเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงตั้งต้นที่เหมาะสมเมื่อเกิดการแตก 100 % ควรจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ประมาณ 0.8

3.10.3 การทดสอบสมบัติการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกของสารตัวอย่าง

ละลายสารตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์(ข้อ 3.2.2) ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.25 มิลลิลิตร เติมสารแขวนลอยเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.10.2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงไปเขย่าเบาๆให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์(ข้อ 3.2.1) 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 X g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่แตกออก ดูดส่วนน้ำใสขึ้นมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หลอดควบคุมใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์(ข้อ 3.2.1)แทนสารตัวอย่าง คำนวณเปอร์เซนต์การแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดังนี้

$$\% \text{ HEMOLYSIS} = \frac{OD_s - OD_c}{OD_t - OD_c} \times 100$$

OD_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงในหลอดของสารตัวอย่างจากนิยาม

OD_t คือ ค่าการดูดกลืนแสงในหลอดที่มีการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง 100%

OD_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงในหลอดควบคุม

3.11 วิธีการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ

นำสารละลายบัฟเฟอร์ชับสเทรต(ข้อ 3.3.5)มา 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในตัวเวลลขนาด 2 มิลลิลิตร เริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายตัวอย่าง(ข้อ 3.3.6) 0.01 มิลลิลิตรลงไปเขย่าให้เข้ากันแล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 578 นาโนเมตร ที่เปลี่ยนไปทุกๆ 10 วินาที

เอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ จะเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เลซิธิน(lecithin)ให้เป็นไลโซเลซิธิน(lysolecithin)และกรดไขมันอิสระ สารละลายปฏิกิริยาจึงมีสภาพเป็นเบสเพิ่มขึ้น ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของสีอินดิเคเตอร์ที่ความยาวคลื่น 578นาโนเมตรเปลี่ยนไป แอคติวิตีของเอนไซม์ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อหนึ่งหน่วยนาที

3.12 การแยกโปรตีนด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟรีซิสชนิดไม่ต่อเนื่อง

(Reisfeld,et al,1962)

3.12.1 การเตรียมเจล

บรรจุสารละลายรีโซลวิงเจล(ข้อ 3.4.8) ในแผ่นแก้วคู่ขนานขนาด 1.5 มม.x16 ซม x18 ซม.(ระหว่างแผ่นแก้วมี spacer กั้นอยู่)จนสารละลายมีความสูง 12เซนติเมตร ค่อยๆหยดน้ำกลั่นลงบนผิวเจลจนท่วมหน้าเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจลแล้วเติมสารละลายสแตคกิงเจล (ข้อ 3.4.9)ลงไปในแผ่นแก้วคู่ขนานที่มีหวี (comb)อยู่ โดยเติมสารละลายจนถึงระดับที่ห่างจากขอบบนของแผ่นแก้วประมาณ 4 มิลลิเมตร ค่อยๆหยดน้ำกลั่นลงบนผิวเจลจนท่วมหน้าเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัวประมาณ 45 นาทีค่อยๆดึงหวีออก ล้างผิวเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จะได้แผ่นเจลที่พร้อมที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

3.12.2 การทำอีเลคโทรโฟรีซิส

ใส่แผ่นเจล(ข้อ3.12.1)ลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ pH 6.5(ข้อ3.4.1)ลงในอ่างบัฟเฟอร์ทั้งบนและล่างจนท่วมแผ่นเจล ปรับอุณหภูมิของอ่างบัฟเฟอร์ให้ได้ 10 องศาเซลเซียส นำสารละลายตัวอย่างไปหยอดลงในหลุมเจล(wells)โดยใช้ปริมาณโปรตีนต่อหลุมประมาณ 10-150 ไมโครกรัมและปริมาตรที่หยอดประมาณ 10-50 ไมโครลิตรและหยอดสีตามรอย(ข้อ 3.4.11)10 ไมโครลิตร ลงในหลุม 1-2 หลุม ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 50 มิลลิแอมแปร์ต่อแผ่นเจล โดยกำหนดให้ขั้วบวกอยู่ด้านบน ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.12.3 วิธีย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจล

แกะแผ่นเจล(ข้อ3.12.2)ออกจากแผ่นกระจก แล้วนำไปแช่ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (ข้อ 3.4.12)ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน(ข้อ 3.4.13) จนกระทั่งแผ่นเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน

3.13 การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเอสดีเอสโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส

3.13.1 การเตรียมเจล

บรรจุสารละลายรีโซลวิงเจล(ข้อ 3.5.11) ในแผ่นแก้วคู่ขนานที่มีหวีอยู่(เหมือนข้อ 3.12.1)ค่อยๆหยดน้ำกลั่นลงบนผิวเจลจนท่วมหน้าเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง ค่อยๆดึงหวีออก ล้างผิวเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จะได้แผ่นเจลที่พร้อมที่

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะใช้ในการทดลองต่อไป

3.13.2 การทำอิเลคโทรโฟรีซิส

ใส่แผ่นเจล (ข้อ 3.13.1) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ (วิธีทำเหมือนข้อ 3.12.2 ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 60 มิลลิแอมแปร์ต่อแผ่นเจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน รอจนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนลงไปจนถึงระยะอีกประมาณ 1 เซนติเมตรจะสุดปลายล่างของเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.13.3 วิธีย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจล

แกะแผ่นเจล (ข้อ3.13.2) ออกจากแผ่นกระจกแล้วนำไปแช่ในสารละลายฟิกเซทีฟ (ข้อ 3.5.7) 5 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ข้อ 3.5.9) ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (ข้อ 3.5.8) จนกระทั่งแผ่นเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน

3.14 การหาค่า LD_{50} (Karber, 1931)

นำสารตัวอย่างที่จะทดสอบความเป็นพิษมาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆกัน 8 ค่า แต่ละค่าห่างกัน 1.12 เท่า ใช้ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายตัวอย่างฉีดเข้าหนูขาว (mice) น้ำหนักประมาณ 15-16 กรัม เข้าทางเส้นเลือดดำที่หางโดยใช้ความเข้มข้นละ3 ตัว หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงบันทึกจำนวนหนูที่ตายต่อจำนวนหนูที่ถูกฉีด (response ratio) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า LD_{50} ดังนี้

สูตรสำหรับหาค่า LD_{50}

$$m = X_s - d(S_i - 1/2)$$

m คือ log LD_{50}

X_s คือ log dose at highest dose level

d คือ interval between successive log dose

$S_i = \Sigma P_i$ P_i = response ratio

3.15 วิธีติดฉลากนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินด้วยไอโอดีน-125 (Hunter, 1974)

3.15.1 วิธีติดฉลากนิวโรทอกซินด้วยไอโอดีน-125

ใส่สารละลายนิวโรทอกซิน (ข้อ 3.6.4) 0.01 มิลลิลิตร ในไมโครเซนตริฟิวจ์ทิวบ์

ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(ข้อ 3.6.1) 0.02 มิลลิลิตร โซเดียมไอโอไดด์-125(5 มิลลิคูรี)0.001 มิลลิลิตรและสารละลายคลอรามีนที(ข้อ3.6.2)0.01 มิลลิลิตรตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที เติมสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์(ข้อ 3.6.3) 0.05 มิลลิลิตรทันที แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(ข้อ 3.6.1) 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากัน

3.15.2 การทำนิวโรทอกซินติดฉลากด้วยไอโอดีน-125 ให้บริสุทธิ์

นำผลปฏิกิริยาจากข้อ 3.15.1ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-25 ขนาด 1x10เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(ข้อ 3.6.1) เก็บแยกส่วนส่วนละ 1 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนไปวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสีด้วยเครื่องวัดปริมาณรังสีแกมมา(GAMMA COUNTER)

3.15.3 วิธีติดฉลากคาร์ดิโอทอกซินด้วยไอโอดีน-125

ใส่สารละลายคาร์ดิโอทอกซิน(ข้อ 3.6.5) 0.01 มิลลิลิตร ในไมโครเซนตริฟิวจ์ทิวบ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(ข้อ 3.6.1) 0.02 มิลลิลิตร โซเดียม-ไอโอไดด์-125 (5 มิลลิคูรี) 0.001 มิลลิลิตร และสารละลายคลอรามีนที 0.01 มิลลิลิตร (ข้อ 3.6.2)ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน 10 นาที เติมสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์(ข้อ 3.6.3) 0.05 มิลลิลิตรทันที แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(ข้อ 3.6.1) 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากัน

3.15.4 การทำคาร์ดิโอทอกซินติดฉลากด้วยไอโอดีน-125 ให้บริสุทธิ์

นำสารปฏิกิริยาจากข้อ 3.15.3ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-25 ขนาด1x10เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(ข้อ 3.6.1)เก็บแยกส่วนส่วนละ 0.5 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนไปวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสีด้วยเครื่องวัดปริมาณรังสีแกมมา(GAMMA COUNTER)

3.16 การเตรียมคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินกับโปรตีนตัวนำ

การเชื่อม (conjugate)ทอกซินเข้ากับโปรตีนตัวนำ ทำได้โดยมีคาร์โบไดอิไมด์เป็นตัวช่วยให้เกิดการเชื่อมกันและติดตามปฏิกิริยาด้วยทอกซินติดสลาก เพื่อหาจำนวนของทอกซินที่เข้าไปเชื่อมกับโปรตีนตัวนำ

3.16.1 การคำนวณหาน้ำหนักของสารตั้งต้นที่จะใช้ในการคอนจูเกต

ถ้าอัตราส่วนจำนวนโมลของสารตั้งต้น (reagent molar ratio) ที่ต้องการใช้คือ นิวโรทอกซิน : ไทโรกลอบูลิน : คาร์โบไดอิไมด์ เป็น 100:1:200 ดังนั้นต้องใช้

นิวโรทอกซิน : ไทโรกลอบูลิน : คาร์โบไดอิไมด์

100 X 8000 : 1 X 660,000 : 200 X 191.71

10 : 8 : 0.48 มิลลิกรัม

(น้ำหนักโมเลกุลของไทโรกลอบูลิน = 660,000 ดาลตัน นิวโรทอกซิน = 8000 ดาลตัน คาร์โบไดอิไมด์ = 191.71 ดาลตัน)

3.16.2 การเตรียมคอนจูเกต

สารละลายที่ 1 ละลายโปรตีนตัวนำ 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร

สารละลายที่ 2 ละลายนิวโรทอกซิน 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมสารละลายนิวโรทอกซินติดสลาก (ข้อ 3.15.2) ลงไป 25 ไมโครลิตร

สารละลายที่ 3 ละลายคาร์โบไดอิไมด์ไฮโดรคลอไรด์ 2.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 11.7 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายที่ 2 ตลอดเวลาด้วยเครื่องผสมแม่เหล็ก ค่อยๆหยดสารละลายที่ 1 ทีละหยดจนครบปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมตลอดเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลายปฏิกิริยาไปกรองผ่าน centrifugal ultrafree แยกทอกซินอิสระออกจากทอกซินคอนจูเกต แล้วนำไปทำให้แห้ง

3.16.3 การหาอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างทอกซินกับโปรตีนตัวนำ

การหาอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างทอกซินกับโปรตีนตัวนำ (Incorporation molar ratio) จะต้องทราบปริมาณโปรตีนและสารรังสีที่มีอยู่ในสารละลายปฏิกิริยาข้อ 3.16.2 ซึ่งเก็บเอาไว้ 10ไมโครลิตร และสารละลายคอนจูเกตที่แยกได้จากการทดลองและแบ่งเก็บเอาไว้ นำสารละลายทั้ง 2 มาหาปริมาณโปรตีนและปริมาณรังสี

3.16.3.1 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนในสารละลายตามวิธีของLowry (ภาคผนวก)

3.16.3.2 การวัดปริมาณรังสี

นำสารละลายจากข้อ 3.16.2 มา 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปนับจำนวนสารรังสีโดยใช้เครื่องนับรังสีแกมมา (GAMMA COUNTER)

3.16.3.3 การคำนวณ

หลังจากหาปริมาณโปรตีนและปริมาณสารรังสีแล้ว นำมาคำนวณหาอัตราส่วน

จำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างทอกซินกับโปรตีนตัวนำดังต่อไปนี้

สมมุติปริมาณสารรังสีในสารละลายทอกซินคอนจูเกตจากข้อ 3.16.2 วัดได้ Q1 cpm ต่อปริมาณโปรตีน P มิลลิกรัม ปริมาณสารรังสีในสารละลายปฏิกิริยา ข้อ 3.16.2 วัดได้ Q2 cpm ต่อปริมาณทอกซิน S มิลลิกรัม โปรตีนตัวนำมีน้ำหนักโมเลกุล 660,000 ดาลตัน และนิวโรทอกซินมีน้ำหนักโมเลกุล 8,000 ดาลตัน ดังนั้นอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลของการจับกันระหว่างทอกซินกับโปรตีนตัวนำเท่ากับ

จำนวนโมเลกุลของทอกซิน: จำนวนโมเลกุลของโปรตีนตัวนำ

$$\frac{660{,}000 \times S \times Q1}{8{,}000 \times P \times Q2} : 1$$

3.17 การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนตินิวโรทอกซินและแอนติคาร์ดิโอทอกซิน

3.17.1 การเตรียมอิมมูโนเจนสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง

เลือกคอนจูเกตที่มีจำนวนโมเลกุลของนิวโรทอกซินหรือคาร์ดิโอทอกซินจับกับ โปรตีนตัวนำ(carrier protein)ในอัตราส่วนสูงๆ และเป็นคอนจูเกตที่มีความเป็นพิษต่ำ(detoxified) ไปใช้ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง ละลายอิมมูโนเจนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ที่ปลอดเชื้อ ให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปผสมกับแอดจูแวนท์(Complete Freund Adjuvant) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำให้เป็นอิมัลชันโดยการผสมสารละลายอิมมูโนเจนและแอดจูแวนท์อย่างละ 1.5 มิลลิลิตรในกระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร 2 อันที่ต่อกันด้วยวาวว์ 3 ทาง(three- way valve) ฉีดผสมกันจนได้อิมัลชันมีลักษณะเนื้อและมีสีขาวขุ่น ทดสอบการเป็นอิมัลชันโดยการหยดลงในน้ำถ้าหยดอิมัลชันไม่แผ่ออกแสดงว่าใช้ได้ อิมมูโนเจนที่เตรียมได้นี้จะนำไปใช้ทันที

3.17.2 การฉีดอิมมูโนเจนให้สัตว์ทดลอง

แบ่งกลุ่มกระต่ายที่ใช้ทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว แต่ละกลุ่มจะถูกฉีดอิมมูโนเจนต่างกันดังนี้

กลุ่มที่ 1 นิวโรทอกซิน

กลุ่มที่ 2 นิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต(NtX-Tg)

กลุ่มที่ 3 คาร์ดิโอทอกซิน

กลุ่มที่ 4 คาร์ดิโอทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต(CtX-Tg)

โกนขนกระต่ายบริเวณหลังขนาด 5X15 เซนติเมตร ใช้อิมมูโนเจนที่เตรียมจากข้อ 3.17.1 1 มิลลิลิตรฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังหลายๆจุด จุดละประมาณ 0.2 มิลลิลิตร (intradermal multiple sites injection)

3.17.3 ระยะเวลาของการฉีดสัตว์ทดลอง

หลังจากการฉีดอิมมูโนเจนให้กระต่ายครั้งแรก(first injection)แล้วจะต้องฉีดซ้ำอีก(booster injection)ทุกๆ 4-5 สัปดาห์

3.17.4 ระยะเวลาของการเจาะเลือดสัตว์ทดลอง

ก่อนฉีดอิมมูโนเจนครั้งแรกจะเจาะเลือดกระต่ายไว้เป็นตัวเปรียบเทียบ(control)และเจาะหลังจากนั้นทุกๆสัปดาห์

3.17.5 การแยกซีรัม

เลือดที่เจาะได้จะใส่ในหลอดแก้วและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเลือดแข็งตัวจึงดูดเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวไปปั่นที่ความเร็ว 1000 X g เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนน้ำใสออก(ซีรัม)เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.18 การทำเอาซ์เทอโลนีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (Ouchterlony immunodiffusion)

3.18.1 การเตรียมเจล

เทเจล 1.2 เปอร์เซนต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์(ข้อ 3.7.1) 5 มิลลิลิตร ลงในเพลต(plate)ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตรตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งแข็งตัว เจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร บริเวณตรงกลางและรอบๆหลุมกลาง 6 หลุม แต่ละหลุมห่างจากหลุมกลาง 1 เซนติเมตร

3.18.2 การหาปริมาณแอนติบอดี

หยอดสารละลายแอนติเจนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมกลาง(ข้อ 3.18.1) หยอดซีรัมที่ได้จากกระต่ายที่ผ่านการฉีดกระตุ้นแล้วที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลุมรอบๆ หลุมละ 20 ไมโครลิตร เก็บเพลตในกล่องที่มีความชื้นสูง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง สังเกต precipitin line ที่เกิดขึ้น แอนติบอดีไตเตอร์ คือ จำนวนเท่าสูงสุดของการเจือจางแอนติซีรัมที่ยังทำให้เกิด precipitin line

3.18.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัม

หยอดซีรัมที่ได้จากกระต่ายที่ผ่านการฉีดกระตุ้นแล้ว 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมกลาง (ข้อ 3.18.1)และหยอดสารละลายนิษงูชนิดต่างๆความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมรอบๆหลุมละ 20 ไมโครลิตร เก็บเพลตในกล่องที่มีความชื้นสูง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง สังเกต precipitin line ที่เกิดขึ้น

3.19 <u>การหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA</u> (Voller et al,1986)

3.19.1 <u>การหาปริมาณแอนติพิวโรทอกซิน</u>

ละลายพิวโรทอกซินในโคตติ้งบัฟเฟอร์(coating buffer)(ข้อ 3.8.1) ให้มีความเข้มข้น 1ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบแต่ละหลุมในเพลต(ELISA microtiter plate,Nunc, Denmark)ด้วยสารละลายพิวโรทอกซิน 100 ไมโครลิตร เก็บเพลตไว้ในกล่องที่มีความชื้นสูงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์-ทวีน(ข้อ 3.8.3) 3 ครั้ง ครั้งละ 200 ไมโครลิตร เจือจางซีรัมที่ต้องการหาปริมาณแอนติบอดีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์(ข้อ 3.8.2)ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน นำไปหยอดในแต่ละหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลตไว้ในกล่องที่มีความชื้นสูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์-ทวีน(ข้อ 3.8.3) 3 ครั้ง ครั้งละ 200 ไมโครลิตร เจือจางคอนจูเกต goat antirabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate(Sigma) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์-ทวีน(ข้อ 3.8.3)ให้มีความเข้มข้น 1:1000 เติมสารละลายดังกล่าวในแต่ละหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลตไว้ในกล่องที่มีความชื้นสูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์-ทวีน(ข้อ 3.8.3) 3 ครั้ง ครั้งละ 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายซับสเตรท(ข้อ 3.8.6)ในแต่ละหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลตไว้ในกล่องที่มีความชื้นสูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์(ข้อ3.8.5)50 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านผล ELISA (Titertek Multiskan) แอนติบอดีไตเตอร์ คือ จำนวนเท่าของการเจือจางแอนติซีรัมที่ให้ค่า OD มากกว่า OD ของ baseline 0.4

3.19.2 การหาปริมาณแอนติคาร์ดิโอทอกซิน

เคลือบแต่ละหลุมในเพลต (ELISA microtiter plate, Nunc, Denmark) ด้วยสารละลายคาร์ดิโอทอกซินที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 100 ไมโครลิตร ต่อจากนั้นทำเช่นเดียวกับข้อ 3.19.1

3.20 การทดสอบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษ (Neutralization)

ชั่งพิษงู 10 มิลลิกรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 % ลงไป 10 มิลลิลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าเบาๆระวังไม่ให้เกิดฟอง เจือจางสารละลายพิษงูให้มีความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการ โดยปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตรแล้วเติมซีรัมลงไป 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที นำไปฉีดหนูทดลองขนาดน้ำหนัก 20-21 กรัม ความเข้มข้นละ 3 ตัว ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร สังเกตผลภายใน 24ชั่วโมง

อัตราส่วนหนูตายทั้งหมด (0/3)

อัตราส่วนหนูรอดทั้งหมด (3/3)

หาค่า protective concentration (concentration สุดท้ายที่หนูรอดตั้งแต่ 2/3) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของพิษงูต่อ 1 มิลลิลิตรของซีรัม แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า potency (ค่า protective concentration ต่อ 5 มิลลิลิตรของซีรัม) ดังแสดงในตัวอย่างต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

VENOM 1mg/ml (ml)	NORMAL SALINE (ml)	SERUM (ml)	SURVIVAL
0.08	0.92	1.o	3/3
*0.12	0.88	1.0	2/3
0.16	0.84	1.0	0/3

* 0.12 มิลลิกรัมของพิษงูต่อ 1 มิลลิลิตรของซีรัม = Protective concentration

Neutralization potency = Protective concentration X 5มิลลิลิตรของซีรัม

= 0.6 มิลลิกรัมของพิษงูต่อ 5 มิลลิลิตรของซีรัม

ค่า LD_{50}ของพิษงูเห่าไทย = 5.8 ไมโครกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร

= 11.6 ไมโครกรัมต่อ 1.0 มิลลิลิตร

Protective concentration = 0.12 มิลลิกรัมของพิษงูต่อ 1 มิลลิลิตรของซีรัม

= 120 ไมโครกรัมของพิษงูต่อ 1 มิลลิลิตรของซีรัม

= 120/11.6 LD_{50}

= 10.4 LD_{50}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย