บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การลดปริมาณของโปรตีนที่ไม่มีพิษ (non-toxic protein) ซึ่งปนอยู่ในพิษที่รีดจากงูเห่า

พิษงูเห่าที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นพิษงูเห่าไทย (Naja naja siamensis) จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ พิษงูนี้ได้มาโดยการรีดจากต่อมพิษในปากงูเห่า ดังนั้นจึงมีสารอื่น ๆ ซึ่งไม่ใช่สารพิษเช่น โปรตีนจากน้ำลายปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก รวมทั้งเอนไซม์ต่าง ๆ ด้วย การทดลองนี้มีจุดประสงค์ที่จะทดลองกับสารพิษ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องขจัดสารอื่นหรือโปรตีนที่ไม่ใช่สารพิษออกไปให้มากที่สุดที่จะทำได้โดยวิธีง่าย ๆ แต่มิได้มุ่งหวังที่จะทำให้ได้สารพิษที่บริสุทธิ์จริง ๆ เนื่องจากวิธีการทำให้บริสุทธิ์จริง ๆ นั้นเป็นวิธีการที่ยุ่งยากไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตซีรั่มแก้พิษงูปริมาณมาก ๆ เป็นประจำ

การขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูที่รีดมานั้น ผู้วิจัยได้ทดลองใช้หลายวิธีด้วยกันได้แก่วิธี dialyse ผ่าน dialysing membrane, วิธี heat แล้วตามด้วย ammonium sulfate fractionation วิธี ammonium sulfate fractionation โดยใช้ ammonium sulfate ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แต่พบว่าการขจัดโปรตีนที่ไม่เป็นพิษโดยการใช้ความร้อนและ buffer ที่เป็นกรดนั้นเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด

2. การขจัดโปรตีนส่วนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูเห่าโดยใช้ความร้อน

2.1. พิษงูเห่า

ใช้พิษงูเห่าไทย (Naja naja siamensis) จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ เป็นพิษงูเห่าหลาย ๆ ตัวรวมกัน แล้วนำมาทำให้แห้ง

ด้วยวิธี freeze drying ก่อนใช้นำไปบด (homogenized) ด้วยโกร่งบดยาที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้พิษงูแห้งที่เป็นเกล็ดขนาดต่าง ๆ ผสมปนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บไว้ในขวดที่ป้องกันความชื้นได้สำหรับใช้ในการทดลองนี้ตลอดไป

2. 2. buffer

ใช้ 0.9% sodium chloride in 0.005 M sodium acetate buffer pH 5.8 เป็น buffer สำหรับละลายพิษงู

2.3. การทดลอง

ชั่งพิษงูที่บด (homogenized) แล้วด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด แล้วละลายใน buffer ดังกล่าวข้างต้น ให้พิษงูมีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 4 อย่างคือ 1%, 1.5%, 2% และ 2.5% ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบดูว่าที่ความเข้มข้นใดจะสามารถใช้ความร้อนขจัดโปรตีน ออกได้มากที่สุดและไม่ทำให้สารพิษถูกขจัดออกไปด้วย ปรับอ่างน้ำร้อน (water bath) ให้มีอุณหภูมิคงที่คือ 80 องศาเซลเซียส นำพิษงูที่ละลายดีแล้วแต่ละความเข้มข้น แช่ลงในน้ำร้อนเป็นเวลา 20 นาที โดยกวนอยู่ตลอดเวลาที่แช่อ่างน้ำร้อน (ใช้ magnetic stirer) โปรตีนในพิษงูบางส่วนจะตกตะกอน ตั้งทิ้งไว้จนเย็น นำไปปั่นเพื่อแยกตะกอนออกโดยใช้ความเร็ว 6000 rpm 30 นาที ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใส (supernatant หรือสารละลายพิษงู) ออกจากตะกอน สารละลายพิษงูที่ได้หลัง heat เรียกว่า "heated toxin" นำสารพิษส่วนนี้ไปหาปริมาณโปรตีนที่เหลือ, หาค่า LD_{50} ในหนู (ปริมาณสารพิษที่ทำให้หนูตาย 50%) และนำไปทำให้เป็นโพลิเมอร์ของพิษงูต่อไป

3. การหาปริมาณของโปรตีนใน heated toxin

ใช้วิธีของ Lowrey (Lowrey, et al., 1951) ในการหาปริมาณโปรตีนใน heated toxin และในพิษงูเห่าที่ไม่ได้ heat โดยใช้ BSA-

(Bovine Serum Albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ใช้มีความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 10 ไมโครกรัม, 20 ไมโครกรัม, 40 ไมโครกรัม, 60 ไมโครกรัม และ 80 ไมโครกรัม และสารละลายพิษงูที่ใช้ก็ทำให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันด้วย หยด Lowrey reagent ลงในโปรตีนแต่ละหลอดตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาทีแล้วหยด Folin phenol reagent ลงไปตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัด Optical Density ที่ความยาวคลื่น 750 มิลลิไมครอน เปรียบเทียบค่า Optical Densityของสารละลายพิษงูกับ BSA มาตรฐาน โดยการ plot graph เปรียบเทียบแล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายพิษงูทั้งหมด

4.การหาความเป็นพิษ (toxicity) ของพิษงู

4.1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (Swiss mice) น้ำหนัก 20 - 25 กรัม ไม่จำกัดเพศเลี้ยงด้วยอาหารหนู (mouse pellets) ของบริษัท เอฟ อี ซิลลิก(กรุงเทพฯ) จำกัดตลอดการทดลอง

4.2. วิธีทดลอง

นำพิษงูที่ต้องการหาความเป็นพิษมาทำให้มีความข้มข้นต่าง ๆ กัน 5 อย่างโดยใช้ 2 - fold dilution นำพิษงูที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันไปฉีดเข้าในหนูขาว (Swiss mice) โดยแต่ละความเข้มข้นจะฉีดหนู 5 ตัว และฉีดตัวละ 0.1 มิลลิลิตร เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) แล้วดูจำนวนหนูที่ตายและอยู่รอดภายใน 24 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปคำนวณหา LD_{50} (ปริมาณสารพิษที่ทำให้หนูตาย 50 เปอร์เซนต์) โดยใช้วิธีของ Reed & Muench (1938)

5.การทำให้โมเลกุลของพิษอยู่ในรูปของโพลิเมอร์

5.1. สารเคมี

ใช้ glutaraldehyde เป็นตัวทำให้เกิดโพลิเมอร์ glutaraldehyde

ที่ใช้เป็น 25% pure glutaraldehyde ของบริษัท Electron Microscopy Science (EMS) Fort Washington, PA. 19034 เวลาใช้นำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 2.5 เปอร์เซนต์

5 2. วิธีทดลอง

Avrameas, 1969 ได้ใช้ Glutaraldehyde เป็นตัวเชื่อมระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับเอนไซม์หรือระหว่างโปรตีนกับโปรตีนหลายชนิด ผู้วิจัยได้ทดลองนำวิธีของท่านผู้นี้มาใช้แต่ได้เปลี่ยนแปลงวิธีทำไปบ้าง เนื่องจากโปรตีนที่ใช้เป็นคนละชนิดกันและเพื่อความเหมาะสมสำหรับโปรตีนในพิษงูด้วย การทำโพลิเมอร์ของพิษงูเห่านี้มีขั้นตอนในการทำดังนี้

5.2.1 . การทำให้ heated toxin อยู่ในรูปของโพลิเมอร์ ใช้ heated toxin ที่ทราบปริมาณโปรตีนแน่นอนแล้ว นำมาปรับให้มี pH ใกล้เคียงกับ isoelectric pH ของ neurotoxin โดยใช้ pH 9.25 (Devi, 1968) ด้วย 0.1 N. NaOH แล้วค่อย ๆ หยด 2.5% glutaraldehyde ลงไปทีละหยดพร้อมกับคนตลอดเวลาด้วย magnetic stirer การหยด glutaraldehyde แบ่งออกเป็น 2 ตอนคือ หยด 2.5% glutaraldehyde ลงไปปริมาตรที่หยดกิกเป็นปริมาณglutaraldehyde ร้อยละ 30 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที จะมีตะกอนสีส้มเกิดขึ้น แยกตะกอนกับ supernatant ออกจากกัน แล้วหยด 2.5% glutaraldehyde ลงไปใน supernatant อีกเพื่อให้โปรตีนที่อาจยังเหลืออยู่ตกตะกอนอีกให้หมด แล้วจึงนำไป dialyse เพื่อแยกเอา glutaraldehyde ที่เหลือออกโดยใช้ 0.85% sodium chloride (physiological saline) นำตะกอนทั้ง 2 ครั้งรวมกันเพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อไป

ในการ dialyse เพื่อแยก glutaraldehyde ส่วนเกินออกจากพิษงูที่เป็นโพลิเมอร์แล้วนั้น ใช้ถุงสำหรับ dialyse ใส่พิษงูที่มี glutaraldehyde ปนอยู่ แล้วแช่ลงใน sterile 0.85% sodium chloride ตั้งไว้ค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน sterile 0.85% sodium chloride 4 - 5

ครั้ง นำพิษงูออกจากถุงสำหรับ dialyse วัดปริมาตรที่แน่นอนของน้ำและตะกอนในถุง dialyse ไว้ แบ่งส่วนที่เป็นน้ำไปทดสอบความเป็นพิษ โดยฉีดเข้าไปในหนูขาว (Swiss mice) 3 ตัว ๆ ละ 1 มิลลิลิตร เข้าทางช่องท้อง (intra-peritoneal) ปริมาตรที่ฉีดนี้เป็นปริมาตรที่มากกว่าที่จะใช้ immunized หนูมาก ถ้าหนูไม่ตายแสดงว่าไม่มีความเป็นพิษเหลืออยู่ ต่อจากนั้นนำพิษงูที่เป็นโพลิ-เมอร์นี้ไปทดสอบหาคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน

5.2.2 การทำพิษงูเห่าที่ได้ตามธรรมชาติ (unheated toxin หรือ natural toxin) ให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์ ใช้วิธีเดียวกับ heated toxin ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 5.2.1

6. การหาคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของโพลิเมอร์พิษงู

6.1. การฉีดเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันในหนู

6.1.1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนู (Wistar Strain Rat) น้ำหนักประมาณ 180 กรัมไม่จำกัดเพศ เลี้ยงด้วยอาหารหนู (mouse pellets) ของบริษัทเอฟ อี ซิลลิก (กรุงเทพฯ) จำกัด ตลอดการทดลอง

6.1.2. วิธีทดลอง

หลังจาก dialyse เอา glutaraldehyde ส่วนเกินออก และทดสอบความเป็นพิษของส่วนที่เป็นน้ำของโพลิเมอร์แล้ว นำโพลิเมอร์จาก heated toxin และ unheated toxin ซึ่งเป็นตะกอนสีส้มมาทำให้ตะกอนซึ่งจับกันอยู่แตกออกจากกันโดยใช้กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยาหมายเลข 21 ฉีดตะกอนที่ละลายปนกับน้ำเข้าในหนูครั้งละ 2 - 3 มิลลิกรัม ปริมาตรที่ฉีด 0.5 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ที่ขาซ้ายและขาขวาสลับกันในแต่ละครั้งด้วยเข็มฉีดยาหมายเลข 21 หนูที่ฉีดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ใช้หนู 7 ตัว ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของพิษงูที่แยกเอาโปรตีนที่ไม่มีพิษบางส่วนออกไปแล้ว (โพลิเมอร์ของ heated toxin)

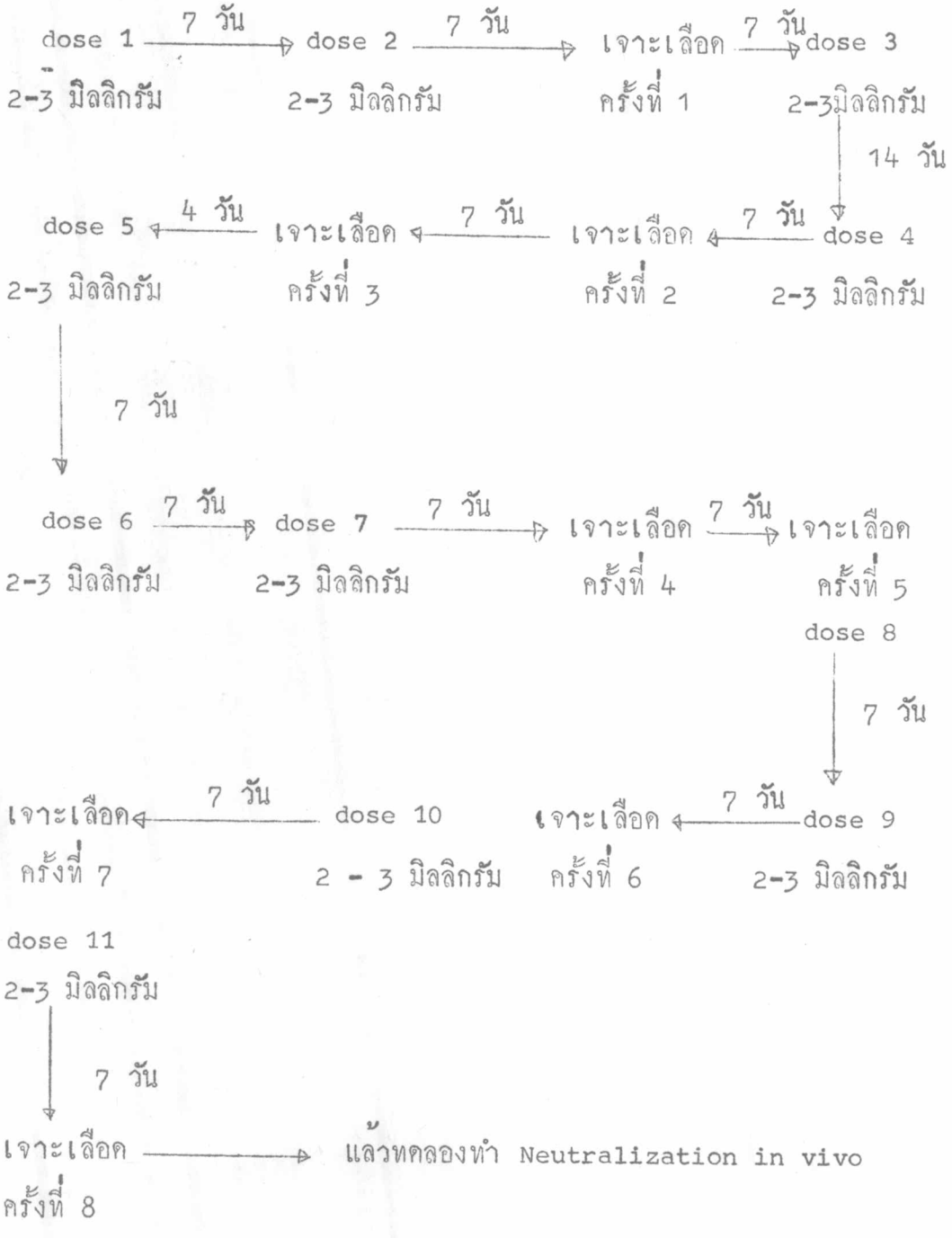
กลุ่มที่ 2 ใช้หนู 7 ตัว ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของพิษงูที่ได้ตามธรรมชาติ (unheated toxin)

กลุ่มที่ 3 ใช้หนู 5 ตัว ฉีดด้วยพิษงูที่มิได้ทำให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์ (Unpolymerized toxin) และมิได้แยกเอาโปรตีนส่วนใดออก

ช่วงระยะเวลาของการฉีดเพื่อให้เกิดความคุ้มกันในหนูทั้ง 3 กลุ่ม กำหนดเป็นระยะเวลาพร้อมกับการเจาะเลือดเพื่อนำมาใช้ทำปริมาณแอนติบอดี้ (ซึ่งจะกล่าวในข้อ 6.2) ดังแผนผังที่ 1 คือ

แผนผังที่ 1

แสดงการฉีดพิษงูและเจาะเลือดในหนู (Wistar Strain Rat)



6.2 การหาระดับของแอนติบอดี้ที่ถูกสร้างขึ้นในหนู

6.2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (Swiss mice) น้ำหนัก 20 - 25 กรัม ไม่จำกัดเพศเช่นเดียวกับที่ใช้ในการหาความเป็นพิษและเลี้ยงด้วยอาหารชนิดเดียวกัน

6.2.2 วิธีทดลอง

แบ่งออกเป็นขั้นต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

6.2.2.1 เจาะเลือดหนูที่ได้ immunize ไว้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 (กลุ่มที่ 3 ตายหมดตั้งแต่ฉีดด้วย dose ที่ 1) โดยเจาะกลุ่มละ 5 ตัวจากหนูทั้งหมด 7 ตัว ตามแผนผังที่แสดงไว้ในรูปที่ 1 ให้หนูดมยาสลบ(Diethyl ether) พอหมดความรู้สึกจึงนำมาเจาะเลือดโดยใช้หลอด Capillary ปลายตรงและคมเจาะตรงเส้นเลือดบริเวณหัวตา (Ophthalmic Venous Plexus) ใช้หลอดแก้ว centrifuge ที่อบฆ่าเชื้อแล้วรองรับเลือดที่ปลายหลอด Capillary อีกด้านหนึ่ง เก็บเลือดตัวละ 1 - 2 มิลลิลิตร ใส่รวมในหลอดเดียวกันทั้ง 5 ตัว

6.2.2.2 เก็บหลอดแก้วใส่เลือดจากหนูทั้ง 2 กลุ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 6 - 7 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นต่ออีกประมาณ 17 - 18 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัวและมีซีรั่มแยกออกมาได้มากขึ้น นำแต่ละหลอดไป centrifuge ด้วยความเร็วประมาณ 2500 rpm เวลา 30 นาที ใช้ capillary pipette ค่อย ๆ ดูดซีรั่มแยกออกใส่หลอดทดลองที่อบฆ่าเชื้อแล้วเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

6.2.2.3 ทำ Neutralization ของพิษงูในหลอดทดลอง โดยดูดซีรั่มจากหนูแต่ละกลุ่มลงในหลอดทดลองที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ซีรั่มจาก 1 กลุ่มจะแบ่งออกดังนี้

หลอดที่ 1 ดูดซีรั่มใส่ 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 2 ดูดซีรั่ม 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 0.5

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิลลิลิตร จะเป็นการทำให้เจือจาง 1 : 2

หลอดที่ 3 ดูดซีรั่ม 0.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 0.75 มิลลิลิตร เป็นการทำให้เจือจาง 1 : 4

เติมพิษงูที่ละลายในน้ำกลั่นลงในหลอดทั้ง 3 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของพิษงูที่เติมคือ 8 LD_{50} ต่อ 1 มิลลิลิตร (1 LD_{50} = 0.216 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม) เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

6.2.2.4 นำพิษงูที่ผสมกับซีรั่มแล้วไปฉีดในหนูขาว 1 หลอด ฉีดหนู 3 ตัว ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร ใช้เข็ม tuberculin ฉีดเข้าทางช่องท้อง แล้วดูผลว่าหนูตายหรือยังรอดเป็นจำนวนเท่าไรภายใน 24 ชั่วโมง นำผลการทดลองนี้ไปคำนวณหาว่า ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรจะทำลายพิษงูได้กี่ LD_{50}

เลือดที่เจาะทั้งหมด 8 ครั้ง นำมาหาปริมาณของ Neutralizing antibody ทุกครั้งด้วยวิธีดังกล่าวนี้เหมือนกันหมด แล้วดูว่าในระยะใดมีแอนติบอดี้สูงที่สุด โดยดูจากจำนวน LD_{50} ที่ซีรั่มทำลายได้

6.2.2.5 หลังจากเจาะเลือดครั้งที่ 8 และทราบผลระดับของแอนติบอดี้จากการทำ Neutralization แล้วทดลองฉีดพิษงูที่มิได้มีการเปลี่ยนแปลง (Unpolymerized toxin) เข้าในหนูที่ถูก immunize แล้วทั้ง 2 กลุ่ม โดยฉีดด้วยจำนวนน้อยดูก่อนแล้วจึงเพิ่มมากขึ้นต่อมาดังต่อไปนี้

ครั้งที่ 1 (หลังเจาะเลือดครั้งที่ 8 แล้ว 1 วัน) ฉีด 3 LD_{50}
ครั้งที่ 2 (หลังฉีดครั้งที่ 1 แล้ว 2 วัน) ฉีด 5 LD_{50}
ครั้งที่ 3 (หลังฉีดครั้งที่ 2 แล้ว 2 วัน) ฉีด 8 LD_{50}

แต่ละครั้งดูผลว่าหนูมีอาการไม่สบายหรือตายภายใน 24 ชั่วโมงหรือไม่