บทที่ 3

บทอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.

1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น D-7200 ของบริษัท GS, W. Germany.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.

1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Baush & Lomb, USA.

1.4 UV-visible spectrophotometer รุ่น UV-160 A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

1.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Coming, USA.

1.6 เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela, Japan.

1.7 เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator)

- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (microtube) รุ่น W- 385 ของบริษัท Heat System Ultrasonics, USA.

- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ชนิดอ่าง) รุ่น FS4000 ของบริษัท Decon Ultrasonics Ltd., England.

1.8 เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (rotary vacouum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.

1.9 เครื่องปั่น (homogenizer) รุ่น AM-T ของบริษัท Nihon Seiki Kaisha, Japan.

1.10 ชุดเครื่องมือทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ไมโครไตเตอร์เพลทขนิด 96 หลุม (96-well microtiter plate) ของบริษัท Nunc, Denmark.

- หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกขนาด 15 มล. (plastic centrifuge tube) ของบริษัท Becton Dickinson and Company, USA.

- ขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลเพาะเลี้ยง (plastic cell culture flask) ของบริษัท Becton Dickinson and Company, USA.

- ปิเปต (pipet) และปิเปตเอด (pipet aid)

- กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscope) รุ่น C.K. ของบริษัท Olympus, Japan.

1.11 ชุดเครื่องมือทำอิเลกโทรโฟริซิส (electrophoresis)

- เครื่องอิเลกโทรโฟริซิส (electrophoresis) ของบริษัท Biomidi, France

- แผ่นเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate film) ของบริษัท Biomidi, France

1.12 SEP-PAK C_{18} cartridge รุ่น classic ของบริษัท Waters, USA.

1.13 หัวกรอง ขนาดความกว้างของช่อง 0.45 ไมครอน รุ่น HV ของบริษัท Nihon Millipore Tokyo K.K., Japan.

1.14 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCQ USA.

1.15 คอลัมน์โครมาโตกราฟี รุ่น Econo ของบริษัท Bio-Rad, U.S.A

2. เคมีภัณฑ์

2.1 ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

2.2 โพลีเปปโตน (polypeptone) ของบริษัท Becton Dickinson and CO., USA.

2.3 กลูโคส (glucose) ของบริษัท E.Merck, Germany.

2.4 ไฟโตน (phytone) ของบริษัท BectonDickinson and CO., USA.

2.5 โพติโอสเปปโตนหมายเลข 3. (proteose peptone No.3)
ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

2.6 วิตามิน บี 12 (vitamin B12) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

2.7 ไบโอติน (biotin) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

2.8 ทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) อะมิโนมีเทน ($C_4H_{11}NO_3$)
ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

2.9 ทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA) ของบริษัท Gibco, USA.

2.10 วอบาย (ouabain) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

2.11 เวอราตริดีน (veratridine) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

2.12 เอ็มทีที (3 -[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2, 5-diphenyltetrazolium bromide),$C_{18}H_{16}N_5BBr$ ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

2.13 สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน ของบริษัท Sigma Chemical, Massachusette.

2.14 สารมาตรฐานกอนิออทอกซิน 1,2,3 และ 4 (0.5 MU/ μl) ได้จาก Marine Biological Chemistry Laboratory, School of Fishery Scienoe, Kitasato University, Japan.

2.15 ฟีตัลโบวีนซีรัม (fetal bovine serum) ของบริษัท Gibco, USA.

2.16 RPMI 1640 ของบริษัท Gibco, USA.

2.17 ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน-สเตรปโตมัยซิน (penicillin-streptomycin) ของบริษัทGibco,USA

2.18 ผงถ่าน (activated charcoal) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

2.19 ผงถ่าน (activated charcoal) ของบริษัท Riedel-de Haen, Germany.

2.20 ไบโอเจล พี 2 (Bio-Gel P-2) ของ Bio-Rad Laboratories, U.S.A.

2.21ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (CM-Sephadex C-25) ของบริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

สารเคมีอื่นๆเป็นสารเคมีในระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัทต่างๆ Sigma Chemical, USA. และ E. Merck, Germany.

3. จุลินทรีย์

Vibrio sp. สายพันธุ์ St-1-1 ซึ่งได้ศึกษาภาวะการเลี้ยงเชื้อและปรับปรุงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างพิษแล้วโดย นันทวัน ฤทธิ์เดช (2539)

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทะเล *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและการสกัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากภายในเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum)

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ซึ่งเลี้ยงอยู่บนอาหารแข็ง ORI (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) (Shimidu et al., 1983) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูป ปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว L-medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) (นันทวัน, 2539) ที่มีปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (cultivation)

นำหัวเชื้อมาวัดค่าความขุ่นหรือค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเจือจางหัวเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ให้ได้ความขุ่น 0.5 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 มล. ลงในอาหารเหลวปริมาตร 150 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. นำไปเขย่าโดยใช้สภาวะเดิม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปั่นแยกเก็บเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แขวนลอยตะกอนเซลล์ในกรดน้ำส้ม 0.1 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ปริมาตร 10-20 มล. จนได้ค่าความเป็นกรดด่าง 3-4 เพื่อนำไปสกัดสารพิษต่อไป

การสกัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากเซลล์

ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) นาน 7 นาที โดยในระหว่างการทำให้เซลล์แตกต้องควบคุมให้เซลล์อยู่ในอุณหภูมิต่ำ โดยการแช่หลอดที่บรรจุเซลล์ในน้ำแข็งตลอดเวลา (เนื่องจากการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงจะเกิดความร้อนขึ้น) จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิเพื่อแยกส่วน

กากเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บเฉพาะส่วนน้ำใส

นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) ส่วนผงที่ได้คือสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย นำไปชั่งน้ำหนักแห้งและเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

การสกัดสารพิษในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว

นำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 50 มล. เติม 0.1 เปอร์เซนต์กรดน้ำส้มในน้ำกลั่นจนได้ค่าความเป็นกรดด่าง 3-4 และนำไปต้มในน้ำเดือดนานประมาณ 20 นาที ทำให้เย็นลง จึงนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บเฉพาะส่วนน้ำใส

นำส่วนน้ำใสมาทำให้แห้งเป็นผงด้วยเครื่องระเหิดแห้ง และชั่งน้ำหนักผงที่ได้แล้วนำมาเติม 0.1เปอร์เซนต์กรดน้ำส้มในเมทธานอล ปริมาตร 50 มล. เขย่าด้วยมือ นาน 5 นาที เพื่อสกัดสารพิษออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บส่วนชั้นเมทธานอลและเติม 0.1 เปอร์เซนต์กรดน้ำส้มในเมทธานอลลงไปอีก 50 มล. เพื่อสกัดสารพิษซ้ำ และนำไปปั่นที่สภาวะเดิม ทำการสกัดสารพิษซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

รวบรวมชั้นเมทธานอลแต่ละครั้งใส่ลงในขวดระเหยรูปกลม นำมาระเหยเอาชั้นเมทธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (rotary evaporator) ใช้อุณหภูมิ 60 °ซ หลังจากระเหยเมทธานอลออกหมด เติม 0.1 เปอร์เซนต์กรดน้ำส้มในเมทธานอลลงไปอีก ปริมาตร 30 มล. เขย่าและปั่นแยกตะกอนเพื่อเก็บชั้นเมทธานอลและระเหยเมทธานอลออกที่สภาวะเดิม ทำการทดลองซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นชั่งน้ำหนักผงของสารพิษที่สกัดได้ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

4.2 การเตรียมสารละลายของสารพิษ เพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

ชั่งสารสกัดจากเชลล์แบคทีเรียหรืออาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microtube)และละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปราศจากเชื้อ โดยให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มก. ต่อ 10 ไมโครลิตร

4.3 การตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture assay)ร่วมกับเทคนิค absorption photometry

แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนคือ

1. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ตามวิธีของ Kogure et al. (1988)

เลี้ยงเซลล์ประสาทหนู (mouse neuroblastoma cell line, Neuro-2A ATCC CCL 131) ในขวดพลาสติกชนิดคอเอียง โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงคือ RPMI 1640 ที่เติมโบวีนซีรัม 10 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนเซลล์มีปริมาณมากพอและมีสภาพสมบูรณ์

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดจนแห้งและเติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.3ข) ปริมาตร 2 มล. ดูดทิ้งเพื่อล้างเซลล์ไม่ดีออก

เติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ ปริมาตร 3 มล. ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ใช้มือเคาะข้างขวดหรือเป่าด้วยปิเปตเอดเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่ติดอยู่บนพื้นขวดหลุดออกมา

เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มล. เขย่าเบาๆ ดูดเซลล์ที่แขวนลอยใส่หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกปราศจากเชื้อ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง

เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดที่มีตะกอนเซลล์ ปริมาตร 5 มล. ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงหลายๆ ครั้งเพื่อกระจายเซลล์ ดูดส่วนหนึ่งไปตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตเมเตอร์(haemacytometer)

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscope) ใช้กำลังขยาย 200 เท่า และเจือจางเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ 1.0-1.5 x 10^5 เซลล์ต่อมล.

2. วิธีการตรวจหาคุณสมบัติการกีดขวางช่องโซเดียม

ดูดเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมได้ (ความเข้มข้น 1.0-1.5 x 10^5 เซลล์ต่อมล.) ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจดูสภาพเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรน์แบบกลับ ก่อนนำไปใช้

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมๆละ 40 ไมโครลิตร และเติมสารละลายของสารพิษที่เตรียมจากข้อ 4.2 หลุมละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงและกวนเบาๆ

เติมสารละลายวอบาย (ouabain) เข้มข้น 10 mM (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.1) หลุมละ 20 ไมโครลิตร และสารละลายเวอราตริดีน (veratridine) เข้มข้น 1 mM (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.2) หลุมละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (vertex mixture)

ทำการทดลองสองซ้ำในแต่ละตัวอย่างและทำการทดลองชุดควบคุมควบคู่ไปด้วย โดยใช้สารเทโทรโดทอกซิน (ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.) เป็นสารมาตรฐานสำหรับตรวจหาคุณสมบัติการกีดขวางช่องโซเดียมโดยเตรียมเทโทรโดทอกซินให้มีความเข้มข้น 0, 0.0088, 0.0176, 0.0352, 0.0682, 0.1408, 0.2750, 0.55 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ นำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. วิธีตรวจหาปริมาณสารที่มีสมบัติกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเอ็มทีที (MTT bioassay) ดัดแปลงจากวิธีของ Mosmann (1983)

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากไมโครไตเตอร์เพลทหลุมๆละ 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายของเอ็มทีที ที่มีความเข้มข้น 5 มก./มล. (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.4) หลุมละ 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ดูดสารละลายในไมโครไตเตอร์เพลทออกหลุมละ 150 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไอโซโพรพานอล ที่มีกรดเกลืออยู่มีความเข้มข้น 0.04 นอร์มัล (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.5) ลง

ไปหลุมละ 250 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกเกลือฟอร์มาซานของเอ็มทีที นำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4. การคำนวณหาร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีชีวิต ดังสูตร

$$\text{ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{(\text{experimental abs.} - \text{blank})}{(\text{positive control abs.} - \text{blank})} \times 100$$

โดยที่ :

experimental abs. คือ ค่าความดูดกลืนแสงของสารละลายที่ประกอบด้วยสารพิษตัวอย่างหรือสารเทโทโดทอกซินมาตรฐาน

positive control abs. คือ ค่าความดูดกลืนแสงของสารละลายจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีสารพิษตัวอย่าง

คำนวณค่าร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีชีวิต แล้วนำไปเทียบหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดได้ทั้งจากเซลล์แบคทีเรียและจากอาหารเลี้ยงเชื้อกับกราฟมาตรฐานของเทโทรโดทอกซินที่ใช้เป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมมาตรฐาน เมื่อทราบปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่แบคทีเรียสร้างขึ้นทั้งหมดแล้วจึงนำสารพิษไปหาวิธีทำให้มีความบริสุทธิ์ต่อไป

1 Mouse Unit (MU.) หมายถึง ปริมาณสารพิษที่สามารถทำให้หนูตายภายใน 30 นาที หลังจากการฉีดเข้าทางช่องท้อง (i.p.) (Kawabata,1978)

4.4 การทำสารกีดขวางช่องโซเดียมให้มีความบริสุทธิ์

แบ่งผงแห้งของสารผสมระหว่างสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณเล็กน้อย เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการทำสารกีดขวางช่องโซเดียมที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมีความบริสุทธิ์และสูญเสียสารพิษในแต่ละขั้นตอนน้อยที่สุด โดยทดลองตามขั้นตอนต่างๆแบ่งเป็น 2 แบบ คือ

แบบที่ 1 การดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal adsorption) และโครมาโตราฟีบนไบโอเจล พี 2 (Bio-Gel P-2 chromatography)

แบบที่ 2 โครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี 2 และโครมาโตกราฟีบนซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (CM-Sephadex C-25 chromatography)

รายละเอียดของขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละแบบมีดังนี้

แบบที่ 1 การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์โดยการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์และโครมาโตกราฟีบนไบโอเจลพี 2

1. การเตรียมผงถ่านกัมมันต์

แช่ผงถ่านกัมมันต์ในน้ำกลั่นปริมาตรเป็นสองเท่า กวนเป็นเวลา 30 นาที ตั้งไว้ให้ผงถ่านตกตะกอน ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบนทิ้งเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนเล็กๆ และเติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่าเดิมเพื่อนำไปกวนอีกเป็นเวลา 30 นาที ตั้งไว้ให้ตกตะกอนทำซ้ำอีกสองครั้ง นำผงถ่านที่กำจัดสิ่งเจือปนออกแล้วไปอบด้วยความร้อนเพื่อไล่ความชื้นออกจากรูพรุนของผงถ่าน

2. การหาชนิดของผงถ่านกัมมันต์ที่เหมาะสมในการทำสารพิษให้บริสุทธิ์

โดยเปรียบเทียบความสามารถในการดูดซับสารพิษที่ความเข้มข้นต่างๆ ของผงถ่านกัมมันต์ 2 ชนิด คือ

- ผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Sigma chemical, USA. และ
- ผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Riedel-de Haen, Germany.

แบ่งผงสารพิษปริมาณน้อยละลายในน้ำกลั่นสองครั้งให้มีความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5,จนถึง 5.0 MU/มล. ใส่ในบีกเกอร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายให้ได้ 6.5 (ทำการทดลอง 2 ชุด) นำแต่ละความเข้มข้นไปกวนกับผงถ่านกัมมันต์ทั้งสองชนิดที่เตรียมไว้ปริมาณ 0.5 กรัม เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที แยกเก็บตะกอนผงถ่านกัมมันต์และนำส่วนน้ำใสมาเติมผงถ่านกัมมันต์อีก 0.5 กรัม เพื่อดูดซับสารพิษที่เหลือ(รวมใช้ผงถ่านกัมมันต์ 1.0 กรัม ต่อสารพิษแต่ละความเข้มข้น) นำไปกวนและปั่นแยกที่สภาวะเดียวกัน รวบรวมตะกอนของผงถ่านกัมมันต์ที่มีสารพิษถูกดูดซับอยู่ทั้ง

สองครั้ง เติมสารละลาย 1 เปอร์เซนต์กรดน้ำส้มใน 20 เปอร์เซนต์เอทธานอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ปริมาตรสองเท่าของปริมาตรที่ใช้ละลายผงสารพิษ กวนเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อสกัดสารพิษที่ถูกดูดซับบนผงถ่านกัมมันต์ให้หลุดออกมา นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเก็บส่วนน้ำใส นำตะกอนผงถ่านกัมมันต์มาเติมสารละลาย 1 เปอร์เซนต์กรดน้ำส้มใน 20 เปอร์เซนต์เอทธานอล และทำการสกัดซ้ำเช่นเดิมอีกสองครั้ง รวบรวมส่วนน้ำใสที่มีสารพิษละลายอยู่ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง ชั่งหาน้ำหนักแห้งทั้งหมด นำไปหาปริมาณสารพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตามวิธีในข้อ 4.3

เลือกผงถ่านกัมมันต์ชนิดที่สามารถดูดซับสารพิษได้มากกว่า โดยดูจากปริมาณสารพิษที่สกัดได้และมีค่าความเป็นพิษจำเพาะ (specific toxicity, หน่วยของความเป็นพิษ/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด)สูงกว่า เพื่อใช้ในการสกัดสารพิษในปริมาณมากเช่นเดียวกับวิธีที่กล่าวมาแล้วต่อไป

3. การนำผงถ่านกัมมันต์ชนิดที่เหมาะสมไปใช้ในการดูดซับสารพิษ

การใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการดูดซับสารพิษในปริมาณมาก ทำเช่นเดียวกับข้อที่ 2 ยกเว้นการใช้อัตราส่วนของผงถ่านกัมมันต์ต่อสารละลายสารพิษ เป็น 1ต่อ 2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้งเช่นเดียวกัน

4. การใช้คอลัมน์ไบโอเจล พี 2

แช่ไบโอเจล พี 2 ในสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 โมลาร์(ภาคผนวก ข หมายเลข 6) ปริมาตรมากเกินพอ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. เทส่วนน้ำใสพร้อมเจลละเอียดทิ้ง เติมสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 โมลาร์ลงไปอีก ปล่อยทิ้งให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดทิ้งทำเช่นนี้หลายๆครั้ง ครั้งสุดท้ายเติมสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 โมลาร์และนำเจลไปดูดอากาศออกประมาณ 30 นาที บรรจุเจลลงในคอลัมน์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. ยาว 30 ซม. ผ่านสารละลายกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.03 โมลาร์ ปริมาตรโดยประมาณเป็น 3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 15 มล./ ชม. นำสารละลายสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ได้จากการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ตามวิธีข้อ 4.4.1มาใส่บนผิวหน้าเจลเบาๆชะด้วย 0.03 โมลาร์กรดน้ำส้มด้วยอัตราเร็ว 15 มล./ชม. เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. นำแต่ละลำดับส่วนไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง

ระเหิดแห้งชั่งน้ำหนักแห้งและตรวจสอบความเป็นพิษของสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นคำนวณค่าความเป็นพิษจำเพาะ (specific toxicity) ของแต่ละลำดับส่วน

แบบที่ 2 โดยใช้โครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี 2 และโครมาโตกราฟีบนซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25

1. การใช้โครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี 2 ทำเช่นเดียวกับแบบที่ 1 ยกเว้นใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. บรรจุเจลสูง 44 ซม. ชะคอลัมน์ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.03 โมลาร์ อัตราการไหล 15 มล.ต่อชม.

2. การใช้คอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25

แช่ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (CM-Sephadex C-25) ในน้ำกลั่นปริมาณมากเกินพอ นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดปรับอุณหภูมิที่ 100 °ซ นาน 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น เทส่วนน้ำใสพร้อมเจลละเอียดทิ้ง ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง ครั้งสุดท้ายนำไปกรองบนชุดกรองเพื่อแยกน้ำออกจากเจล จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.4 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.1) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 นำเจลไปดูดอากาศออกประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. ยาว 20 ซม. ผ่านสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.2) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 ลงในคอลัมน์ประมาณ 3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 16 มล./ชม. นำสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ในข้อ 1 และทำให้แห้งโดยการระเหิดแห้งมาละลายในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 มาใส่ลงบนผิวเจลเบาๆชะสารพิษด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามสารที่ถูกชะออกมาจากการติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จึงชะสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ถูกจับด้วยเจลออกโดยใช้สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต 0.1- 0.4 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 เก็บลำดับส่วนละ 5 มล. นำแต่ละลำดับส่วนไปทำให้แห้งโดยการระเหิดแห้ง จากนั้นวัดชั่งน้ำหนักแห้งและตรวจสอบความเป็นพิษของสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากนั้นคำนวณค่าความเป็นพิษจำเพาะ (specific toxicity) ของแต่ละลำดับส่วน

เปรียบเทียบการทำให้บริสุทธิ์ทั้งสองแบบ (ดังที่กล่าวในข้อ 4.4) โดยเลือกวิธีที่ทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์สูงสุดและสูญเสียปริมาณสารพิษน้อยที่สุด เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์ในปริมาณมากต่อไป

การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อมีความบริสุทธิ์ มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ ทำเช่นเดียวกับวิธีในแบบที่ 1 ข้อ 3

2. การใช้คอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ทำเช่นเดียวกับวิธีในแบบที่ 1 ข้อ 4 ยกเว้นการใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. ยาว 50 ซม.

3. การใช้คอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 ทำเช่นเดียวกับวิธีในแบบที่ 2 ข้อ 2 ยกเว้นการใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.0 ซม. ยาว 20 ซม.

การทำให้บริสุทธิ์แยกทำในสารสกัดจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อ หาค่าความเป็นพิษจำเพาะของสารพิษที่ได้ในแต่ละขั้นตอนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และศึกษาอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิส

4.5 การวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบสารกีดขวางช่องโซเดียม

เมื่อได้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่มีความบริสุทธิ์จากวิธีการที่เหมาะสมแล้ว นำสารที่มีความบริสุทธิ์นั้นมาทำการวิเคราะห์สมบัติของสารที่ทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

1. การวิเคราะห์โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซีส (Fallon และ Shimizu, 1977)

นำสารพิษตัวอย่างที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์และสารมาตรฐาน 5 ไมโครลิตร มาขีดลงบนแผ่นเซลล์ลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate membrane) ทำการทดลอง 2 ชุด โดยใช้สารละลายทริสบัฟเฟอร์ (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride, $C_4H_{11}NO_3.HCl$) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.7 (ภาคผนวก ข หมายเลข 9.1) เป็นสารละลายอิเลกโตรไลท์บัฟเฟอร์ (electrolyte buffer) ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 0.8 มิลลิแอมแปร์ (mA) ต่อความกว้างแผ่นเซลล์ลูโลสอะซีเตต 2.5 ซม. เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเซลล์ลูโลสอะซีเตตมาทำให้แห้งโดยเป่าด้วย hair dryer ตรวจดูการเรืองแสงของสารอื่น (false positive) ที่อาจเกิดขึ้น จากนั้นนำแผ่นเซลล์ลูโลสอะซีเตตแผ่นหนึ่งมาพ่นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 9.3) เพื่อวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ส่วนอีกแผ่นหนึ่งพ่นด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 9.2) เพื่อวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย แล้วนำแผ่นเซลล์ลูโลสอะซิเตตทั้งสองแผ่นไปให้ความ

ร้อนที่อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 10 นาที และตรวจดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

สารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอย่างในการวิเคราะห์นี้ได้แก่เทโทรโดทอกซิน (Sigma,Massachusette)และ GTX1-4 จาก Marine Biological Chemistry Laboratory, School of Fishery Science, Kitasato University, Japan.

2. การหาค่าความเป็นพิษจำเพาะของสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยการทดสอบกับเนื้อเยื่อ

เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิส พบว่า มีสาร GTX4 เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ จึงได้เตรียมสารละลายสารมาตรฐาน GTX4 (น้ำหนักโมเลกุล 411.3) ให้มีความเข้มข้น 0.0045 , 0.0023 และ 0.0011 MUต่อ 10 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบความเป็นพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามวิธีในข้อ 4.3 หน้า 29 โดยใช้สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน(Sigma, Massachusette) เป็นตัวแทนสารที่มีคุณสมบัติกีดขวางช่องโซเดียมเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานในการเปรียบเทียบหาความเป็นพิษและคำนวณหาความเป็นพิษจำเพาะ (MUต่อมิลลิกรัม) เพื่อนำค่าที่ได้ไปใช้เปรียบเทียบกับความเป็นพิษจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ได้จากแบคทีเรีย

3. การทดสอบความเสถียรของสารกีดขวางช่องโซเดียมในสภาวะความเป็นกรดด่าง

เพื่อเปรียบเทียบสมบัติความเสถียรของสารมาตรฐานกับสารตัวอย่างที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยละลายสารละลายสารมาตรฐาน GTX4 ให้มีความเข้มข้น 0.0040 MU/10 ไมโครลิตร เพื่อใช้ เปรียบเทียบกับสารพิษจากเซลล์ที่ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งละลายให้มีความเข้มข้น 0.0064 MU/10 ไมโครลิตร และสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งละลายให้มีความเข้มข้น 0.0028 MU/10 ไมโครลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาดเล็ก ทำการทดลอง 2 ชุด โดยชุดที่หนึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายสารพิษเป็น 3.0 และอีกชุดหนึ่งเป็น 8.5 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C จับเวลาหลังจากใส่ในอ่างน้ำร้อน 0, 1, 2, 3 และ4 ชม. โดยแบ่งเก็บตัวอย่างครั้งละ 30 ไมโครลิตร นำไปทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

I17212170

4. การทดสอบความเสถียรของสารกีดขวางช่องโซเดียมต่ออุณหภูมิ

ละลายสารละลายสารมาตรฐาน GTX4 ให้มีความเข้มข้น 0.0040 MU/10 ไมโครลิตรเพื่อใช้เปรียบเทียบกับสารพิษจากเซลล์ที่ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งละลายให้มีความเข้ม 0.0064 MU/ 10 ไมโครลิตร และสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งละลายให้มีความเข้มข้น 0.0028 MU/10 ไมโครลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ขนาดเล็ก โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.0 เตรียมการทดลองเป็น 2 ชุด นำหลอดใส่สารละลายสารพิษชุดหนึ่งไปต้มที่อุณหภูมิ 80 °C และอีกชุดหนึ่งไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เริ่มจับเวลา แบ่งเก็บตัวอย่างครั้งละ 30 ไมโครลิตร ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชม.นำไปทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย