บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมไลโปโซมที่หุ้มพิษงูเห่าไว้ภายใน

4.1.1 ลักษณะและขนาดของไลโปโซมที่เตรียมได้

4.1.1.1 ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์

จากการทดลองเตรียมไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ตามวิธีในข้อ 3.2.1 แล้วนำไปแยกไลโปโซมออกจากพิษงูอิสระ (crude venom) ตามวิธีในข้อ3.3.1 ดังแสดงในรูปที่ 4 จากนั้นนำหลอดที่มียอดสูงสุด (หลอดที่ 43)ไปดูลักษณะและขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนโดยวิธีเนกาทีฟสเตน พบว่าลักษณะของไลโปโซมมีทั้งแบบกลมและรี ส่วนใหญ่เป็นยูนิลาเมลลาและพบโอลิโกลาเมลลาปะปนอยู่บ้าง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแตกต่างกันตั้งแต่ 50-500 นาโนเมตรดังแสดงในรูปที่ 5a

4.1.1.2 ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์

จากการทดลองเตรียมไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ตามวิธีในข้อ 3.2.2 แล้วนำไปดูลักษณะและขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าไลโปโซมมีสีคล้ำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 250-1,000 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 5b

4.1.2 ปริมาณพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซม

4.1.2.1 ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์

เมื่อนำส่วนน้ำใส (supernate) ของสารละลายที่ได้จากข้อ 3.2.1ไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (ภาคผนวกข้อ 1) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณพิษงูเห่าที่ถูกหุ้มไว้ภายในไลโปโซม (%entrapped) พบว่ามีค่าระหว่าง 20-50 เปอร์เซนต์

4.1.2.2 ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์

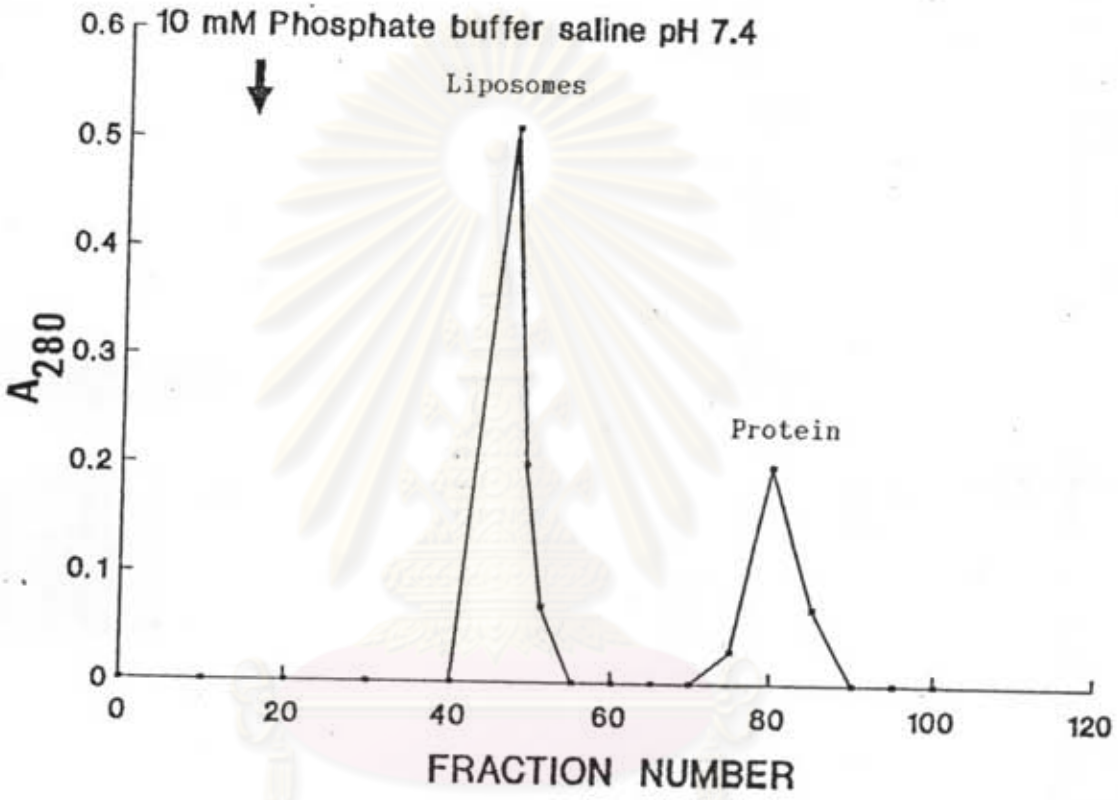
เมื่อนำส่วนน้ำใสของสารละลายที่ได้จากข้อ 3.2.2 ไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (ภาคผนวกข้อ 1)แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณพิษงูเห่าที่ถูกหุ้มไว้ภายในไลโปโซม พบว่ามีค่ามากกว่า 95 เปอร์เซนต์คือมีค่าอยู่ระหว่าง 95-97 เปอร์เซนต์

4.1.3 ผลการหาความเป็นพิษของพิษงูเห่าโดยการหา LD_{50}

ได้ทำการทดลองหาความเป็นพิษ (toxicity) ของพิษงูเห่าซึ่งเตรียมให้อยู่ในรูปต่าง ๆ โดยการหา LD_{50} ตามวิธีข้อ 3.5 ได้ค่า LD_{50} ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า LD_{50} ของพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ มีค่าสูงสุดคือ 265 ไมโครกรัม/หนู (mice) รองลงมาเป็นพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์และพิษงูเห่าที่ผสมออสเมียมเทตรอกไซด์โดยมีค่า LD_{50} 189.3 และ 13.2 ไมโครกรัม/หนู (mice) ตามลำดับ ส่วนพิษงูอิสระมี LD_{50} น้อยที่สุด คือ 5.6 ไมโครกรัม/หนู (mice)

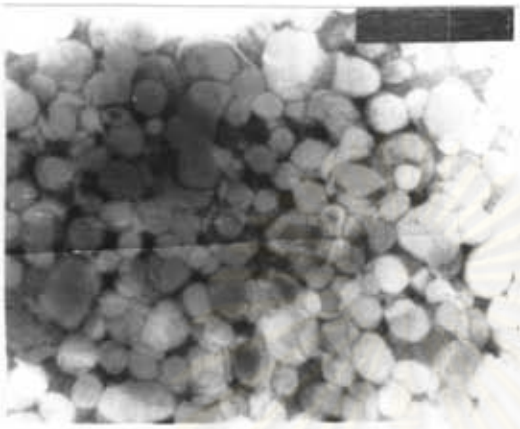
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 การแยกไลโปโซมออกจากพิษงูเห่าอินระโดยเซฟฟาโรส 4 บีดอลัมน์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 ลักษณะของไลโปโซมที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน



a. non-osmicated liposomes

(59,000 x)

b. osmicated liposomes

(20,000 x)

ตารางที่ 1 ความเป็นพิษของพิษงูเห่าที่อยู่ในรูปต่างๆ

การเตรียมพิษงูเห่า	LD_{50} (µg/mice)
พิษงูเห่าอิสระ (lyophilized crude venom)	5.6
พิษงูเห่า/ออสเมียมเทตรอกไซด์	13.2
พิษงูเห่า/ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์	189.3
พิษงูเห่า/ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์	265.0

พิษงูเห่า/ออสเมียมเทตรอกไซด์ คือพิษงูเห่าที่เตรียมโดยการผสมพิษงูเห่ากับออสเมียมเทตรอกไซด์

พิษงูเห่า/ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ คือพิษงูเห่าที่เตรียมให้อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์

พิษงูเห่า/ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ คือพิษงูเห่าที่เตรียมให้อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์สำหรับหาปริมาณพิษงูเห่า

4.2.1 ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของพิษงูเห่าที่ใช้เคลือบเพลท และของคอนจูเกต

ในการใช้วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ข้อ 3.7.1) สำหรับการหาปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า จำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของพิษงูเห่าที่ใช้เคลือบเพลทและของคอนจูเกต จึงได้ทดลองใช้ความเข้มข้นของพิษงูเห่าตั้งแต่ 0.125, 0.25,0.5และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการเคลือบเพลท และใช้คอนจูเกตที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000 และ 1:5,000 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของพิษงูและของคอนจูเกต (รูปที่ 6) ความเข้มข้นของพิษงูที่เหมาะสมที่ใช้เคลือบเพลทคือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอนจูเกตคือคอนจูเกตที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1,000 ซึ่งที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง (A_{405}) ที่สูงพอสำหรับวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ จึงใช้ความเข้มข้นนี้สำหรับการทดลองต่อ ๆ ไป

4.2.2 ผลการหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบเพลท

ได้ทดลองใช้เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการเคลือบเพลทในวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ข้อ 3.7.1) คือ 5 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส และ 18 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มตามเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการอินคิวเบต (รูปที่ 7) ในการทดลองต่อ ๆ ไปจะเลือกใช้เวลา 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นเวลาที่สะดวกสำหรับทำการทดลองและให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงพอสมควร

4.2.3 ผลการหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการอินคิวเบตแอนติบอดีกับพิษงูเห่า

จากการใช้เวลาและอุณหภูมิของการอินคิวเบตแอนติบอดีกับพิษงูเห่าต่าง ๆ กัน คือเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียสและ 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส(ข้อ 3.7.1) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการอินคิวเบต (รูปที่ 8) การใช้เวลา 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียสจะเหมาะสมสำหรับทำการทดลองมากกว่าและให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงพอสมควร จึงเลือกใช้สภาวะนี้สำหรับการทดลองต่อ ๆ ไป

4.2.4 ผลการหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกตกับแอนติบอดี

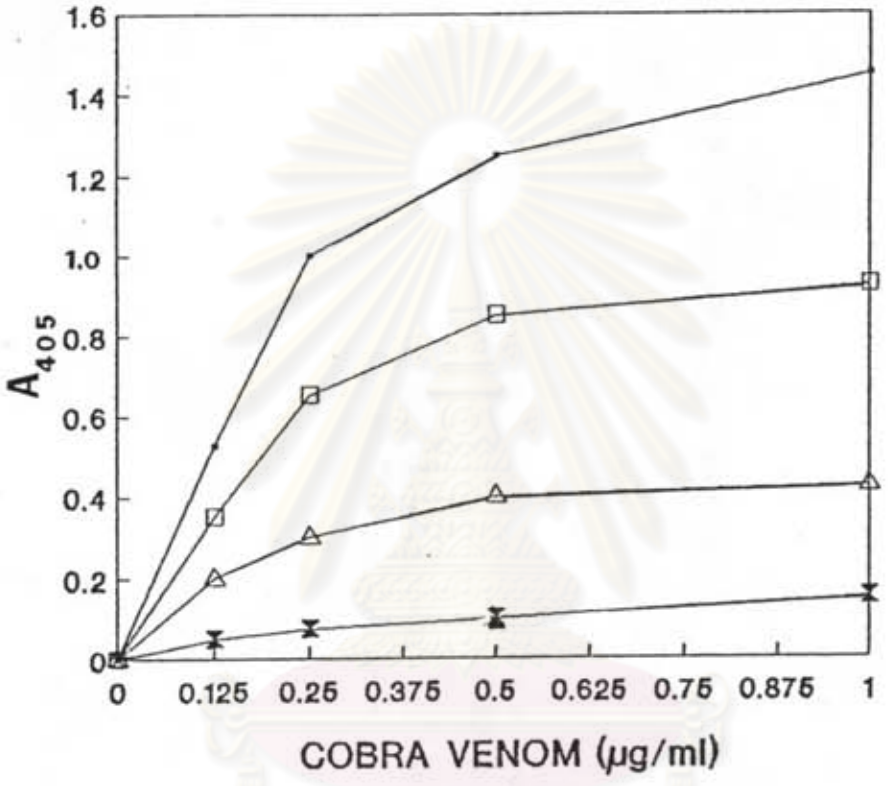
เมื่อทดลองใช้เวลาต่าง ๆ กัน สำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกตกับแอนติบอดี (ข้อ 3.7.1) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้อินคิวเบต (รูปที่ 9) พบว่าการใช้เวลาอินคิวเบต 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส จะสะดวกและเหมาะสมกว่าช่วงเวลาอื่น และให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่สูงเกินไป จึงเลือกใช้สภาวะนี้สำหรับการทดลองต่อ ๆ ไป

4.2.5 การหาไตเตอร์ของเซรุ่มกระต่าย

ในการหาปริมาณแอนติบอดี (ข้อ 3.7.1) ทำได้โดยการเจือจางแอนติเซรุ่มให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาณของแอนติบอดีจะแสดงเป็นค่าไตเตอร์ซึ่งคือจำนวนเท่าของการเจือจางแอนติเซรุ่มที่ให้ค่าการดูดกลืนแสง (A_{405}) สูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงของ base line เท่ากับ 0.4ดังตัวอย่างในรูปที่ 10 ซึ่งจะพบว่ามีค่าไตเตอร์เท่ากับ 7.6×10^4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 ผลความเข้มข้นของคอนจูเกตและของพิษงูเห่าที่ใช้เคลือบเพลท

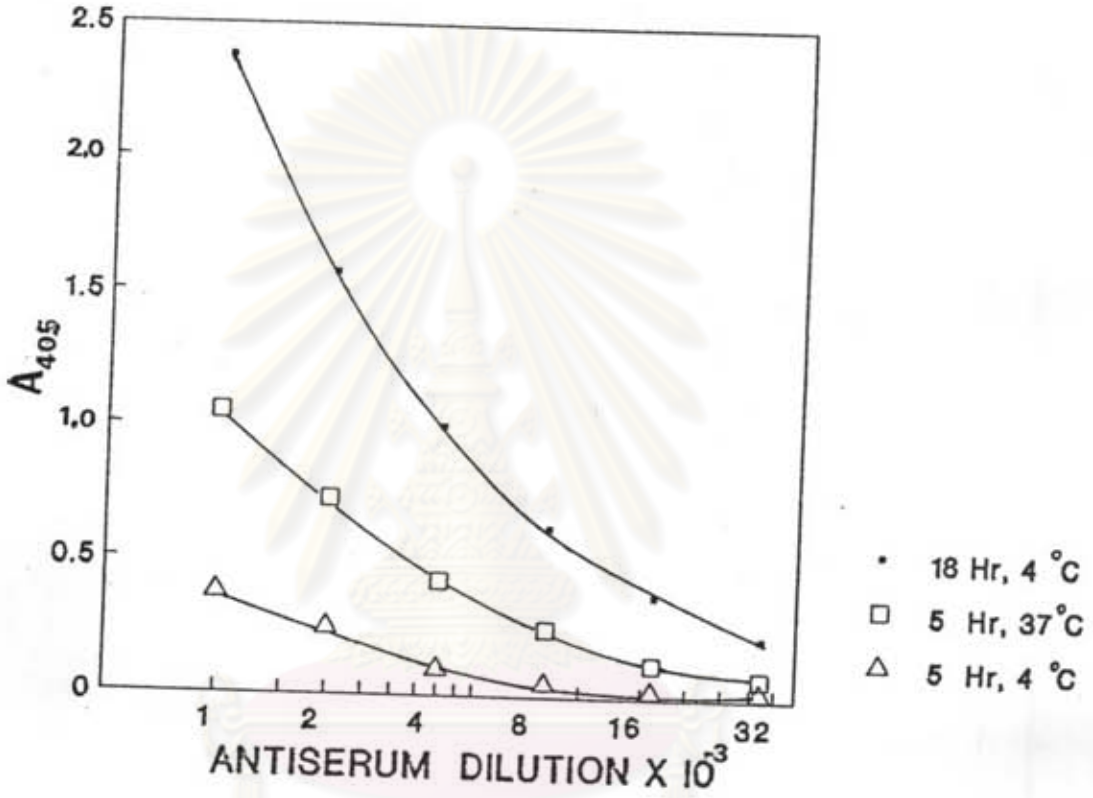


คอนจูเกตเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ทวีน pH 7.4

ในอัตราส่วน 1:1,000 (•—•), 1:2,000 (□—□), 1:4,000 (△—△), 1:5,000 (x—x)

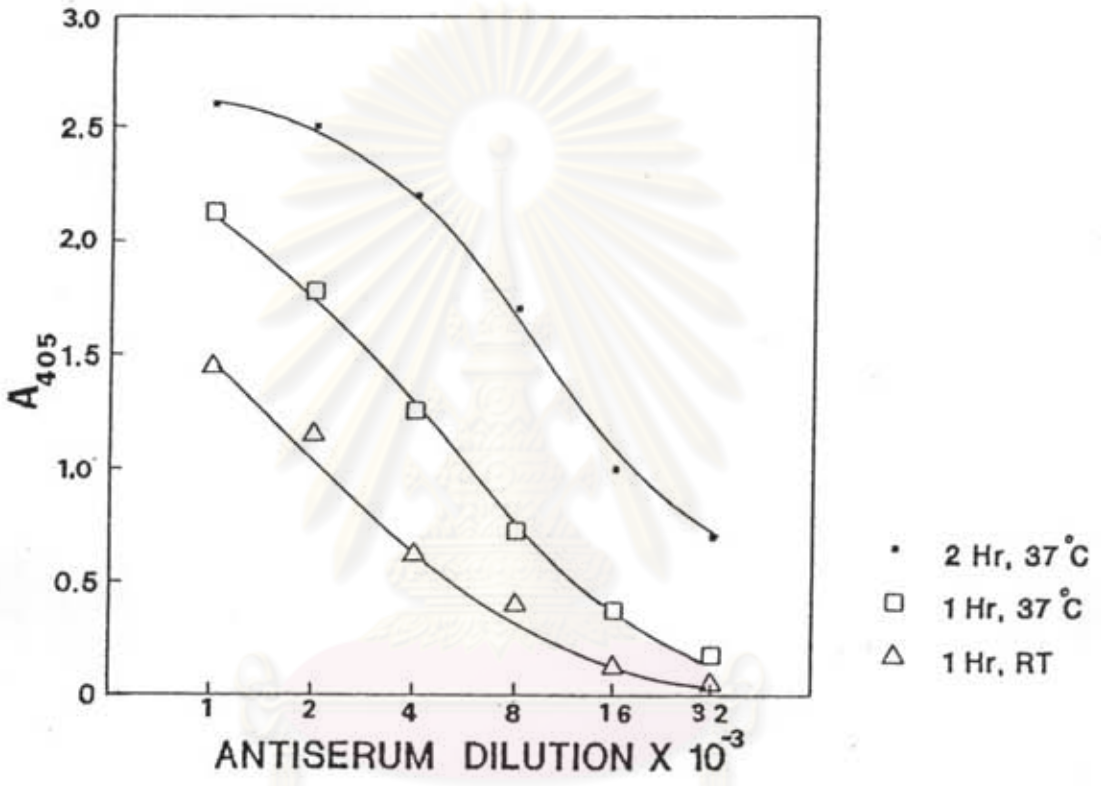
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการเคลือบเพลท



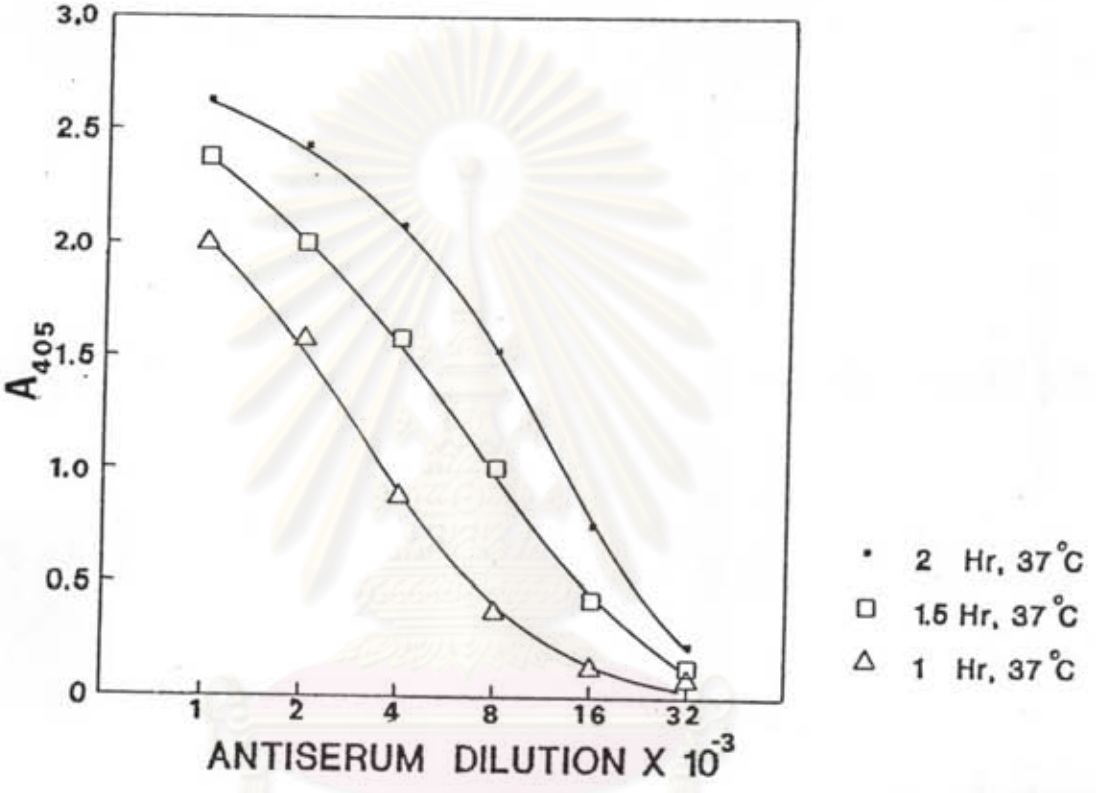
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการจับตัวเบตแอนติเซรุ่มกับพิษงูเห่า



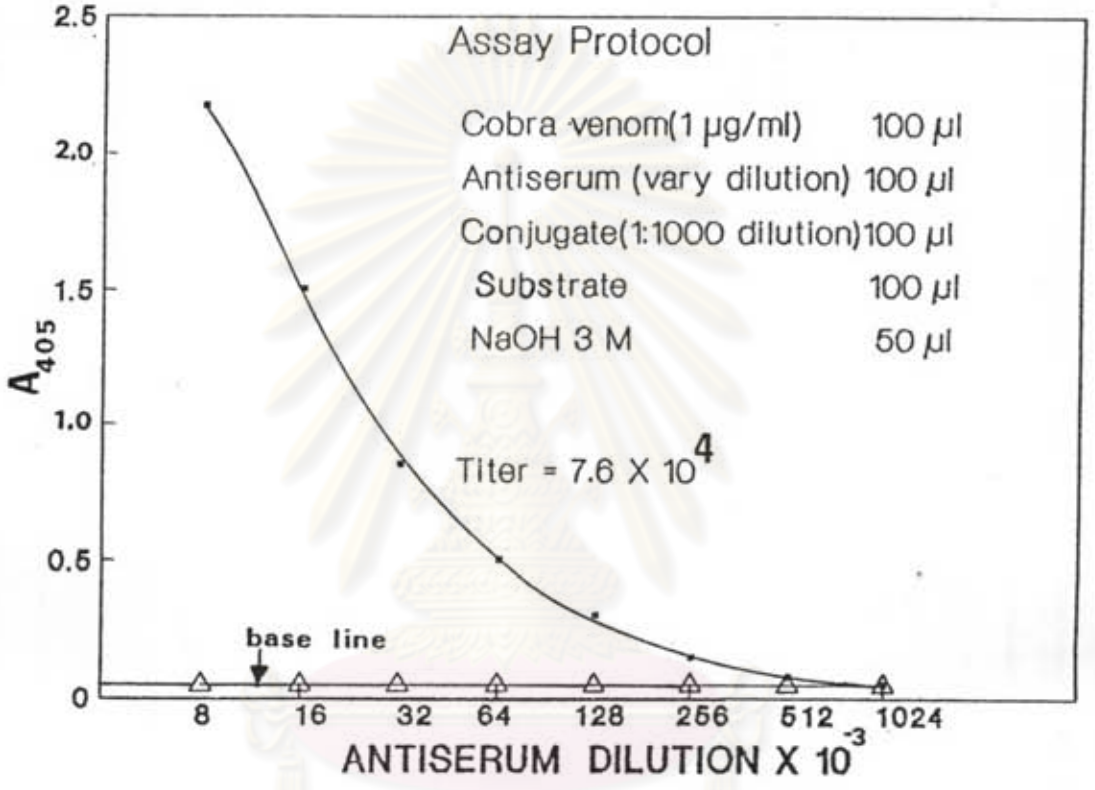
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 ผลของระยะเวลาสำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกตกับแอนติเซรุ่ม



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 การหาไตเตอร์ของเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลการหาปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย

ได้ทดลองฉีดอิมมูโนเจนชนิดต่าง ๆให้กับกระต่าย 4 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัว ดังรายละเอียดข้อ 3.6.3 เมื่อนำเซรุ่มของกระต่ายที่เก็บแต่ละครั้งมาหาปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าตามวิธีในข้อ 3.7.1 ได้ผลดังนี้

กระต่ายกลุ่มที่ 1 (Rb1,Rb2 และ Rb3)ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (รูปที่ 11) พบว่ากระต่าย Rb1 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังจากฉีดครั้งที่ 2 ประมาณ 1 สัปดาห์คือมีไตเตอร์ $2.1x10^5$ จากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งหลังฉีดซ้ำครั้งที่ 3 ประมาณ 1 สัปดาห์ จะมีปริมาณแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอีก แต่เพิ่มน้อยกว่าหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 คือมีไตเตอร์ $6x10^4$ และหลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงจนถึงสัปดาห์ที่ 52 ซึ่งมีไตเตอร์เหลือเพียง $7.6x10^3$ ส่วนกระต่าย Rb2 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังจากฉีดซ้ำครั้งแรก 2 สัปดาห์ และกระต่าย Rb3 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังจากฉีดซ้ำครั้งแรก 1 สัปดาห์ คือมีไตเตอร์ $8.6x10^4$ และ $7.5x10^4$ ตามลำดับ กระต่าย Rb2 และ Rb3 ตายหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 24 ชั่วโมง

กระต่ายกลุ่มที่ 2 (Rb4,Rb5 และ Rb6) ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (รูปที่ 12) พบว่ากระต่าย Rb4 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังการฉีดครั้งที่ 2 ประมาณ 1 สัปดาห์โดยมีไตเตอร์ $1.4x10^4$ หลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงและหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 3 ประมาณ 1 สัปดาห์จะเริ่มมีแอนติบอดีเพิ่มขึ้นคือมีไตเตอร์ $1.5x10^4$ ซึ่งมีค่าไตเตอร์สูงใกล้เคียงกับการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 หลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงช้า ๆ จนถึงสัปดาห์ที่ 52 เหลือไตเตอร์เพียง $2.5x10^3$ กระต่าย Rb5 สร้างแอนติบอดีได้ต่ำมากมีไตเตอร์สูงสุดหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 1 สัปดาห์เพียง $6x10^2$ จากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดต่ำลงมากจนหาค่าไม่ได้ในสัปดาห์ที่ 25 และเมื่อฉีดซ้ำครั้งที่ 3 พบว่ามีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นอีกเล็กน้อยคือมีไตเตอร์ $4.5x10^2$ หลังจากนั้นก็จะลดต่ำลงจนหาค่าไม่ได้ในสัปดาห์ที่ 38 ส่วนกระต่าย Rb6 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 1 สัปดาห์คือมีไตเตอร์ $7x10^4$ หลังจากนั้นปริมาณแอนติบอดีจะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งหลังฉีดซ้ำครั้งที่ 3 จึงจะเริ่มมีปริมาณแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอีกครั้ง และขึ้นสูงสุดหลังการฉีด 2 สัปดาห์ ซึ่งมีค่าไตเตอร์ $8x10^4$ และหลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงและเหลือไตเตอร์ $3x10^3$

ในสัปดาห์ที่ 52

กระต่ายกลุ่มที่ 3 (Rb7,Rb8 และ Rb9) ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 13) พบว่ากระต่าย Rb7 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 1 สัปดาห์ คือมีไตเตอร์ $1.7x10^4$ หลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงเรื่อย ๆ และเมื่อฉีดซ้ำครั้งที่ 3 ประมาณ 1 สัปดาห์ จะเริ่มมีปริมาณแอนติบอดีสูงขึ้นแต่น้อยกว่าการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 คือมีไตเตอร์ $8x10^3$ และหลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงอีก กระต่าย RB7 ตายหลังจากฉีดซ้ำครั้งที่ 3 ประมาณ 4 สัปดาห์ กระต่าย Rb8 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 1 สัปดาห์ คือมีไตเตอร์ $6x10^3$ หลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลง และเมื่อฉีดซ้ำครั้งที่ 3 จะมีปริมาณแอนติบอดีสูงขึ้นอีกหลังจากฉีดซ้ำ 1 สัปดาห์แต่สูงน้อยกว่าการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 คือมีไตเตอร์ $4x10^3$ จากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงอีกจนถึงสัปดาห์ที่ 52 จะมีไตเตอร์เหลือ $2.4x10^2$ ส่วนกระต่าย Rb_9 สร้างแอนติบอดีได้สูงขึ้นหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 1 สัปดาห์คือมีไตเตอร์ $4x10^3$ หลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลง และเมื่อฉีดซ้ำครั้งที่ 3 จะมีปริมาณแอนติบอดีสูงขึ้นและสูงสุดหลังการฉีด 2 สัปดาห์ คือมีไตเตอร์ $1x10^4$ แล้วระดับแอนติบอดีจะลดลงจนถึงสัปดาห์ที่ 52 จะเหลือไตเตอร์ประมาณ $2.7x10^2$

กระต่ายกลุ่มที่ 4(Rb10,Rb11 และ Rb12)ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (ทางใต้ผิวหนัง)(รูปที่ 14)พบว่ากระต่าย Rb10 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 2 สัปดาห์ คือมีไตเตอร์ $5x10^4$ หลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงจนมีไตเตอร์เป็น $8x10^3$ ในสัปดาห์ที่ 18 กระต่าย Rb11 และ Rb12 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 1 สัปดาห์และมีไตเตอร์ $5.6x10^3$ และ $1.2x10^4$ ตามลำดับหลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงจนมีไตเตอร์เป็น $2x10^3$ และ $1x10^4$ ในสัปดาห์ที่ 18 ตามลำดับ

ค่าไตเตอร์สูงสุดของแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าที่อยู่ในรูปต่าง ๆ ให้กับกระต่ายได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

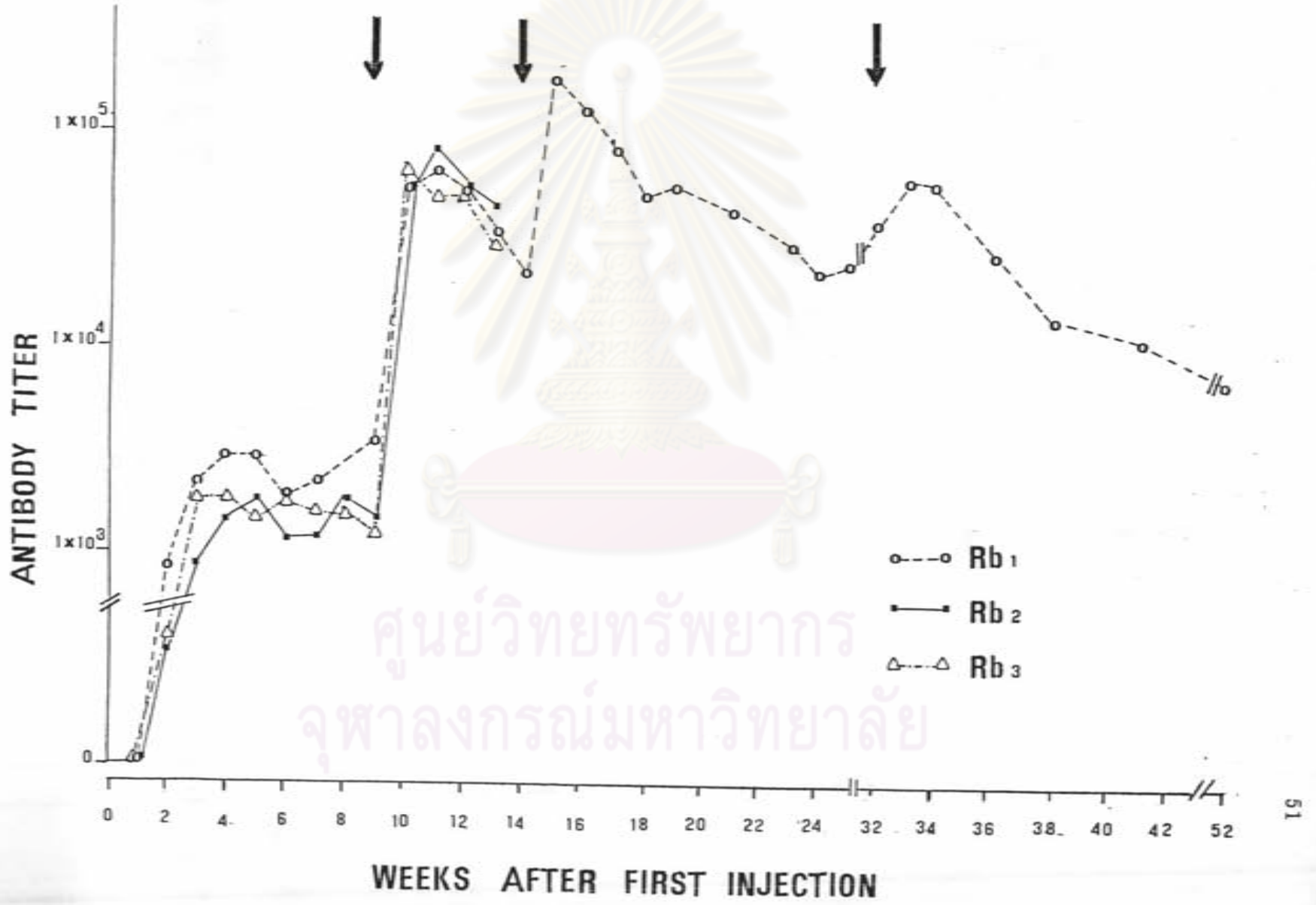
รูปที่ 11 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 1 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์

เครื่องหมาย ↓ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยพิษงูปริมาณเท่าเดิม

การฉีดกระต่ายในแต่ละครั้ง ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ ซึ่งมีปริมาณพิษงูเห่าอยู่ 500 ไมโครกรัมละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) 0.5 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต้นกลุ่มที่ 1 สร้างขึ้นภายหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

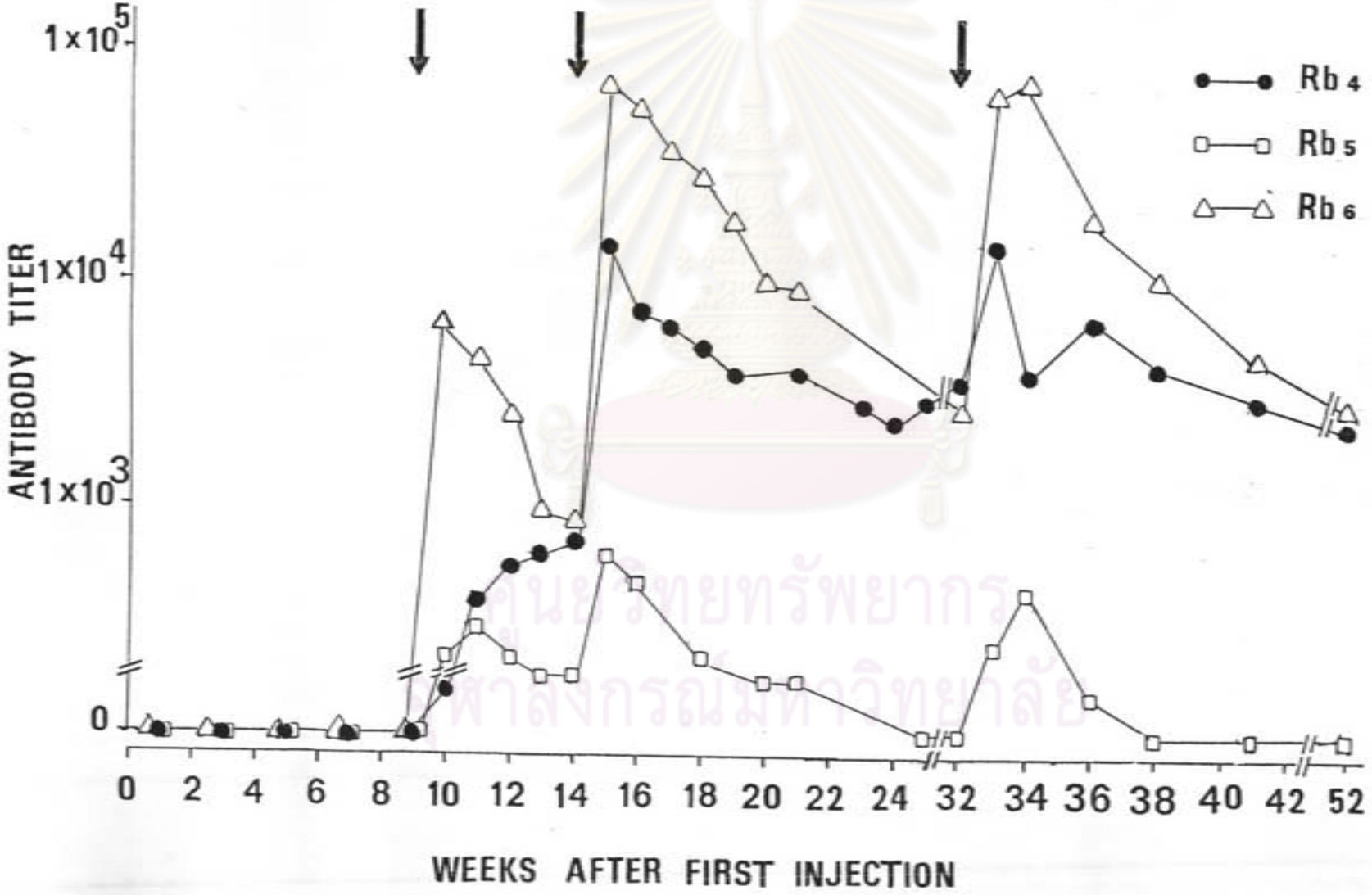
รูปที่ 12 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 2 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์

เครื่องหมาย ↓ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยพิษงูปริมาณเท่าเดิม

การฉีดกระต่ายในแต่ละครั้ง ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ ซึ่งมีปริมาณพิษงู 500 ไมโครกรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) 0.5 มิลลิลิตรโดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 2 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์



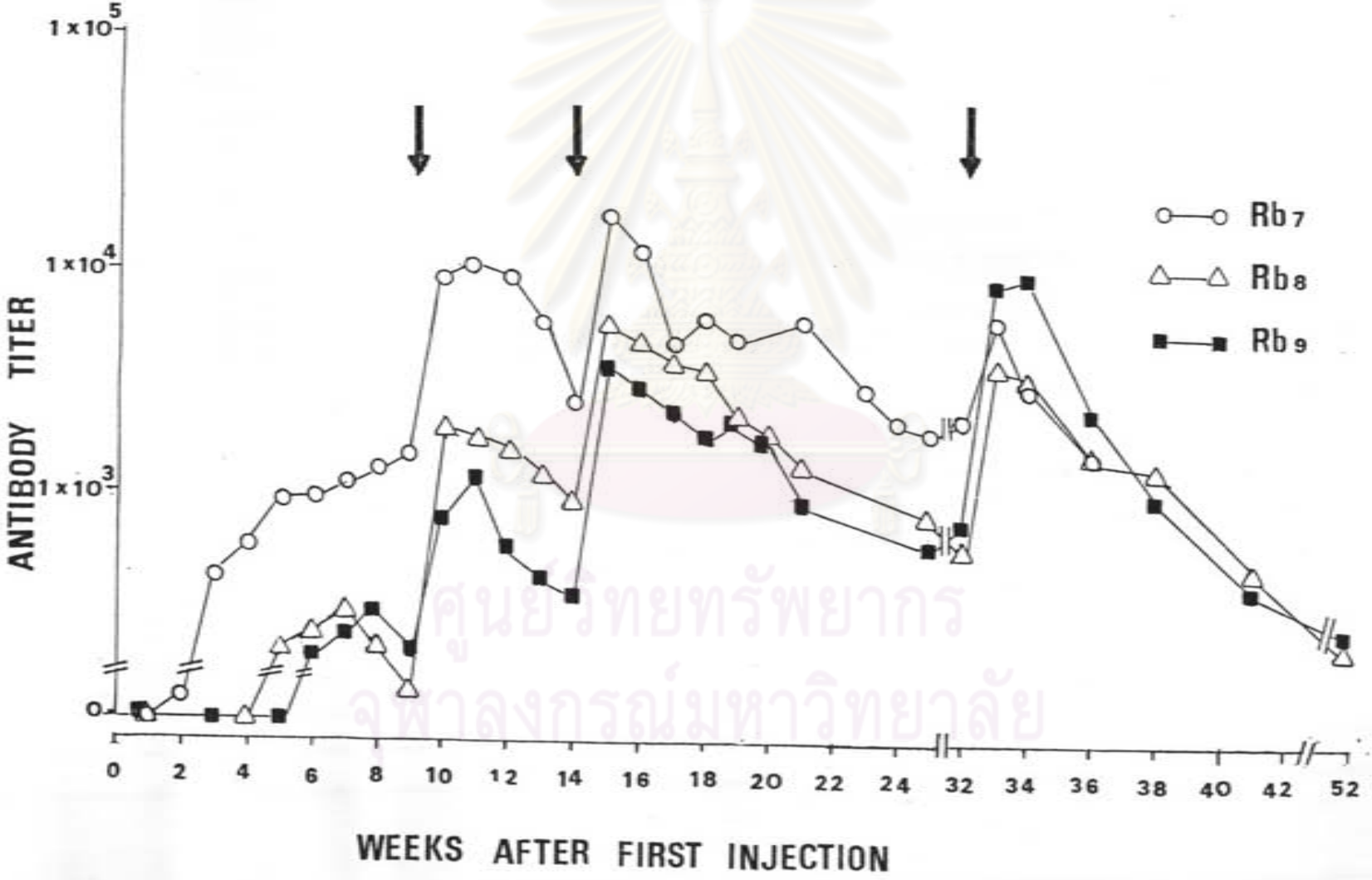
รูปที่ 13 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 3 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่ละลายโซเดียมคลอไรด์

เครื่องหมาย ↓ แสดงถึงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยพิษงูปริมาณเท่าเดิม

การฉีดกระต่ายในแต่ละครั้ง ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์)ซึ่งมีปริมาณพิษงู 20 ไมโครกรัมในปริมาตร 0.5มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 ปริมาณแอนติบอดีต่อทิษยู เห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 3 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยทิษยู เห่าที่ละลายภายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

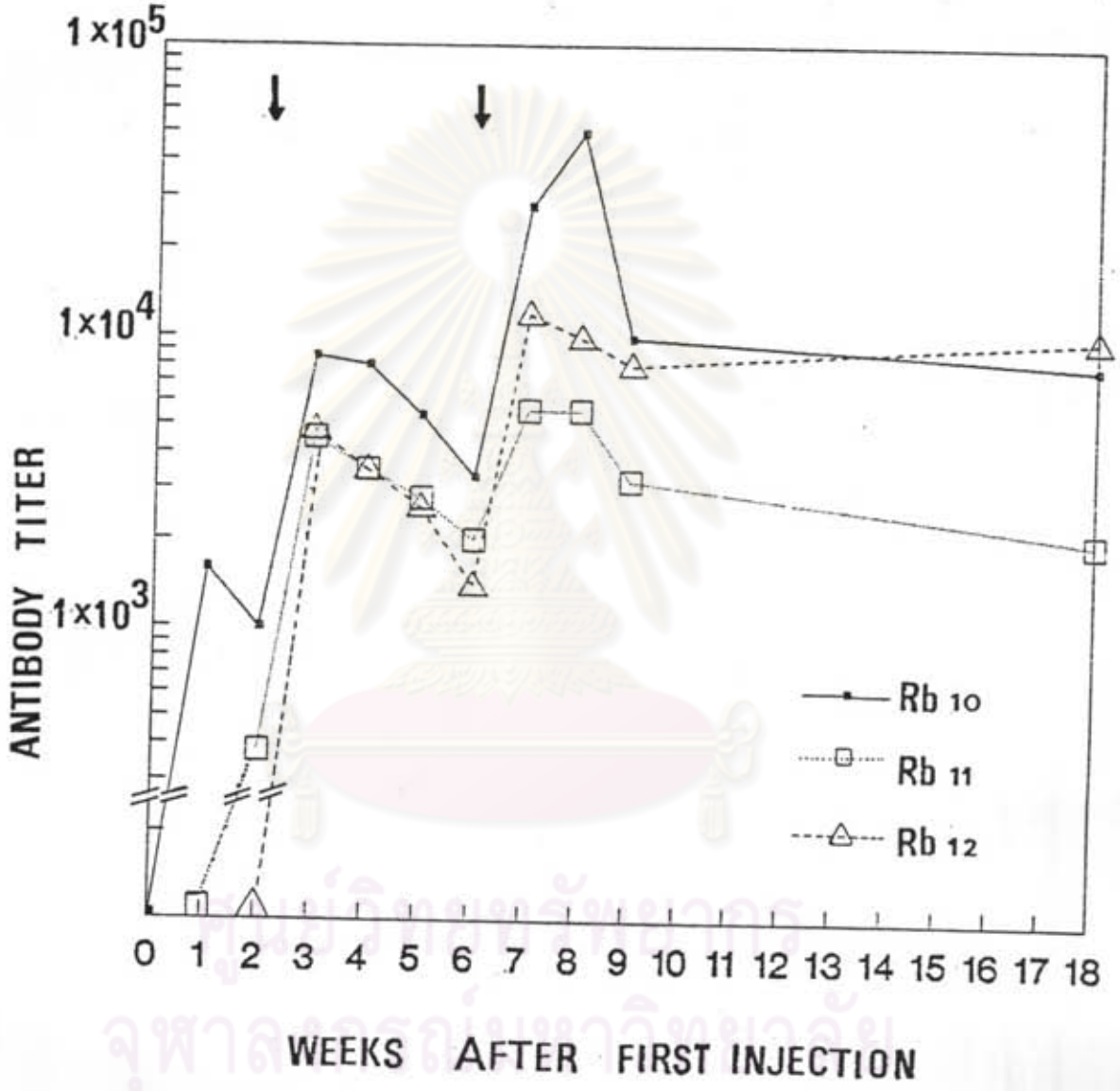
รูปที่ 14 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 4 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์

เครื่องหมาย ↓ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยพิษงูปริมาณเท่าเดิม

การฉีดกระต่ายในแต่ละครั้ง ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ ซึ่งมีปริมาณพิษงู 325 ไมโครกรัมละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) 0.5 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าทางใต้ผิวหนังด้านหลัง 5 จุด จุดละประมาณ 0.1 มิลลิลิตร แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 นิ้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 4 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์



ตารางที่ 2 ค่าไตเตอร์สูงสุดของแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าที่อยู่ในรูปต่าง ๆ

การเตรียมพิษงูเห่า	ค่าไตเตอร์สูงสุด
พิษงูเห่าอิสระ (lyophilized crude venom)	1.7×10^4
พิษงูเห่า/ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (id)	5.0×10^4
พิษงูเห่า/ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (iv)	2.1×10^5
พิษงูเห่า/ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์	8.0×10^4
พิษงูเห่า/แอดจูแวนท์	4.0×10^5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลการหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า

4.4.1 วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน

ได้ทำการทดลองอิมมูโนดิฟฟิวชันตามวิธีในข้อ 3.8.1 เพื่อดูความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่ได้จากการกระตุ้นกระต่ายด้วยการฉีดพิษงูเห่าในรูปต่างๆ พิษงูที่ใช้ทดสอบได้แก่พิษงูเห่า งูสามเหลี่ยม งูจงอาง งูแมวเซา และงูเขียวหางไหม้ ผลการทดลองพบว่า เฉพาะพิษงูเห่าเท่านั้นที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่นำมาทดสอบ คือจะปรากฏเป็นเส้นตะกอนสีขาว (precipitin line) ชัดเจนเกิดขึ้น และมีเส้นจาง ๆ มากกว่า 1 เส้น ส่วนพิษงูชนิดอื่น คืองูสามเหลี่ยม งูจงอาง งูแมวเซา และงูเขียวหางไหม้ ไม่พบว่ามีการทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross - reaction) กับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่นำมาทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 15

4.4.2 วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ELISA)

ได้ทดลองหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าโดยวิธี ELISA (ตามวิธีข้อ 3.7.1) โดยเคลือบอิไลซาเพลทด้วยพิษงูชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบคือพิษงูเห่า งูจงอาง งูสามเหลี่ยม งูแมวเซา งูกะปะ และงูเขียวหางไหม้ แล้วเติมแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่ได้จากการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแต่ละวิธี จากการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง (A_{405}) ที่ได้ระหว่างการใช้พิษงูชนิดต่างๆ เคลือบเพลทกับการใช้พิษงูเห่าเคลือบเพลท พบว่าแอนติเซรุ่มที่ได้มีความจำเพาะสูงคือทำปฏิกิริยาเฉพาะกับพิษงูเห่าเท่านั้น โดยไม่ทำปฏิกิริยากับพิษงูชนิดอื่นเลย ซึ่งจะเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ ดังแสดงในตารางที่ 3

4.5 ผลการทดสอบนิวทรัลไลเซชันของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า

จากการทดลองทำนิวทรัลไลเซชันตามวิธีในข้อ 3.7.2 และใช้วิธีคำนวณดังตัวอย่างในภาคผนวกข้อ 4) โดยใช้แอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่มีไตเตอร์สูงที่สุดของแต่ละวิธีที่ใช้ในการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างขึ้น พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระต่ายด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (ทางเส้นเลือดดำ) มีความสามารถในการทำลายพิษงูเห่าได้สูงที่สุดคือ 14.3 เท่าของ LD_{50} (LD_{50} ของพิษงูเห่าเท่ากับ 5.6 ไมโครกรัม/หนู (mice)) รองลงมาเป็นแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระต่ายด้วยพิษงูเห่าผสมแอดจูแวนท์คือได้ 10.7เท่าของ LD_{50} ส่วนแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระต่ายด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ และชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์

(ทางใต้ผิวหนัง) ได้ค่าพอ ๆ กันคือ 7.1 เท่าของ LD_{50} ส่วนแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระต่ายด้วยพิษงูเห่าผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ให้ค่าต่ำสุดคือ 3.6 เท่าของ LD_{50} ดังแสดงในตารางที่ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน

หลุมกลาง เพลทที่ 1 เป็นแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ทางเส้นเลือดดำที่หู

หลุมกลาง เพลทที่ 2 เป็นแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ทางใต้ผิวหนัง

หลุมกลาง เพลทที่ 3 เป็นแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์

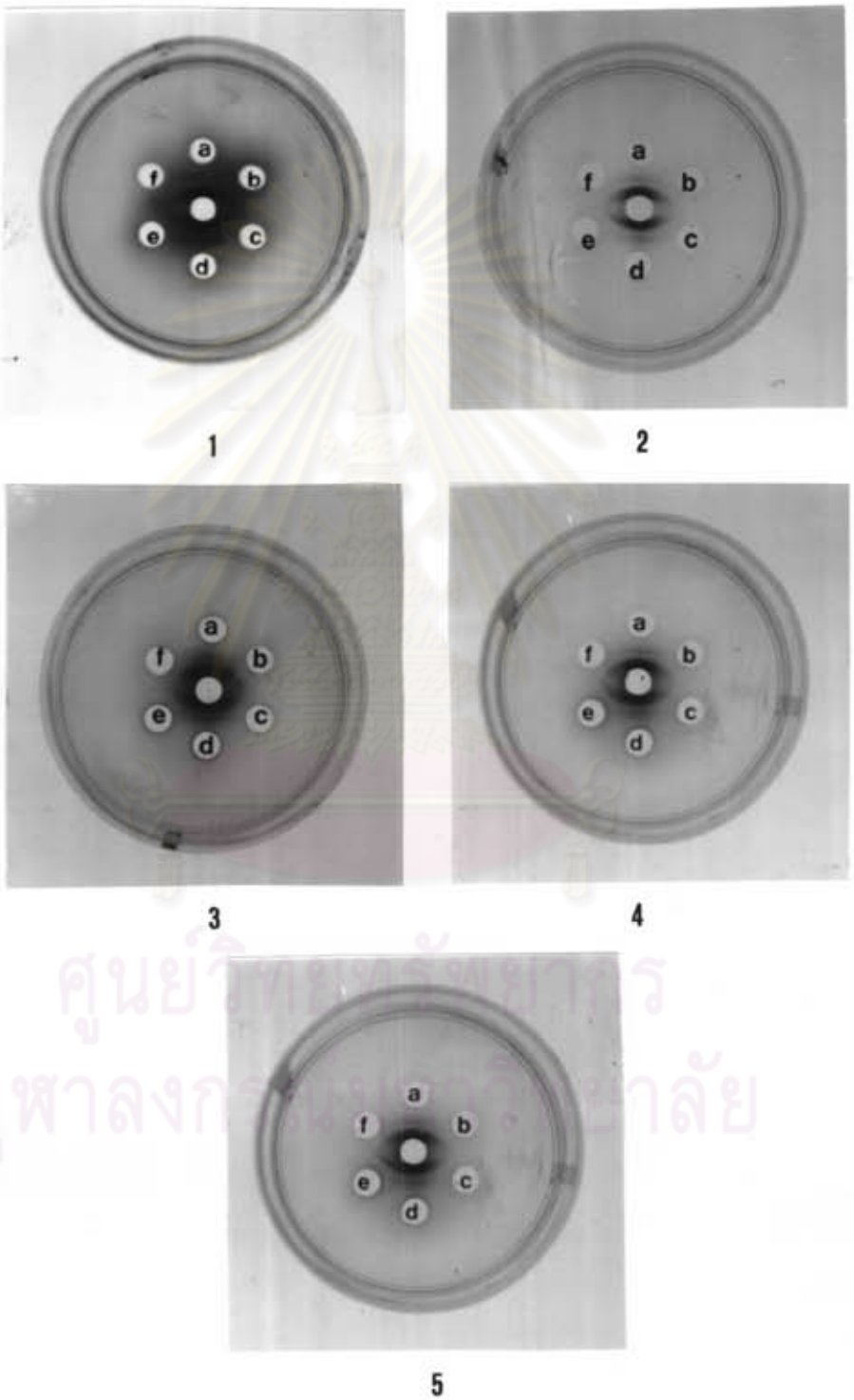
หลุมกลาง เพลทที่ 4 เป็นแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดด้วยพิษงูเห่าละลายในโซเดียมคลอไรด์

หลุมกลาง เพลทที่ 5 เป็นแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดด้วยพิษงูเห่าผสมแอดจูแวนท์

หลุมข้าง a = พิษงูเห่า, b = พิษงูจงอาง, c = พิษงูสามเหลี่ยม
d = พิษงูเห่า, e = พิษงูแมวเซา, f= พิษงูเขียวหางไหม้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน



ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์

แอนติบอดีที่ได้จากการฉีดด้วยพิษงูเห่าในรูปต่าง ๆ	A_{405}ที่วัดได้จากพิษงูที่เคลือบเพลท					
	พิษงูเห่า	พิษงูจงอาง	พิษงูสามเหลี่ยม	พิษงูแมวเซา	พิษงูกะปะ	พิษงูเขียวหางไหม้
พิษงูเห่าผสมแอดจูแวนท์	1.17	0	0	0	0	0
ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์(iv)	1.18	0	0	0	0	0
ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์(id)	1.20	0	0	0	0	0
ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์	1.05	0	0	0	0	0
พิษงูเห่าผสมสารละลายโซเดียมคลอไรด์	1.00	0	0	0	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่าของแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ

แอนติบอดีที่ได้จากการฉีดด้วยพิษงูเห่าในรูปต่าง ๆ	ความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่า (จำนวนเท่าของ LD_{50})
ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (iv)	14.3
ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (id)	7.1
ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์	7.1
พิษงูเห่าอิสระ (lyophilized crude venom)	3.6
พิษงูผสมแอดจูแวนท์	10.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ผลการพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์สำหรับหาปริมาณพิษงู ในเซรุ่มกระต่าย

ในการพัฒนาวิธี ELISA สำหรับหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย ได้เตรียม IgG ที่ใช้เคลือบเพลท และ IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ขึ้นมาเอง โดยนำอิมมูโนเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.1.1 ไปฉีดกระต่ายตามวิธีข้อ 3.9.1.2 (รูปที่ 16) พบว่ากระต่าย Rb 14 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ประมาณ 4 สัปดาห์ คือมีไตเตอร์ $4x10^5$ จึงได้ทำการเจาะเลือดประมาณ 20 มิลลิลิตร นำมาแยกเซรุ่มเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แบ่งส่วนหนึ่ง (4 มิลลิลิตร) มาแยก IgG ตามวิธีข้อ 3.9.2 ผลการแยก IgG ได้แสดงในรูปที่ 17 IgG ที่ได้ส่วนหนึ่งจะใช้สำหรับเคลือบเพลท อีกส่วนหนึ่งจะนำไปคอนจูเกตกับอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสตามวิธีข้อ 3.9.3

4.6.1 ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG ที่ใช้เคลือบเพลท และของคอนจูเกต

ในการใช้วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ข้อ 3.9.4)สำหรับการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย จำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของIgG ที่ใช้เคลือบเพลทและของคอนจูเกต จึงได้ทดลองใช้ความเข้มข้นของ IgG ตั้งแต่ 1.25,2.5,5,10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการเคลือบเพลท และใช้คอนจูเกตที่เจือจางในอัตราส่วน 1:100,1:200 และ 1:400 พบว่าค่าการดูดกลืนแสง (A_{405}) จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ IgG และของคอนจูเกต (รูปที่ 18) จากผลการทดลองความเข้มข้นของIgG ที่เหมาะสมที่ใช้เคลือบเพลทคือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอนจูเกตคือคอนจูเกตที่เจือจางในอัตราส่วน 1:200 ซึ่งที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงพอสำหรับวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ จึงใช้ความเข้มข้นนี้สำหรับการทดลองต่อ ๆ ไป

4.6.2 ผลการหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบเพลทด้วย IgG

ได้ทดลองใช้เวลาต่าง ๆ กัน ในการเคลือบเพลทในวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ข้อ 3.9.4) คือ 18 ชั่วโมง 24ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการเคลือบเพลท (รูปที่ 19) ในการทดลองต่อ ๆไปจะเลือกใช้เวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงพอสมควร

4.6.3 ผลการหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการอินคิวเบตพิษงูเห่ากับ IgG

จากการใช้เวลาและอุณหภูมิของการอินคิวเบตพิษงูเห่า ที่ละลายอยู่ในเซรุ่มกับ IgG ต่าง ๆ กัน คือเวลา2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส และ1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (ข้อ 3.9.4) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการอินคิวเบต (รูปที่ 20)พบว่าการใช้เวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องจะเหมาะสมสำหรับการทดลองมากกว่าเนื่องจากสะดวกสำหรับทำการทดลอง และให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงพอควรจึงเลือกใช้สภาวะนี้สำหรับการทดลองต่อๆไป

4.6.4 ผลการหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกตกับพิษงูเห่า

เมื่อทดลองใช้เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันสำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกตกับพิษงูเห่าคือ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส และ 1ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (ข้อ 3.9.4) พบว่าค่าการดูดกลืนแสง (A_{405}) จะเพิ่มขึ้นตามเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการอินคิวเบต (รูปที่ 21) พบว่าการใช้เวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องจะสะดวกและเหมาะสมกว่าช่วงเวลาอื่นเพราะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงพอควรและประหยัดเวลาด้วย ดังนั้นจึงเลือกสภาวะนี้สำหรับการทดลองต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

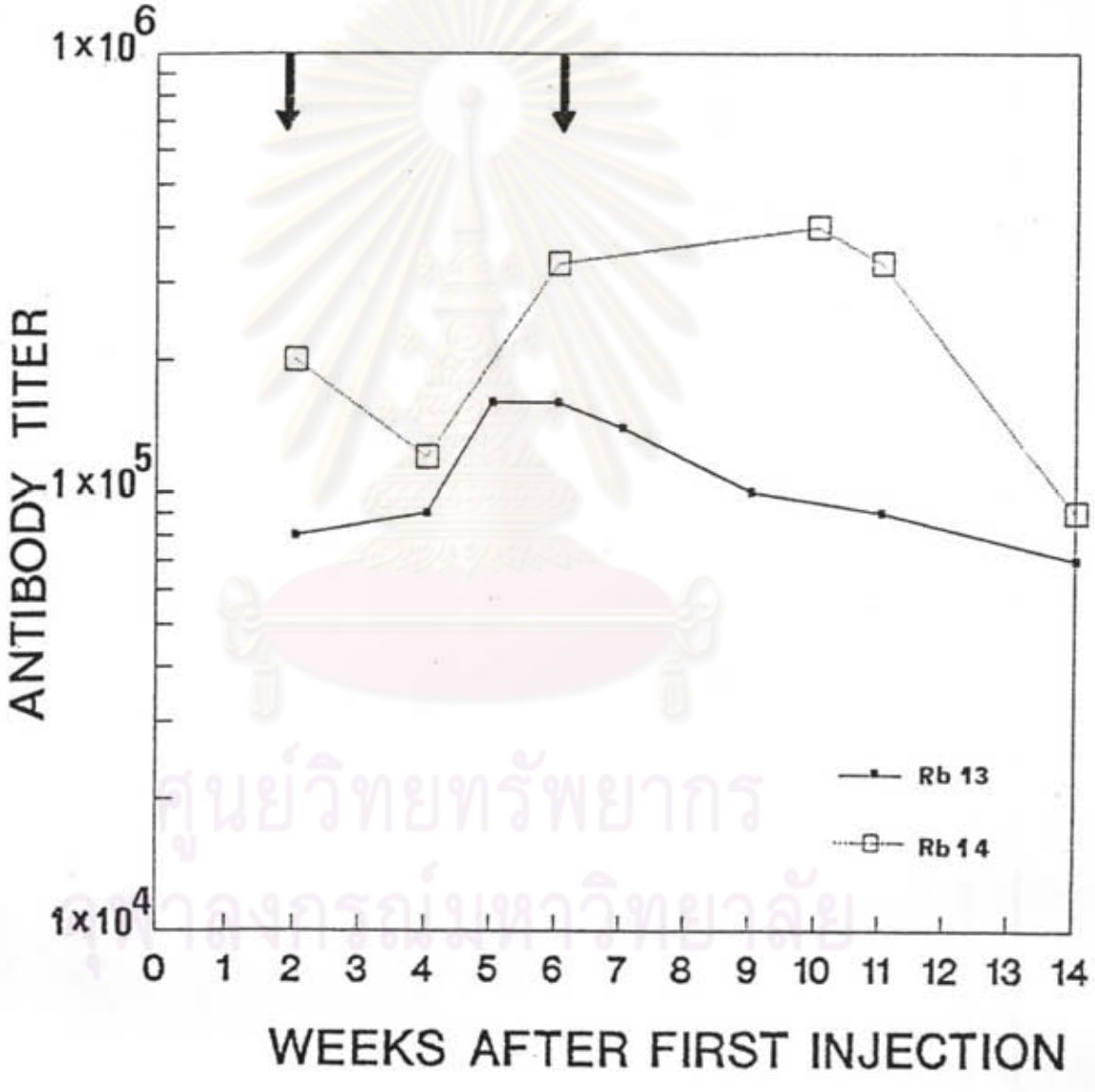
รูปที่ 16 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายสร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าผสมแอดจูแวนท์

เครื่องหมาย ↓ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยพิษงูปริมาณเท่าเดิม

การฉีดกระต่ายในแต่ละครั้ง ฉีดด้วยพิษงูเห่าผสมแอดจูแวนท์ ซึ่งมีปริมาณพิษงู 325 ไมโครกรัม โดยฉีดเข้าทางใต้ผิวหนังด้านหลังจุดละประมาณ 0.1 มิลลิลิตร แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 นิ้ว

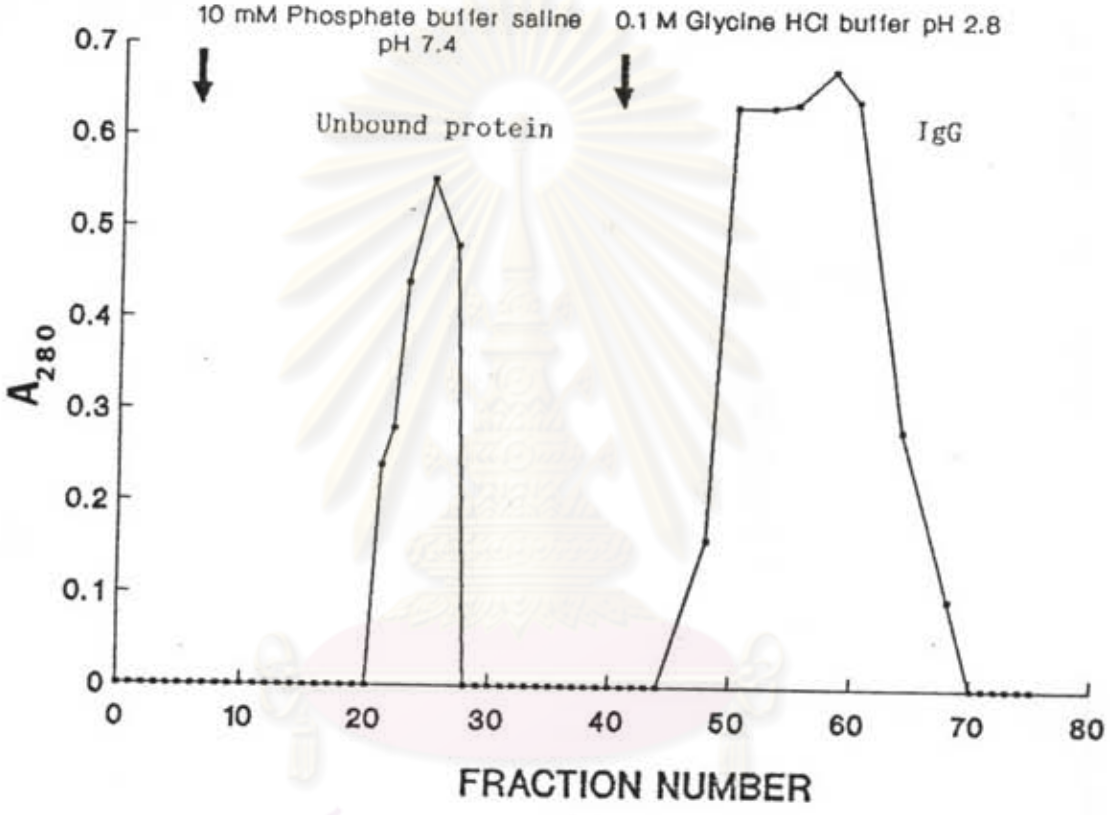
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายสร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าผสมแอดจูแวนท์



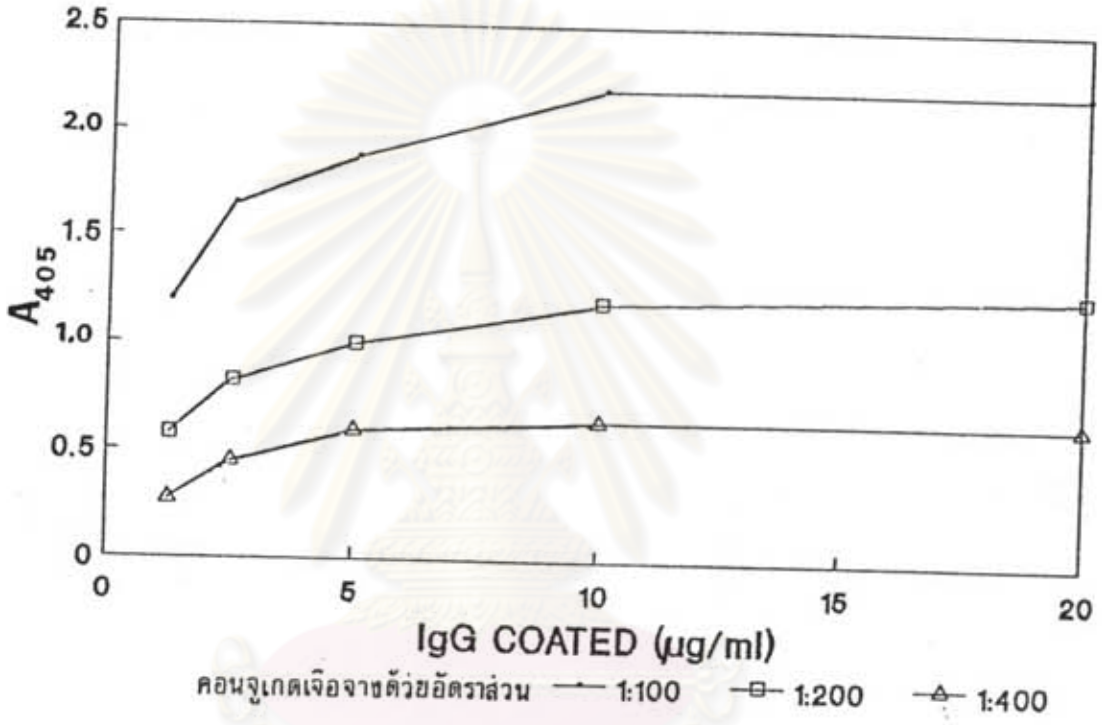
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17 การแยก IgG โดยโปรตีนเอ เซฟฟาโรสซีแอล - 4 บีคอลัมน์



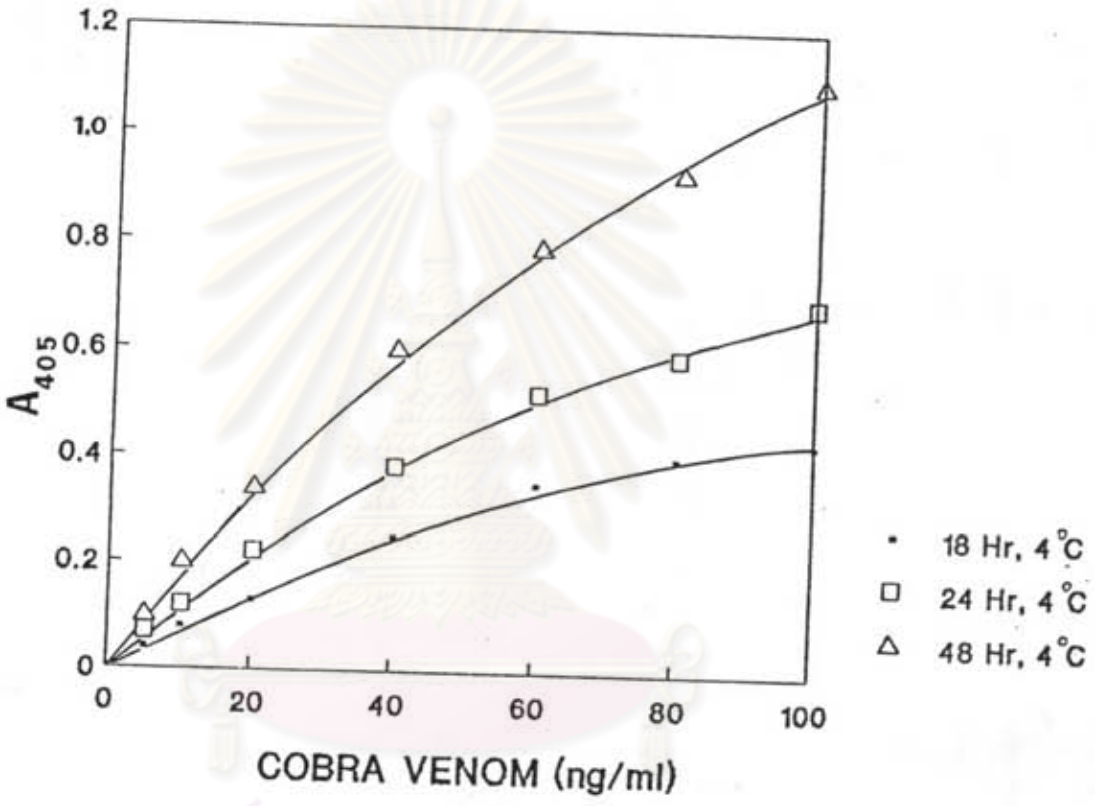
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 ผลของความเข้มข้นของ IgG ที่ใช้เคลือบเพลทและของคอนจูเกต



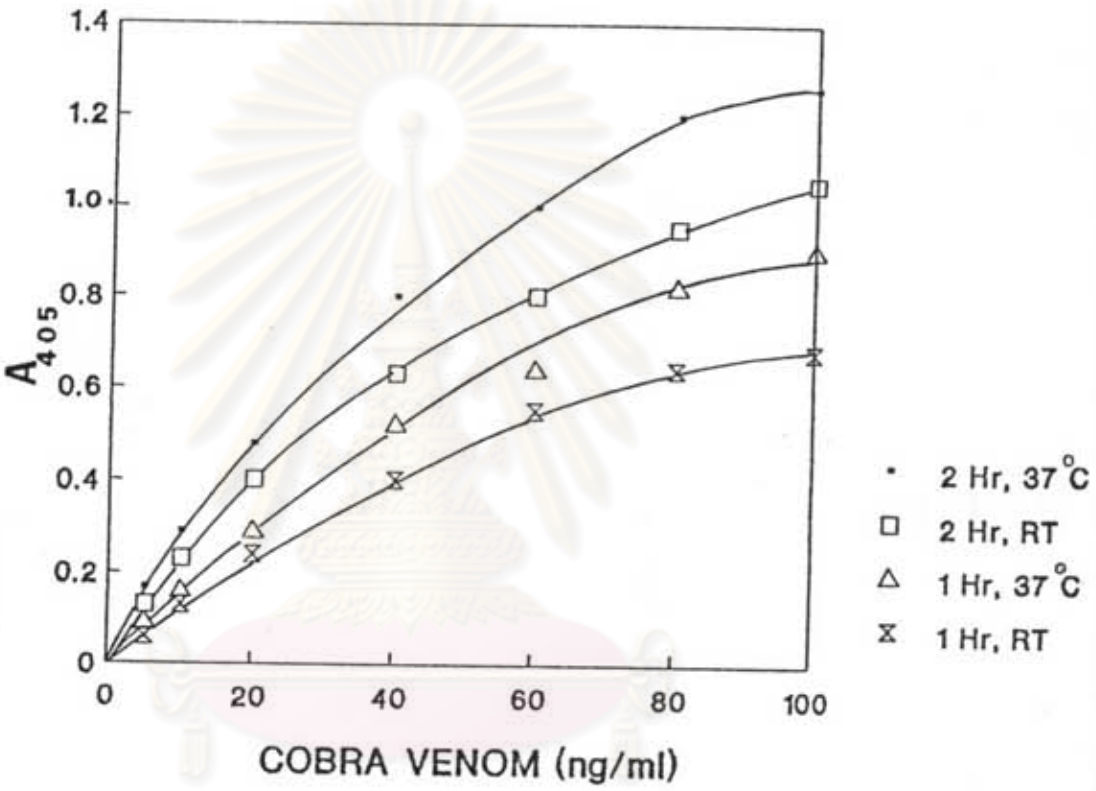
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19 ผลของระยะเวลาที่ใช้เคลือบเพลทด้วย IgG



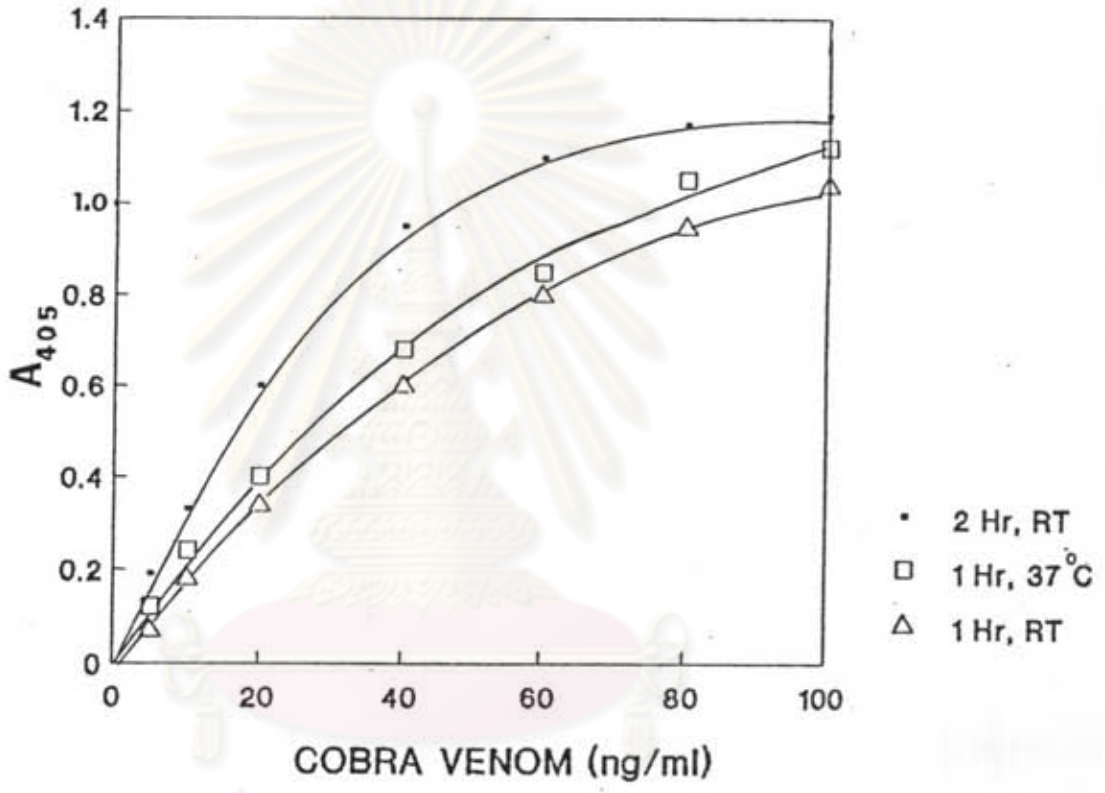
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการอิ่มตัวเบคพิษงูเห่ากับ IgG



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกตกับพิษงูเห่า



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 ผลการศึกษาความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์

4.7.1 ความไวของวิธีวัด

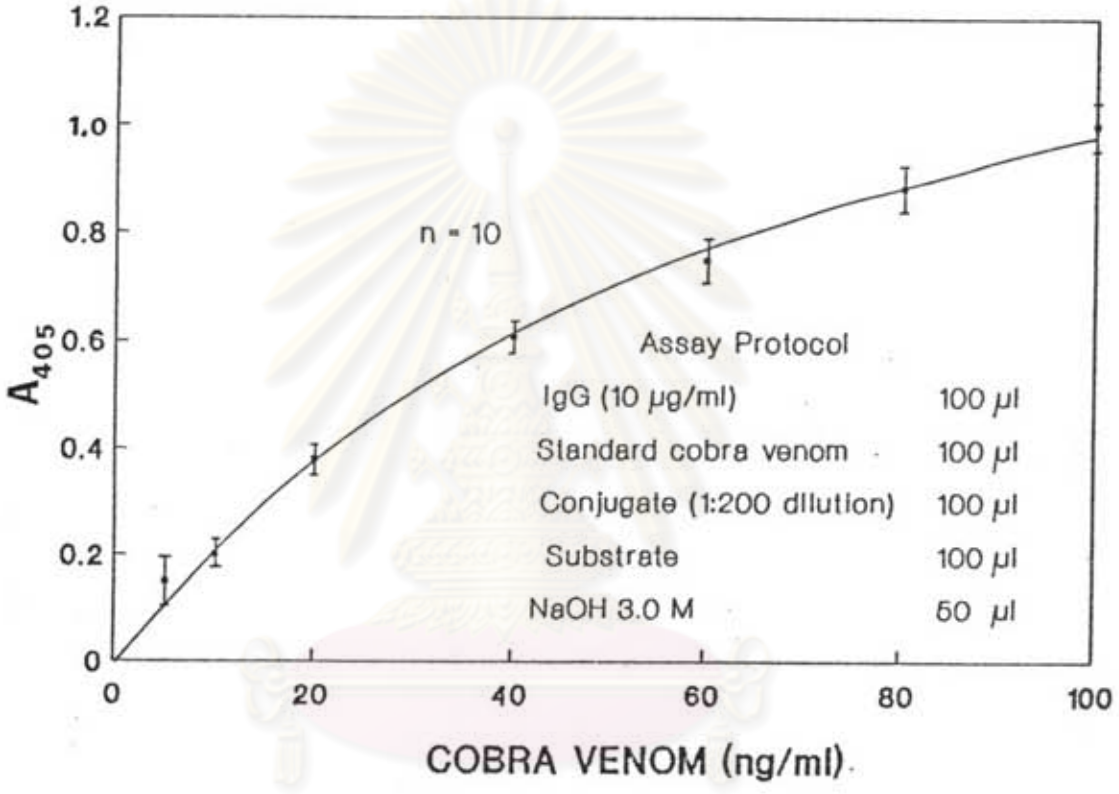
ความไวของวิธีวัด หมายถึง ปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง (Midgley,1969) ได้ทดสอบความไวของวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ โดยสร้างกราฟมาตรฐานของพิษงูเห่าที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันระหว่าง 1-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีข้อ 3.1.2 โดยทำการทดลองเดียวกันความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และทำเทียบกับคอนโทรลเซรุ่ม (preimmunized serum) ความเข้มข้นของพิษงูเห่าที่ได้ค่าการดูดกลืนแสง (A_{405}) สูงกว่าคอนโทรล 0.1 จะเท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งถือว่าเป็นความไวของวิธีวัด ดังแสดงในรูปที่ 23

4.7.2 ความแม่นยำของวิธีวัด

ความแม่นยำของวิธีวัดแสดงถึงความสามารถในการวัดปริมาณสาร ในตัวอย่างเดียวกันในการทดลองแต่ละครั้งว่าได้ค่าใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยมากน้อยเพียงใด ซึ่งสามารถหาความแม่นยำของวิธีวัดได้จากการคำนวณหาร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% cv) ที่ได้จากการวัดปริมาณสารซ้ำ ๆ กันในตัวอย่างเดียวกัน

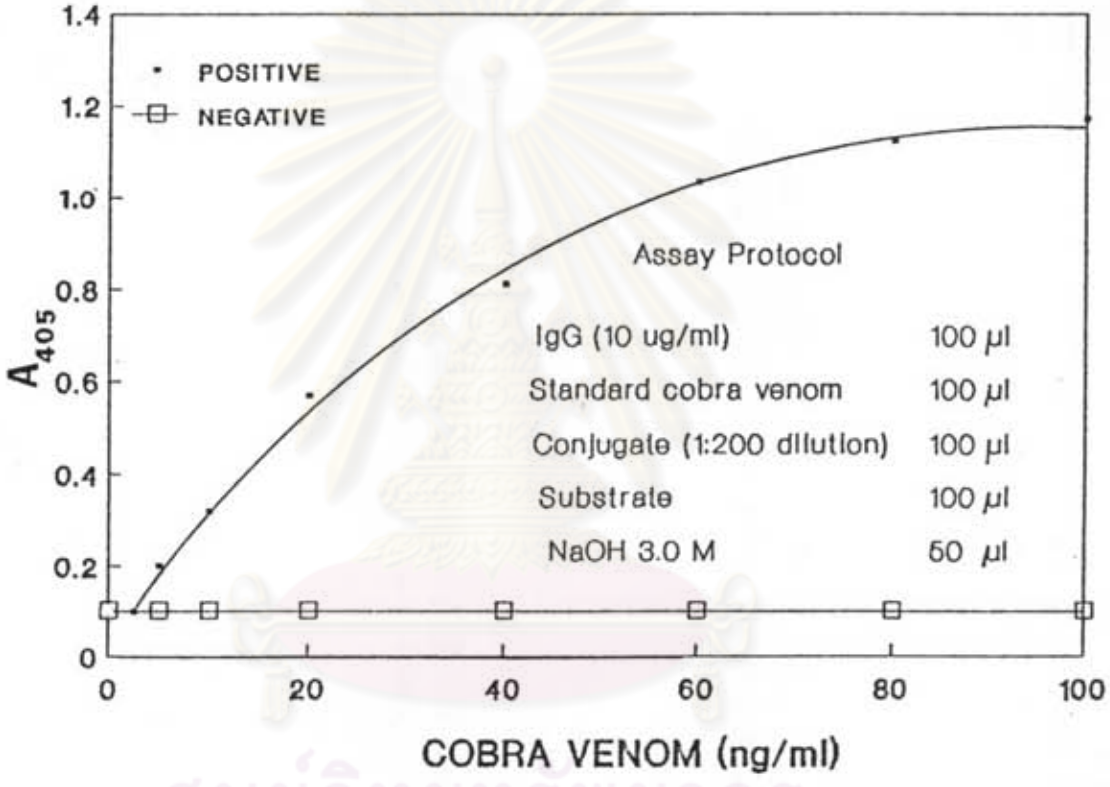
จากการวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายตามวิธีข้อ 3.9.4รวม 3 ตัวอย่าง คือที่มีความเข้มข้นของพิษงูเห่าต่ำ กลาง และสูง โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 10 ซ้ำ ภายในการทดลองเดียวกัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 3.3 ,6.1 และ 7.7 ที่ความเข้มข้นของพิษงูเห่า 25.4,40.7 และ 65.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเซรุ่มตามลำดับ แต่ถ้าวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่ม 3 ตัวอย่างดังกล่าวโดยทำการทดลองตัวอย่างละ 10 ซ้ำแต่ทำต่างการทดลองและต่างวันกัน พบว่าได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 6.3,8.3 และ 7.6 ที่ความเข้มข้นของพิษงูเห่า 20.8,38.3 และ 62.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเซรุ่มตามลำดับ

รูปที่ 22 กราฟมาตรฐานของพิษงูเห่า



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 การหาความไวของการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ความแม่นยำของการวัดปริมาณพิษงูในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์

Assay Variance	Venom concentration (ng/ml serum)		
	Low	Medium	High
Intra assay			
n	10	10	10
$\bar{x}$	25.4	40.7	65.9
SD	0.8	2.5	5.1
%cv	3.3	6.1	7.7
Inter assay			
n	10	10	10
$\bar{x}$	20.8	38.3	62.2
SD	1.3	3.2	4.7
%cv	6.3	8.3	7.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.3 ความถูกต้องของวิธีวัด

ความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย ซึ่งดูจากค่ารีคอบเวอรี (% Recovery)ของพิษงูเห่ามาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างเซรุ่ม (ข้อ 3.9.5.3) ได้ทดลองเติมพิษงูเห่า 15,30,45,60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเซรุ่มลงในเซรุ่มกระต่าย ซึ่งมีปริมาณพิษงูเห่าอยู่ 21 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าได้ค่ารีคอบเวอรีอยู่ระหว่าง 97.2 ถึง 104 เปอร์เซนต์ จะเห็นว่าปริมาณพิษงูเห่าที่เติมลงไปกับที่วัดได้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ซึ่งจากการวิเคราะห์โดยใช้รีเกรสชันเส้นตรงแบบธรรมดา (Simple linear regression analysis) ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เป็น 0.994

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ความถูกต้องของการวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์

Venom added (ng/ml serum)	Venom measured (ng/ml serum)	Recovery (%)(n=12)
0	21	-
15	35	97.2
30	53	104.0
45	69	104.0
60	80	98.8

มีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) = 0.994

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 ผลการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มของกระต่ายหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในรูปต่าง ๆ

เพื่อดูการปล่อยพิษงูเห่าออกจากไลโปโซมเข้าสู่กระแสโลหิตของกระต่าย หลังจากฉีดพิษงูเห่าซึ่งอยู่ภายในไลโปโซมให้กับกระต่าย จึงได้ทำการทดลองฉีดกระต่าย 3 กลุ่มดังนี้

4.8.1 ผลการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์

กระต่ายกลุ่มที่ 1 คือ Rb1,Rb2 และRb3 ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ ซึ่งมีปริมาณพิษงูเห่าอยู่ภายในไลโปโซม 500 ไมโครกรัมในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์)โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หู (ข้อ 3.6.2.1) หลังจากนั้นเจาะเลือดกระต่ายเพื่อนำไปหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ข้อ 3.9.4) โดยเจาะเลือดหลังจากฉีดพิษงูเห่า 10 นาที 1 วัน 3 วัน 1,2,3 และ 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายทั้ง 3 ตัวจะลดลงตามเวลาหลังจากฉีดพิษงูเห่าให้กับกระต่าย และจะตรวจไม่พบพิษงูเห่าหลังจากฉีด3 วัน (Rb1) หรือ 14 วัน (Rb2 และ Rb3) ดังแสดงในรูปที่ 24 ในกระต่าย Rb1 พบว่าหลังจากฉีด 10 นาที มีระดับพิษงูเห่าในเซรุ่ม 32 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเซรุ่มหลังจากฉีดครบ 1 วันจะลดลงเหลือ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อครบ 3 วันจะตรวจไม่พบพิษงูเห่าในเซรุ่ม ในกระต่าย Rb2 จะพบว่ามีระดับพิษงูเห่าในเซรุ่มขึ้นลงเล็กน้อยในตอนแรกคือมีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 10-20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเซรุ่ม หลังจาก 7 วันจึงลดลงอย่างชัดเจน และตรวจไม่พบเลยหลังจาก 2 สัปดาห์ไปแล้ว ส่วนกระต่าย Rb3 มีระดับพิษงูเห่าในเซรุ่มสูงสุดเมื่อเทียบกับ Rb1และ Rb2 หลังฉีด 10 นาที พบว่ามีความเข้มข้นถึง 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเซรุ่ม และระดับพิษงูเห่าจะลดลงเหลือ 16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรหลังฉีดครบ 1 วัน หลังจากนั้นจะคงที่จนครบ 1 สัปดาห์ และตรวจไม่พบพิษงูเห่าหลังฉีด 2 สัปดาห์เช่นเดียวกับ Rb2

4.8.2 ผลการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์

กระต่ายกลุ่มที่ 2 คือ Rb4,Rb5 และ Rb6 ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ ซึ่งมีปริมาณพิษงูเห่าอยู่ภายในไลโปโซม 500 ไมโครกรัมในปริมาตร0.5 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หู(ข้อ 3.6.2.1) หลังจากนั้นจึงเจาะเลือดกระต่ายเพื่อนำไปหาปริมาณพิษงูเห่าโดย

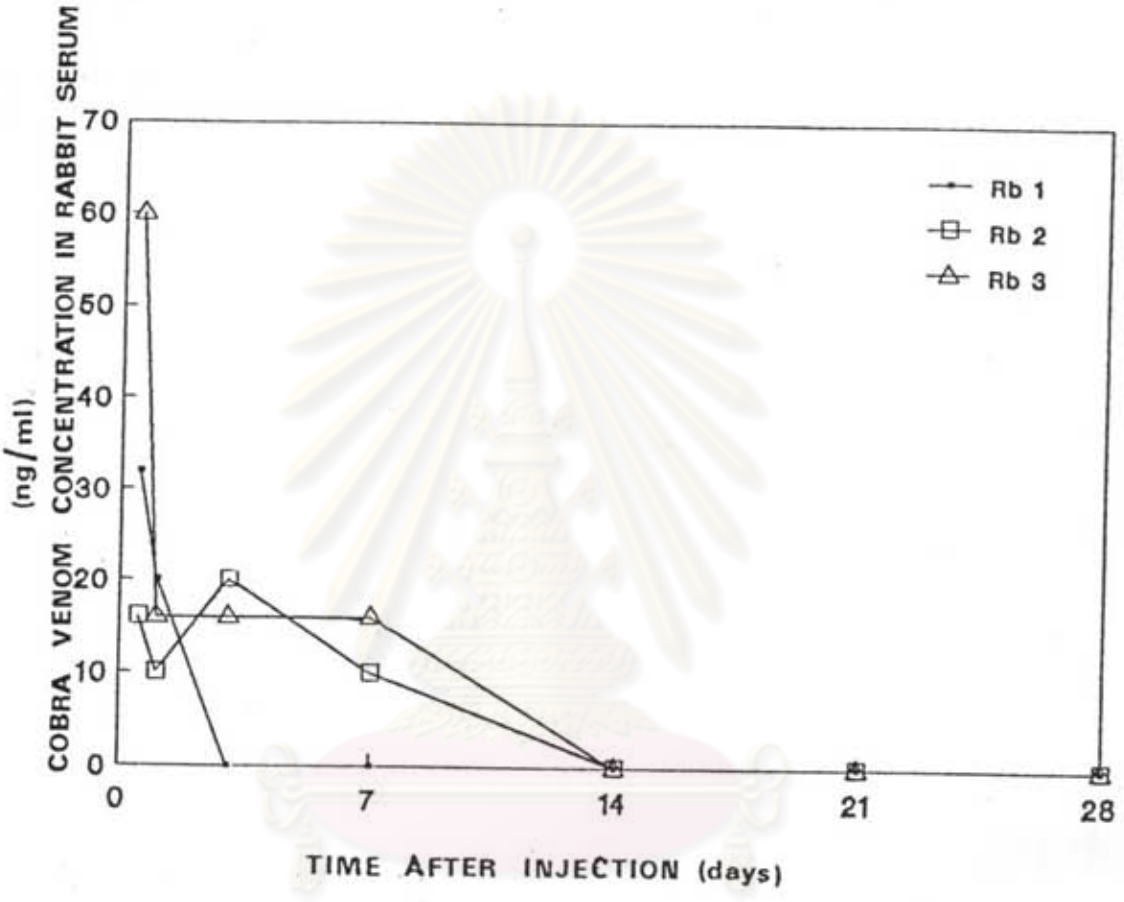
วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ข้อ 3.9.4) โดยเจาะเลือดหลังจากฉีดพิษงูเห่า 10 นาที 1 วัน 3 วัน 1,2,3 และ 4 สัปดาห์ พบว่าในกระต่าย Rb4 และ Rb5 มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มค่อนข้างมากในช่วงหลัง 1 สัปดาห์หลังฉีดพิษงูและหลังจากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลงอย่างช้า ๆ ส่วนกระต่าย Rb6 ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มมากนักในช่วงแรก ๆ หลังจาก 3 วันจึงเริ่มลดลง เป็นที่น่าสังเกตว่ายังคงพบปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มของกระต่ายทั้ง 3 ตัวนี้ตลอดการทดลอง 4 สัปดาห์หลังฉีดพิษงู ดังแสดงในรูปที่ 25 ซึ่งต่างจากกระต่ายในกลุ่มที่ 1

4.8.3 <u>ผลการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์)</u>

กระต่ายกลุ่มที่ 3 คือ Rb7,Rb8 และ Rb9 ฉีดด้วยพิษงูเห่า 20 ไมโครกรัม ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) 0.5 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าเส้นเลือดดำที่หู (ข้อ 3.6.2.1) หลังจากนั้นจึงเจาะเลือดไปหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มเช่นเดียวกับกระต่ายกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 26 จะเห็นว่าปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มของกระต่ายทั้ง 3 ตัวนี้จะลดลงอย่างชัดเจนในช่วง 3 วันแรก หลังฉีดพิษงู หลังจากนั้นจึงค่อยๆ ลดลงซึ่งในกระต่าย Rb7 จะลดลงจนตรวจไม่พบพิษงูเห่าภายใน 1 สัปดาห์เท่านั้น ส่วนกระต่าย Rb8 และRb9 จะลดลงช้ากว่าและตรวจไม่พบพิษงูเห่าหลังสัปดาห์ที่ 4

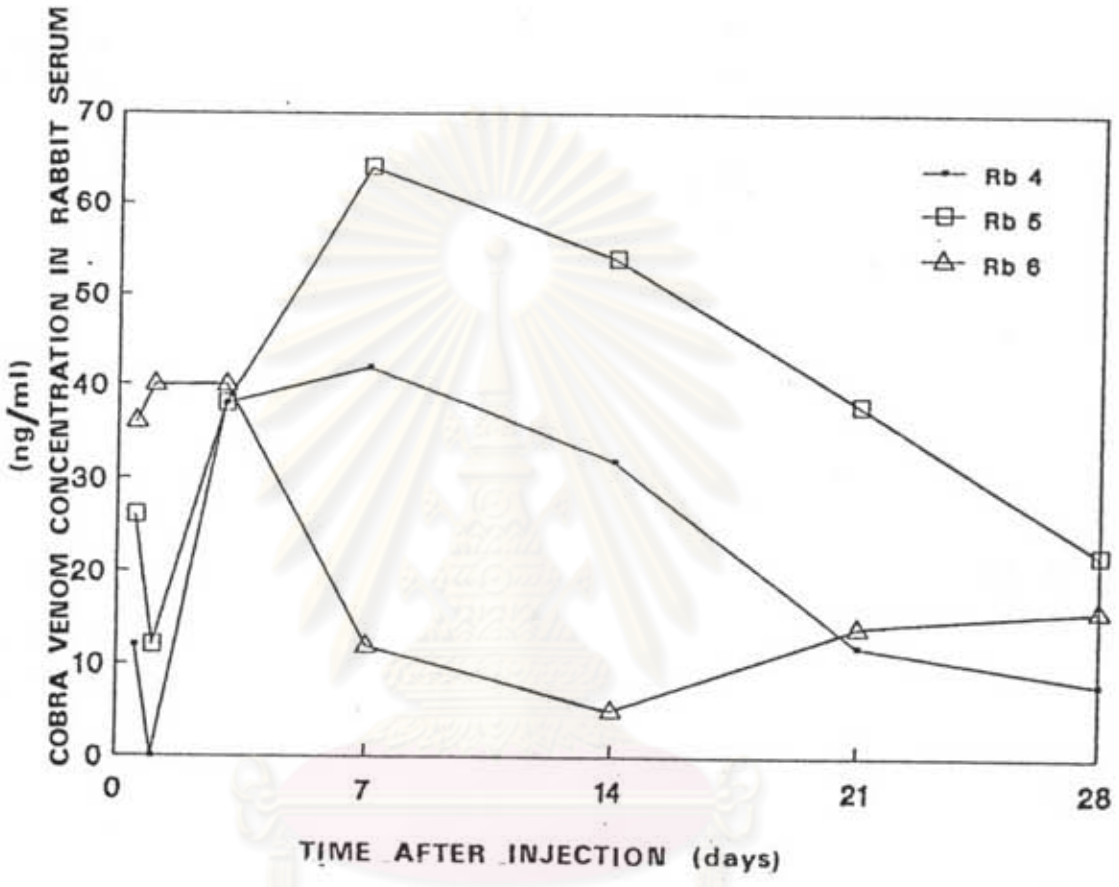
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 24 ปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายกลุ่มที่ 1 หลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซม ชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์



ฉีดกระต่าย Rb1 Rb2 และ Rb3 ด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซม ชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ ซึ่งมีปริมาณพิษงูเห่าอยู่ภายในไลโปโซม 500 ไมโครกรัม ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์)โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หู (ข้อ 3.6.2.1) หลังจากนั้นจึงเจาะเลือดกระต่ายเพื่อนำไปหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ข้อ 3.9.4) โดยเจาะเลือดหลังจากฉีดพิษงูเห่า 10 นาที 1 วัน 3 วัน 1,2,3 และ 4 สัปดาห์

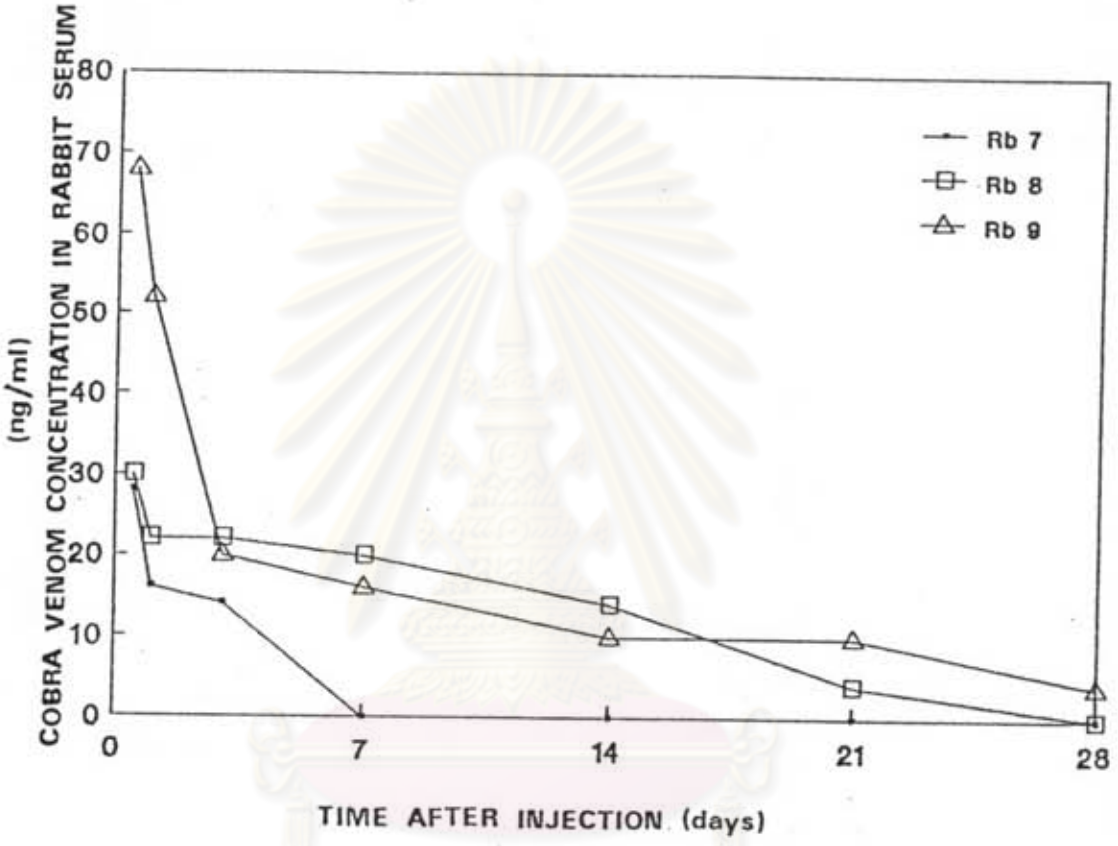
รูปที่ 25 ปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายกลุ่มที่ 2 หลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออลเมียมเทตรอกไซด์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฉีดกระต่าย Rb4 Rb5 และ Rb6 ด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออลเมียมเทตรอกไซด์ ซึ่งมีปริมาณพิษงูเห่าอยู่ภายในไลโปโซม 500 ไมโครกรัม ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หู (ข้อ 3.6.2.1) หลังจากนั้นจึงเจาะเลือดกระต่าย เพื่อนำไปหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่ม โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ข้อ 3.9.4) โดยเจาะเลือดหลังจากฉีดพิษงูเห่า 10 นาที 1 วัน 3 วัน 1,2,3 และ 4 สัปดาห์

รูปที่ 26 ปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายกลุ่มที่ 3 หลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าซึ่งละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์



ฉีดกระต่าย Rb7 Rb8 และ Rb9 ด้วยพิษงูเห่า 20 ไมโครกรัมซึ่งละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซนต์) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หู (ข้อ 3.6.2.1) หลังจากนั้นจึงเจาะเลือดกระต่าย เพื่อนำไปหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ข้อ 3.9.4) โดยเจาะเลือดหลังจากฉีดพิษงูเห่า 10 นาที 1 วัน 3 วัน 1,2,3 และ 4 สัปดาห์