รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กาญจณา จันทองจีน . 2536. ผลน้ำสกัดจากหอย (*Asaphis violascens*) ต่อการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรีย. รายงานผลทุนวิจัยเร่งด่วนภายในประเทศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 18 หน้า

นันทวัน ฤทธิ์เดช . 2539. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ,115 หน้า

เบญจภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย . 2538. ผลของน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดมีพิษและไม่มีพิษต่อการสร้างเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอยโดยแบคทีเรีย วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 117 หน้า

วรพรรณี พจนสุนทร . 2539. การผลิตเทโทรโดทอกซินในหอยทราย *Asaphis violascens* หลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียทะเล วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 120 หน้า

ภาษาอังกฤษ

Arakawa, O., Nishio, S., Noguchi, T., Shida, Y., and Onoue, Y. 1995. A new saxitoxin analogue from a xanthid crab *Atergatis floridus*. Toxicon. 33(12) : 1577-1584.

Arakawa, O., Noguchi, T., Shida, Y., and Onoue, Y. 1994. Occurrence of carbamoyl-*n*-hydroxy derivatives of saxitoxin and neosaxitoxin in a xanthid crab *Zosimus aeneus*. Toxicon. 32(2) : 175-183.

Bower, D.J., Hart, R.J., Matthews, P.A., and Howden, M.E.H. 1981. Nonprotein neurotoxins. Clinical Toxicology. 18(7) : 813-863.

Budavari, S. O'Neil, M.J., Smith, A., and Heckelman, P.E. 1989. The Merck Index : An Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biological. New Jersey, Merck & Co., Inc.

Catterall, W.M. 1985. The voltage sensitive sodium channel : A receptor for multiple neurotoxin. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.) Toxic dinoflagellate. New York, Elsevier : pp 329-342.

Do, H.K., Hamasaki, K., Ohwada, K., Simidu, U., Noguchi, T., Shida, Y., and Kogure, K. 1993. Presence of tetrodotoxin and tetrodotoxin-producing bacteria in freshwater sediment. Appl. Environ. Microbiol. 59(11) : 3934-3937.

Evans, M.H. 1972. Tetrodotoxin, saxitoxin, and related substances : their applications in neurobiology. Int. Sci. Health. A12(9) : 455-464.

Fallon, W.E., and Shimizu, Y. 1977. Electrophoretic analysis of paralytic shellfish toxins. J. Environ. Sci. Health. A12(9) : 455-464.

Harada, T., Oshima, Y., and Yasumoto, T. 1982. Structures of two paralytic shellfish toxins, gonyautoxin V and VI, isolated from a tropical dinoflagellate, *Pyrodinium bahamense* var compressa. J. Agric. Biol. Chem. 46(7) : 1861-1864.

Hwang, D.F., Chueh, C.H. and Jeng, S.S. 1990. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Natica lineata* (lined moon shell) . Toxicon. 28(1) : 21-27.

Juntongjin, K., Piyakarnchana, T., Kogure, K., Shimidu, U., and Ohwada, K. 1993. Sodium channel blocker producing bacteria isolated from the Gulf of Thailand. J. Mar. Biotechnol. 1 : 93-96

Kao, C.Y. 1986. Structure-activity relations of tetrodotoxin, saxitoxin and analogues. In C.Y. Kao and S.R. Levinson (eds) Annals New York Academy of Sciences. 479 : 52-59.

Kao, C.Y. and Nishiyama, A. 1965. Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. J. Physiol. 180 : 50-66.

Kao, C. Y. and Walker, S.E. 1982. Active groups of saxitoxin and tetrodotoxin as deduced from actions of saxitoxin analogues on frog muscle and squid axon. J. Physiol. 323 : 619-637.

Kawabata, T. 1978. The Manual for The Methods of Food Sanitation Test : Vol. 2. Tokyo, Japan Food Hygienic Association, 232-240.

Kim, Y.H., Brown, G.B., Mosher, H.S., and Fuhrman,F.A. 1975. Tetrodotoxin : Occurrence in atelopid frogs of costa rica. Science. 189 : 151-152.

Kodama, M. 1989. Possible association of paralytic shellfish toxins-producing bacteria with bivalve toxicity.In S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno (eds.) Mycotoxins and Phycotoxins' 88. A Collection of Invited Papers Presented at the Seventh Internationl IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins,Tokyo, Japan,16-19 August : pp. 391-398.

Kodama,M., Noguchi, T., Maruyama, J., Ogata, T., and Hashimoto, K. 1983. Release of tetrodotoxin and paralytic shellfish poison from puffer liver by RNase. J. Biochem. 93 : 243-247.

Kodama,M. and Ogata, T. 1988. Toxification of bivalves by paralytic shellfish toxins. Asia Pacific Journal of Pharmacology. 3: 99-109.

Kodama,M.,Ogata, T., Noguchi, T., Maruyama, J., and Hashimoto, K. 1983. Occurrence of saxitoxin other toxins in the liver of the puffer fish *Takifugu pardalis*. Toxicon. 21(6) : 897-900.

Kodama, M., Ogata, T., and Sato, S. 1988. Bacterial production of saxitoxin. Agric. Biol. Chem. 52(4) : 1075-1077.

Kodama, M., Ogata, T., Sakamoto, S., Sato, S., Honda, T., and Miwatani, T. 1990. Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moraxella* sp. isolated from *Protogonyaulax tamarensis*. Toxicon. 28(6) : 707-714.

Kungsuwan, A., Nagashima, Y., Noguchi, T., Shida, Y., Suvapeepan, S., Suwansakornkul, P., and Hashimoto, K. 1988. Tetrodotoxin in the eggs of horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* inhabiting Thailand. Nippon Suisan Gakkaishi. 53 : 261-266.

Laobhripatr, S., Limpakarnjanarat, K., Sangwanloy, O., Sudhasaneya, S., Anuchatvorakul, B., Leelasitorn, S., and Saitanu, K. 1990. Food poisoning due to consumption of the freshwater puffer tetraodon fangi Thailand. Toxicon. 28(11) : 1372-1375.

Lassus, P., Ledoux, M., Bardouil, M., and Bohec, M. 1993. Influence of initial toxicity and extraction procedure on paralytic toxin changes in the mussel. Toxicon. 31(3) :237-242.

Matsumura, K. 1995. A monoclonal antibody against tetrodotoxin that reacts to the active group for the toxicity. Euro. J. Pharmacol. 293 : 41-45.

Miyazawa, K., Jeon, J.K., Maruyama, J., Noguchi, T., Ito, K., and Hashimoto, K. Occurrence of tetrodotoxin in the flatworm *Planocera multitentaculata*. Toxicon. 24(7) : 645-650.

Mosher, H.S., Fuhrman, F.A., Buchwald, H.D., and Fischer, H.G. 1964. Tarichatoxin-tetrodotoxin : A potent neurotoxin. Science. 144 : 1100-1110.

Nagashima, Y., Nishio, S., Noguchi, T., Arakawa, O., Konoh, S., and Hashimoto, K. 1988. Detection of tetrodotoxin by thin-layer chromatography fast atom bombardment mass spectrometry. Anal. Chem. 75 : 258-262.

Nakamura, M., and Yasumoto, T. 1985. Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. Toxicon. 23(2) : 271-276.

Narahashi, T., Moore, J. W. and Posten, R. N. 1967. Tetrodotoxin derivatives : chemical structure and blockage of nerve membrane conductance. Science 156 : 976-978.

Narita, H., Noguchi, T., Maruyama, J., Ueda, Y., Hashimoto, K., Watanabe, Y., and Hida, K. 1981. Occurrence of Tetrodotoxin in a Trumpet Shell, " Boshubora " *Charonia sauliae.* Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 47(7) : 935-941.

Noguchi, T., Ali, A.E., Arakawa, O., Miyazawa, K., Kanoh, S., Shida, Y., Nishio, S., and Hashimoto, K. 1991. Toxicon. 29(7) : 845-855.

Noguchi,T. and Hashimoto, K. 1973. Isolation of tetrodotoxin from a goby, *Gobius criniger.* Toxicon. 11 : 305-307.

Noguchi, T., Maruyama, J., Narita, H., and Hashimoto, K. 1984. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk, *Tutufa lissostoma* (frog shell). Toxicon. 22(2) : 219-226.

Oshima, Y., Bolch, C. J. and Hallegraeff, G. M. 1992. Toxin composition of resting cysts of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). Toxicon. 30(12) :1539-1544.

Oshima, Y.,Hasegawa, M., Yasumoto, T., Hallegraeff, G., and Blackburn, S. 1987. Dinoflagellate *Gymnonidium catenatum* as a source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. Toxicon. 25(11) : 1105-1111.

Oshima, Y.,Sugino, K., and Yasumoto, T. 1989. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. In S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno (eds.) Mycotoxins and Phycotoxins' 88. A Collection of Invited Papers Presented at the Seventh Internationl IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins,Tokyo, Japan,16-19 August : pp. 319-326.

PavelKa, L.A., Kim, Y.H., and Mosher, H.S. 1977. Tetrodotoxin and tetrodotoxin-like compounds from the eggs of the costa rica frog, *Atelopus chiriquiensis* . Toxicon. 15 : 135-139.

Proctor, N.H., Chan, S.L., and Trevor, A.J. 1975. Production of saxitoxin by cultures of *Gonyaulax catenella*. Toxicon. 13: 1-9.

Saitanu, K., Laobhripatr, S., Limpakarnjanarat, K., Sangwanloy, O., Sudhasaneya, S., Anuchatvorakul, B., and Leelasitorn, S. 1991. Toxicity of the freshwater puffer fish *Tetraodon fangi* and *T. palembangensis* from Thailand. Toxicon. 29(7) : 895-897.

Sato, S., Kodama, M., Ogata, T., Saitanu, K., Furuya, M., Hirayama, K. and Kakinuma, K. 1997. Saxitoxin as a toxic principle of a fresh puffer, *Tetraodon fangi*, in Thailand. Toxicon . 35(1) : 137-140.

Sheumack, D.D., Howden, M.E.H., Spence, I., and Quinn, R.J. 1978. Maoulotoxin : A neurotoxin from the vemon glands of octopus *Hepalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin. Science. 199 : 188-189.

Shimizu, Y., Alam, M., Oshima, Y., and Fallon, W.E. 1975. Presence of four toxins in red tide infested clams and cultured *Gonyaulax tamarensis* cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66(2) : 731-737.

Shimizu, Y.,Gupta, S., and Prasad, A.V.K. 1990. Biosynthesis of dinoflagellate toxins. In E.Graneli, Bo. Sundatrom, Lars Edler, and D. M. Anderson. Toxic Marine Phytoplankton. New York, Elsevier Science Publishing.

Shiomi, K., Yamaguchi, S., Kikuchi, T., Yamamori, K., and Matsui, T. 1992. Occurrence of tetrodotoxin-binding high molecular weigth substances in the body fluid of shore crab (*Hemigrapsus sanguineus*). Toxicon. 30(12) :1529-1537.

Stafford, R. G. and Hines, H. B. 1995. Urinary elimination of saxitoxin after intravenous injection. Toxicon 33(11) :1501-1510.

Tsuda, K., Ikuma, S., Kawamura, M., Tachikawa, R., Sakai, K., Tamura, C., and Amakasu, O. 1964. Tetrodotoxin VII : On structure of tetrodotoxin and its derivatives, Chem. Pharm. Bull. 12 (11) : 1357-1374.

Yamashita, M.Y., Mebs, D., and Yasumoto, T. 1992. Tetrodotoxin and its analogues in extracts from the toad *Atelopus oxyrhychus* (family : Bufonidae). Toxicon. 30(11) : 1489-1492.

Yasumoto, T., and Michishita, T. 1985. Fluorometic determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem. 49(10) : 3077-3080.

Yasumoto, T., Yasumura, D., Yotsu, M., Michishita, T., Endo, A., and Kotaki, Y. 1986. Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin. Agric. Biol. Chem. 50(3) : 793-795.

Yotsu, M., Yamazaki, T., Megure, Y., Endo, A., Murata, M., Naoki, H., and Yasumoto, T. 1987. Production of tetrodotoxin and derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of a pufferfish. Toxicon. 25(2) : 225-228.

Zaman, L., Arakawa, O., Shimosu, A. and Onoue, Y. 1997. Occurrence of paralytic shellfish poison in Bangladeshi freshwater puffers. Toxicon. 35(3) : 423-431.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	17.53	กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	3.5	กรัม
	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.5	กรัม
	โพลีเปปโตน (polypeptone)	1.0	กรัม
	ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
	กลูโคส (glucose)	2.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มล. ปรับความเป็นกรดด่าง 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ORI medium)

ประกอบดวย	โพติโอสเปปโตน หมายเลข 3.	1.0	กรัม
	(protease peptone NO.3)		
	ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.0	กรัม
	ไฟโตน (phytone)	0.5	กรัม
	โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	0.2	กรัม
	โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3)	0.05	กรัม
	เฟอริคซิเตรท ($C_6H_8O_7Fe.5H_2O$)	0.04	กรัม
	วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำทะเลสังเคราะห์ปริมาตร 900 มล. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.0-8.0 นำไปต้มให้ละลายและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที

<u>หมายเหตุ</u> อาหารเลี้ยงเชื้อโออาร์ไอที่ใช้ทำเป็นอาหารสำหรับเก็บเชื้อดั้งต้นเติมวุ้นผงเพียง 8 กรัม และบรรจุลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ แล้ววางเอียง (slant)

3. น้ำทะเลสังเคราะห์ (artificial sea water)

ประกอบด้วย	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	25.0	กรัม
	ทริสบัฟเฟอร์ ($C_4H_{11}O_3$)	1.0	กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	1.0	กรัม
	แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH_4)$_2SO_4$)	1.0	กรัม
	แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.3	กรัม
	กรดบอริค (HBO_3)	2.0	กรัม
	โซเดียมโมลิบเดท ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.5	กรัม
	แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	0.4	กรัม
	ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	50.0	ไมโครกรัม
	คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.4	ไมโครกรัม
	โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	1.0	ไมโครกรัม
	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	50.0	ไมโครกรัม
	วิตามิน บี 12 (vitamine B_{12})	20.0	ไมโครกรัม
	ไบโอติน (biotin)	10.0	ไมโครกรัม

ละลายทริสด้วยน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มล. ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.8 ละลายส่วนผสมแต่ละอย่างแยกกัน แล้วจึงนำมาผสมกันภายหลัง ตามลำดับ และผสมรวมกับสาร

ละลายทริสที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้ว และเติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 1000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121°ซ)เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้เติมวิตามินบี 12 และไบโอตินที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองแล้ว

<u>หมายเหตุ</u> ดัดแปลงจากสูตรของ Schroder และคณะ (1980) ซึ่งใช้กรดบอริค, โซเดียมโมลิบเดท และแมงกานีสคลอไรด์หนัก 0.2 มก., 0.5 มก. และ 0.4 มก. ตามลำดับ

4. อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (RPMI medium 1640)

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Gibco BRL, USA 1 ซอง (10.4 กรัม) ละลายในน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตร 1000 มล. และกรองด้วยกระดาษกรองที่มีช่องขนาด 0.45 ไมครอน และ 0.22 ไมครอน ตามลำดับ เติม Fetal bovine serum ของบริษัท Gibco, USA 10% โดยปริมาตร บรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อ และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ ก่อนใช้นำออกมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ ประมาณ 15-20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1% (0.1% acetic acid)

ใช้ลูกยางดูดกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) ปริมาตร 0.1 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มล. ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121°ซ)เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ (0.3 M NaCl)

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 17.53 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. เติมน้ำให้ครบ 1000 มล. นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเซลคัลเจอร์

3.1 สารละลายวอบายเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (10 mM oubain solution)

ชั่งวอบาย 72.88 มก. (น้ำหนักโมเลกุล 728.8) ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปราศจากเชื้อ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. จนได้ปริมาตรสุดท้าย 10 มล. ต้มในน้ำเดือดจนละลายหมด บรรจุใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (miorocentrifuge tube) ปราศจากเชื้อหลอดละ 1 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3.2 สารละลายเวอราดริดีนเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (1mM veratridine solution)

ชั่งเวอราดริดีน 6.738 มก. (น้ำหนักโมลกุล 673.8) ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. หยดแอบโซลูทเอทานอลปริมาตร 3.3 มล. ลงไปละลายช้าๆ เขย่าตลอดเวลาจากนั้นค่อยๆ เติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ปราศจากเชื้อลงไป เขย่าตลอดเวลาเช่นเดียวกันจนมีปริมาตรครบ 10 มล. บรรจุใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก(microcentrifuge tube) ปราศจากเชื้อหลอดละ 1 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

3.3 สารละลายสำหรับทำให้เซลเพาะเลี้ยงหลุดออกจากขวดเลี้ยงเซล

ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution)

ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.25	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.75	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	4.55	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ปริมาตรประมาณ 400 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.3 และเติมน้ำกลั่นสองครั้งจนมีปริมาตรครบ 500 มล. นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 °ซ) เป็นเวลา 15 นาที

ข. สารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA solution)

ประกอบด้วย ทริปซิน (trypsin)	5.0	กรัม
โซเดียมอีดีทีเอ (EDTA-4Na)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่นสองครั้ง	1000.0	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใช้สารละลายสำเร็จรูปของบริษัท Gibco BRL, USA. ปริมาตร 10 มล. เติมลงในสารละลาย ก. ปริมาตร 90 มล. เก็บในขวดแก้วปราศจากเชื้อ ที่อุณหภูมิ -20 °ซ และเมื่อนำมาใช้จะนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ

3.4 สารละลายเอ็มทีทีเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่งสารเอ็มทีที(MTT,(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) น้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายในเมทธานอล 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline , PBS) จนได้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร

3.5 สารละลาย 0.04 นอร์มัล กรดไฮโดรคลอริก ในไอโซโพรพานอล

ปิเปตสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 0.035 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมไอโซโพรพานอลจนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานเทโทรโดทอกซินเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ (150 uM standard tetrodotoxin solution)

ชั่งสารเทโทรโดทอกซินน้ำหนัก 0.4789 มก. (น้ำหนักโมเลกุล 320) นำไปละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งที่ปราศจากเชื้อในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. จนมีปริมาตรครบ 10 มล. ซึ่งได้สารละลายของเทโทรโดทอกซินมาตรฐานเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ บรรจุลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 1 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

5. สารละลาย 1 เปอร์เซนต์กรดน้ำส้มใน 20 เปอร์เซนต์เอทธานอล

ปิเปตแอบโซลูทเอทธานอลปริมาตร 20 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มล. ได้สารละลาย 20 เปอร์เซนต์ เอทธานอล จากนั้นปิเปตกรดน้ำส้มเข้มข้น 1 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. อีกใบหนึ่ง เติมสารละลาย 20 เปอร์เซนต์ เอทธานอลที่เตรียมไว้จนมีปริมาตรครบ 100 มล.

6. สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.03 โมลาร์

ดูดกรดอะซีติกเข้มข้น (gracial acetic acid) ปริมาตร 1.72 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล.

7. สารละลายสำหรับทำเกรเดียนท์เส้นตรงของคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25

7.1 สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.4 โมลาร์

ชั่งแอมโมเนียมอะซิเตตน้ำหนัก 15.146 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มล.ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น นำไปใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มล.

7.2 สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งแอมโมเนียมอะซิเตตน้ำหนัก 3.854 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มล.ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น นำไปใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มล.

8. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

8.1 สารละลายทริสบัฟเฟอร์ (tris buffer) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.7 ประกอบด้วย

สารละลาย ก. : ชั่งทริส ($C_4H_{11}NO_3$. HCl) 2.42 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

สารละลาย ข. : ดูดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 0.33 มล. และเติมน้ำกลั่น 19.67 มล. จากนั้นดูดสารละลายผสมปริมาตร 16.2 มล. เติมลงในสารละลาย ก.

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000มล. ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 8.7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl)

8.2 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide solution) เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์

ดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ 3.33 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มล. เก็บในขวดสีชา เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

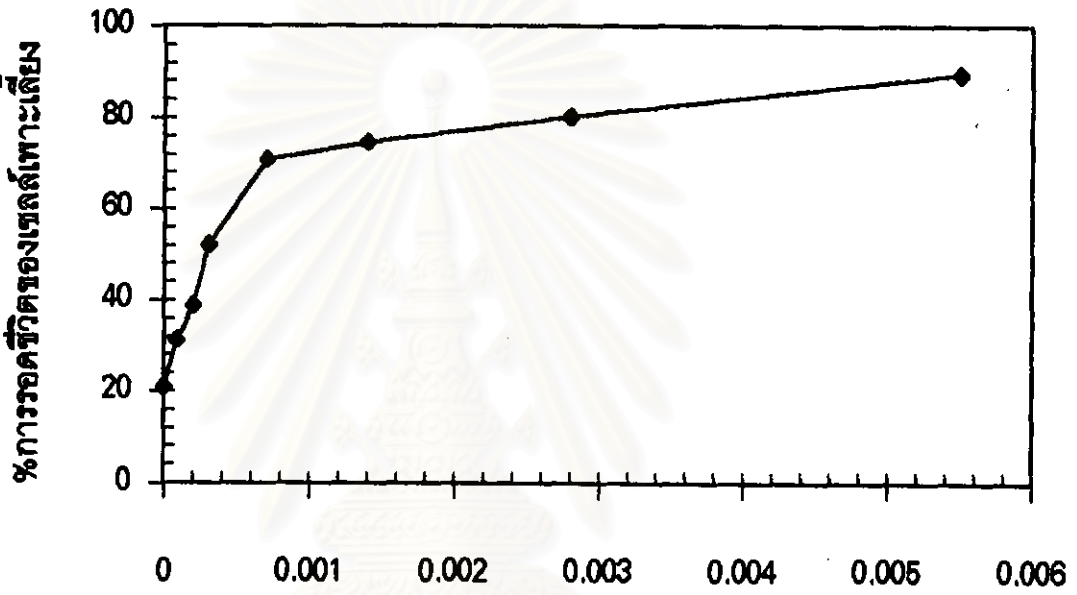
8.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide solution) เข้มข้น 3 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)12.0 กรัม ละลายน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร จนครบปริมาตร 100 มล. เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

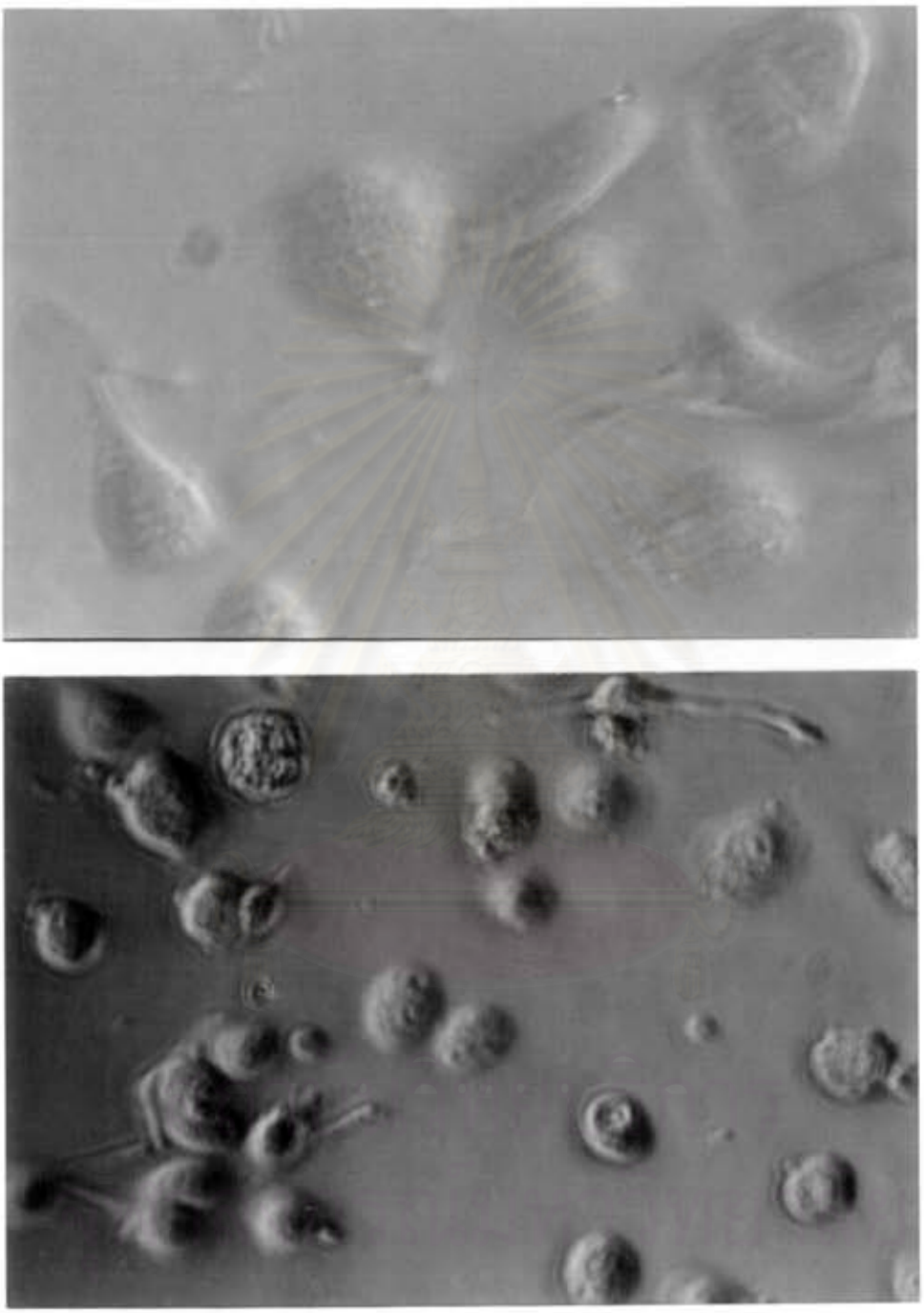
ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐานของสารเทโทรโดทอกซิน ที่ใช้ในการหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture assay) แบบวิธีเอ็มทีที (MTT method)



รูปที่ 28 กราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตกับปริมาณ เทโทรโดทอกซิน (ไมโครกรัม ต่อ 10 ไมโครลิตร) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบเอ็มทีที

2. ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ATCC CCL 131 ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



(1)

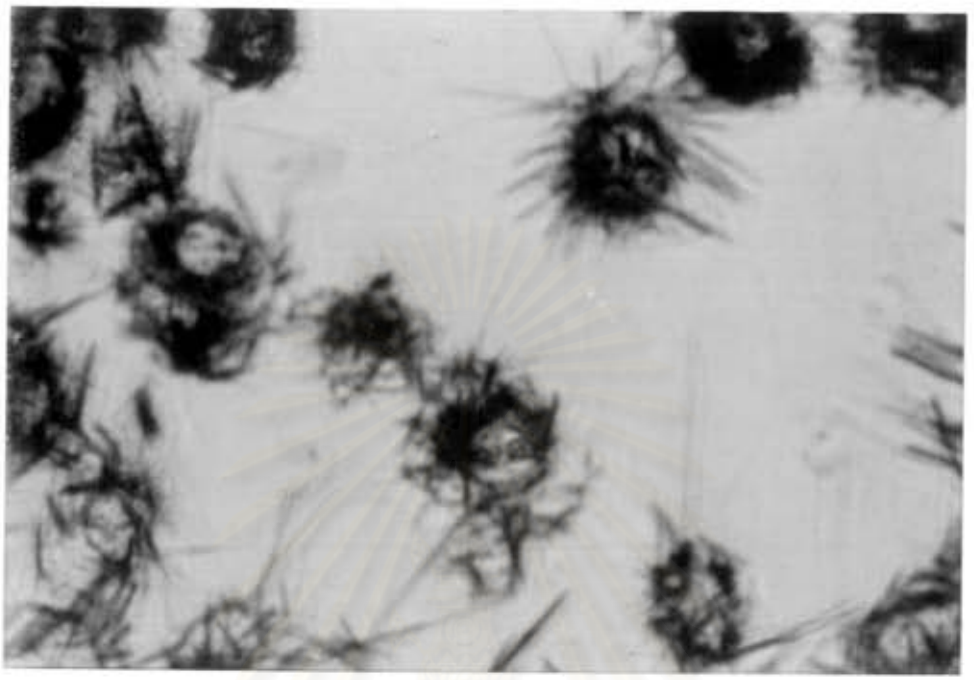
(2)

รูปที่ 29 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า

(1) ลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิต

(2) ลักษณะของเซลล์ที่ตาย

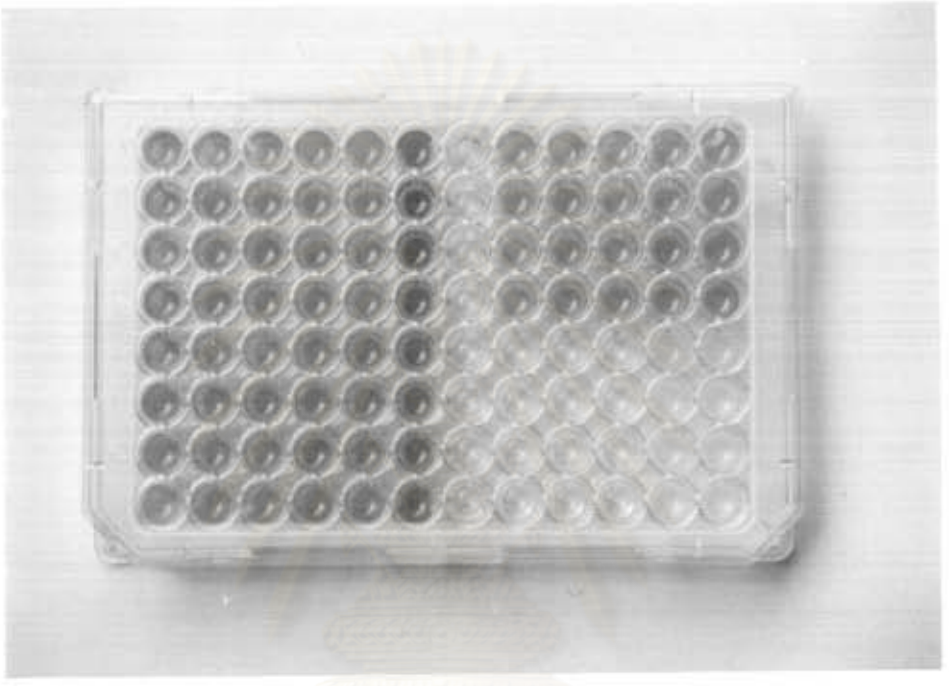
3. ลักษณะผลึกเอ็มทีที-ฟอร์มาซานที่เกิดจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีชีวิตสามารถเมตาบอไลต์ เอ็มทีทีให้เป็นเอ็มทีที-ฟอร์มาซาน ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน



รูปที่ 30. ลักษณะผลึกเอ็มทีที-ฟอร์มาซาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. สีของสารละลายผลึกเอ็มทีที-ฟอร์มาซาน หลังจากเติมสารละลาย isopropanol ที่มี 0.04 N HCl ใน 96 - well Microtiterplate และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



รูปที่ 31. สารละลายผลึกเอ็มทีที-ฟอร์มาซาน หลังจากเติมสารละลาย isopropanol ที่มี 0.04 N HCl

1. หลุมที่มีสีเหลือง คือ blank สีที่เกิดขึ้นได้มาจากสีของสารละลาย MTT ผสมกับสารละลาย isopropanol

2. หลุมที่มีสีม่วงแดง คือ หลุมที่มีเซลล์ประสาทหนูที่มีชีวิต โดยความเข้มของสีมากแสดงว่ามีเซลล์ที่มีชีวิตมาก สีที่เกิดขึ้นได้มาจากสีของผลึกเอ็มทีที-ฟอร์มาซานที่ละลายในสารละลาย isopropanol

3. หลุมที่มีสีชมพูอ่อน คือ หลุมที่มีเซลล์ประสาทหนูเลี้ยงใน RPMI medium (ไม่ได้เติม MTT)

5. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance, ANOVA)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) เป็นวิธีการทางสถิติที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบเกี่ยวกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากร ในกรณีมีกลุ่มประชากรตั้งแต่สองกลุ่มขึ้นไป และมีตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียว

วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนมีข้อตกลงเบื้องต้น (assumption) เกี่ยวกับข้อมูลที่จะนำมาวิเคราะห์ควรมีลักษณะดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่าง เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงเป็นโค้งปกติ

2. ค่าของตัวแปรตามแต่ละหน่วยเป็นอิสระต่อกันทั้งภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่ม

- สมมุติฐาน

$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \cdots = \mu_n$

H_1 : มี μ อย่างน้อยหนึ่งตัวมีค่าแตกต่างจากกลุ่มอื่น

- ค่าสถิติ

$$F = \frac{\text{mean square ระหว่างกลุ่ม}}{\text{mean square ภายในกลุ่ม}} = \frac{MSTR}{MSE} \sim F_{k-1,\,N-k}(1-\alpha)$$

เมื่อ

$$MSTR = \frac{SSTR}{k-1} \quad \text{และ} \quad MSE = \frac{SSE}{N-k}$$

โดย k = จำนวนกลุ่ม

N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

$$SSTR = \sum_{j=1}^{k} \sum_{N} (\bar{X}_{.j} - \bar{X}_{..})^2$$

$$SSE = \sum_{j=1}^{k} \sum_{i=1}^{N} (X_{ij} - X_{.j})^2$$

เมื่อ $\bar{X}_{.j}$ = ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างชุดที่ j

$\bar{X}_{..}$ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดจากตัวอย่าง

โดยพิจารณาค่า F ถ้า F มีค่าต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ($F < 0.05$) จะปฏิเสธ H_0 ซึ่งบอกได้ว่ามีค่าเฉลี่ยของประชากรอย่างน้อย 1 กลุ่ม แตกต่างจากกลุ่มอื่น

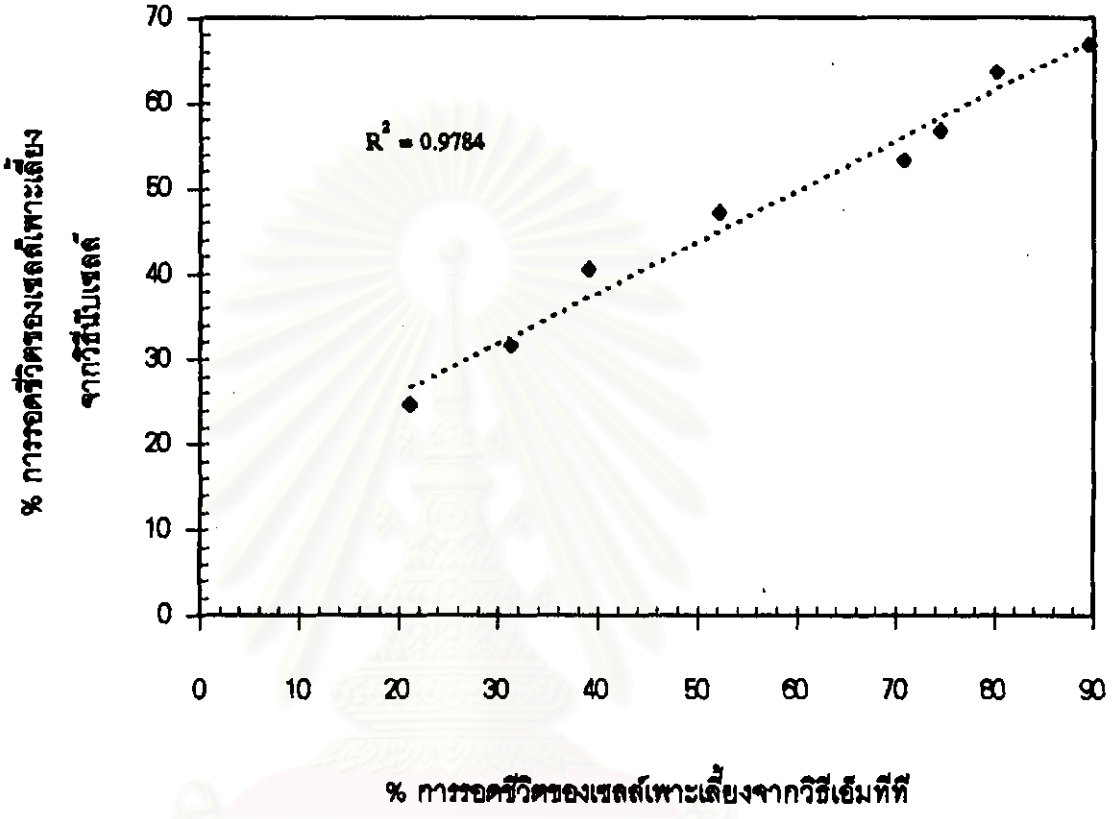
การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เซลล์ประสาทหนูที่มีชีวิตจากการทดสอบโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 ซ้ำ ของสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน 8 ความเข้มข้น โดยวิเคราะห์ว่าการทดสอบทั้ง 3 ซ้ำ ให้ค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตในแต่ละความเข้มข้นไม่แตกต่างกัน

$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

Source	D.F.	Sum square	Mean square	F ratio	Significance of F
ระหว่างกลุ่ม	2	445.9065	222.9533	0.9814	0.3913
ภายในกลุ่ม	21	4770.8237	227.1821		
ทั้งหมด	23	5216.7302			

F มีค่า 0.3913 ซึ่งมากกว่า 0.05 ดังนั้น เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตของสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน 8 ความเข้มข้น ทั้ง 3 ซ้ำ ไม่มีความแตกต่าง แสดงว่าวิธีการแบบเอ็มทีทีที่ปรับปรุงขึ้นสำหรับตรวจสอบสารกีดขวางช่องโซเดียมนี้สามารถใช้แทนวิธีการแบบนับเซลล์แบบเดิมได้เป็นอย่างดี

6. การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์การรอดชีวิตจากวิธีนับเซลล์และวิธีเอ็มทีทีของสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน 8 ความเข้มข้น โดยหาค่า correlation coefficient



รูปที่ 32 กราฟแสดงค่า correlation coefficient ระหว่างเปอร์เซนต์การรอดชีวิตระหว่างวิธีนับเซลล์และวิธีเอ็มทีที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาววรรณิพา วิเวโก เกิดเมื่อวันที่ 4 สิงหาคม พ.ศ. 2514 ที่จังหวัดจันทบุรี และได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา2537 และเข้ารับการศึกษาต่อในชั้นปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2537 และในปีการศึกษา 2538 ได้รับทุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ที่อยู่ปัจจุบัน 26/1 หมู่ 4 ต. ทุ่งเบญจา อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี 22170

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย