บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1สารเคมี

สฟิงโกไมอีลิน (sphingomyelin, Sigma S7004); โคเลสเตอรอล (cholesterol, Sigma C1145); โบวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA, Sigma A2153); โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-12-ไฮเดรท (sodium hydrogen phosphate-12-hydrate, $Na_2HPO_4.12H_2O$, Riedel-de Haen 30414); โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride, KCl, Riedel-de Haen 31248); ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (dihydrogen phosphate, KH_2PO_4, Merck Art.4873); โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, Fluka Biochemical); โซเดียมเอไซด์ (sodium azide, NaN_3, Fluka Biochemical); ออสเมี่ยมเททรอกไซด์ (osmium tetroxide, OsO_4, Sigma O5500); กลูโคส (D(+)-glucose, Sigma G-5400); โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium hydrogen phosphate-7-hydrate, $Na_2HPO_4.7H_2O$, Fluka Biochemical); แคลเซี่ยม คลอไรด์ ไดไฮเดรท (calcium chloride-2-hydrate Krist, Merck Art.2382); แมกนีเซียมคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรท (magnesium hexadydrate, $MgCl_2.6H_2O$, Sigma M9272); แมกนีเซียม ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรท (magnesium sulphate heptahydrate, $MgSO_2.7H_2O$, Sigma M9397); ซาโปนิน (saponin, Sigma S4521), Freund's complete adjuvant (Sigma, E-5881); คลอโรฟอร์ม (chlorofrom, J.T. Baker); อีเทอร์ (ether, J.T. Baker); O-phenylene-diamine-HCL (Zymed Laboratoriees, Inc. USA); 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDPC, Sigma E-6383); N,N-dimethylformamide (Sigma D-4254); เมธานอล (methanol Absolute, J.T. Baker); โซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส (sodium sulphate anhydrous, BDH Chemical); โซเดียม ไฮโดรเจน คาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate, Riedel-de Haen 31437); เจลาติน (gelatin, Merck Art.4070); แอมโมเนียม ซัลเฟต (ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$, BDH Chemical); ไดโซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต โมโนไฮเดรท (disodium hydrogen phosphate monohydrate, $Na_2HPO_4.H_2O$, Merck Art.6345); citric acid (Sigma C2270); sephadex G-25 (Sigma G-25-300); diethylaminoethyl cellulose (DEAE

cellulose, Sigma D6418); mineral oil (Sigma M3516); เฟอริก คลอไรด์ (Ferric chloride-6-hydrate, $FeCl_3.6H_2O$, J.T. Baker); เกลเชียล อะซีติก แอซิด (glacial acetic acid, J.T. Baker); polyethylene sarbitan mionolaurate (Tween 80, Sigma P-1754); ซัลฟูริค แอซิด (sulfuric acid, J.T. Baker)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) แบบ UV-Visible โมเดล DU® Series 7000 บริษัท Beckman Instruments, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา; เครื่องวอร์เทกซ์ (vortex mixer) โมเดล K-500 GE บริษัท Labinco; เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้ (centrifuger) โมเดล Mistral 3000 บริษัท MSE Co. ประเทศอังกฤษ; เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 4 ตำแหน่ง) โมเดล 2842 บริษัท Sartorius GmBH ประเทศเยอรมัน; เครื่องเขย่า (shaker) โมเดล GFL Type 3015 บริษัท Gesellschaft fur Labortechnik m.b. H&Co. ประเทศเยอรมัน; ไมโครปิเปต (micropipet) ขนาด 5,000, 1,000, 200, 100 และ 50 ไมโครลิตร Pipetman บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส; Dialysing tube (ไม่ให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 12,000-14,000 ขึ้นไปผ่าน) บริษัท Viskase ประเทศสหรัฐอเมริกา; หลอดทดลองขนาด 10x75, 100x150 มม.; เครื่อง microplate reader (Multiscan, MCC/340P vertion 2.33, Titertek multiscan) บริษัท ICN ประเทศสหรัฐอเมริกา; เครื่อง microperpex Peristaltic Pump 1 เครื่อง; column chromatography ขนาด 1.6x30 ซม.; 3-way stopcock บริษัท Nipro Medical Industry Ltd. ประเทศญี่ปุ่น; ไมโครเพลท 96 หลุม (Microplate) แบบ Nunc-Immuno™ Plate บริษัท Nalge Nunc International. ประเทศเดนมาร์ก; cavitator ultrasonic cleaner บริษัท Mettler Electronics Corperation ประเทศเยอรมัน; เข็มเบอร์ 23 (23G x 11/2") Nipro®; หลอดฉีดยา ขนาด 12.5 มล; dryer National® ประเทศไทย; combitips ขนาด 12.5 มล. บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน

3.2 สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

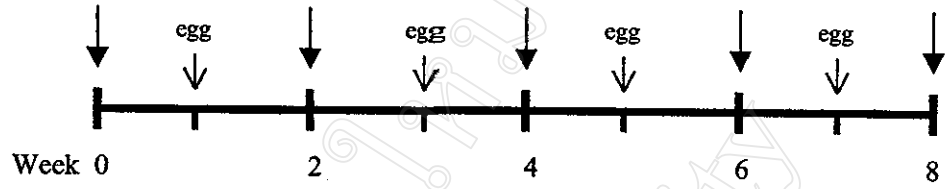
นกกระทา (*Coturnix coturnix japonica*) อายุ 60 วัน จำนวน 48 ตัว เพศเมีย น้ำหนัก 100-200 กรัม ขังเดี่ยวในกรงสองชั้น แต่ละกรงมีขนาด 5 x 6 x 5 นิ้ว (กว้าง x สูง x ลึก) พร้อมถ้วยน้ำและถ้วยอาหารพลาสติก มีอาหารและน้ำให้กินตลอดเวลา (*ad libitum*) โดยใช้อาหารสำหรับนกกระทาไข่ของบริษัท แหลมทองเกษตรภัณฑ์ จำกัด เลี้ยงอยู่ภายในห้องสัตว์ทดลอง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ออกแบบการทดลองและวางแผนการทดลองแบบสุ่ม

ตลอด (Completely Random Design, CRD) มีสิบหกกลุ่มการทดลอง ใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 3 ตัว กลุ่มที่หนึ่งและกลุ่มที่สองคือกลุ่มควบคุม (control) ได้รับ phosphate buffer saline (PBS) ตัวละ 500 และ 1,000 ไมโครลิตร ตามลำดับ กลุ่มที่สามได้รับ โคเลสเตอรอลเชื่อมกับ โบวาย ซีรัม อัลบูมิน (cholesterol-BSA) 500 ไมโครกรัม ที่ละลายใน PBS 50 ไมโครลิตร และผสมด้วย mineral oil adjuvant 500 ไมโครลิตร กลุ่มที่สี่ได้รับ cholesterol-BSA 500 ไมโครกรัม ร่วมกับซาโปนิน 50 ไมโครกรัมที่ละลายใน PBS 50 ไมโครลิตร และผสมด้วย mineral oil adjuvant 500 ไมโครลิตร กลุ่มที่ห้าได้รับ cholesterol-BSA 1,000 ไมโครกรัม ซาโปนิน 100 ไมโครกรัม ที่ละลายใน PBS 100 ไมโครลิตร และผสมด้วย mineral oil adjuvant 1,000 ไมโครลิตร กลุ่มที่หก ได้รับ cholesterol-BSA 500 ไมโครกรัม ที่ละลายใน balanced salt solution (BSS) 500 ไมโครลิตร กลุ่มที่เจ็ด ได้รับ cholesterol-BSA 500 ไมโครกรัม ที่เก็บกักในไลโปโซม 1,400 ไมโครกรัม และละลายใน BSS 500 ไมโครลิตร กลุ่มที่แปด ได้รับ cholesterol-BSA 1,000 ไมโครกรัม ที่เก็บกักในไลโปโซม 2,800 ไมโครกรัม และละลายใน BSS 1,000 ไมโครลิตร กลุ่มที่เก้า ได้รับ cholesterol-BSA 500 ไมโครกรัม ที่ละลายใน PBS 500 ไมโครลิตร กลุ่มที่สิบ ได้รับ cholesterol-BSA 500 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) 50 ไมโครลิตรละลายใน PBS 500 ไมโครลิตร กลุ่มที่สิบเอ็ด ได้รับ cholesterol-BSA 1,000 ไมโครกรัม ผสมกับ FCA 100 ไมโครลิตรละลายใน PBS 1,000 ไมโครลิตร ทั้งสิบเอ็ดกลุ่มได้รับสารโดยวิธี ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) กลุ่มที่สิบสอง ได้รับ PBS 1,000 ไมโครลิตร กลุ่มที่สิบสาม ได้รับ cholesterol-BSA 500 ไมโครกรัม ที่ละลายใน PBS 50 ไมโครลิตร และผสมด้วย mineral oil adjuvant 500 ไมโครลิตร กลุ่มที่สิบสี่ ได้รับ cholesterol-BSA 1,000 ไมโครกรัม ซาโปนิน 100 ไมโครกรัมที่ละลายใน PBS 100 ไมโครลิตร และผสมด้วย mineral oil adjuvant 1,000 ไมโครลิตร กลุ่มที่สิบห้าได้รับ cholesterol-BSA 500 ไมโครกรัมที่ละลายใน BSS 500 ไมโครลิตร กลุ่มที่สิบหกได้รับ cholesterol-BSA 1,000 ไมโครกรัม ที่เก็บกักในไลโปโซม 2,800 ไมโครกรัม และละลายใน BSS 1,000 ไมโครลิตร ตั้งแต่กลุ่มที่สิบสองถึงสิบหก ได้รับสารโดยวิธีป้อนให้กิน (oral administration)

Group

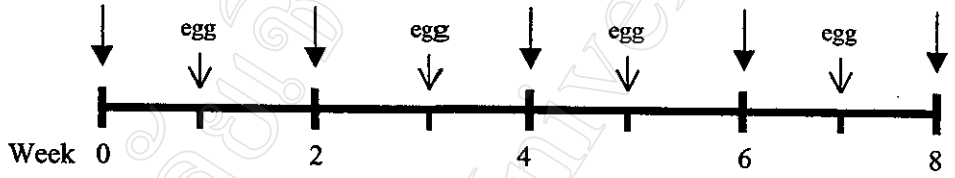
1. 500 PBS* 500 PBS 500 PBS 500 PBS 500 PBS

serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg



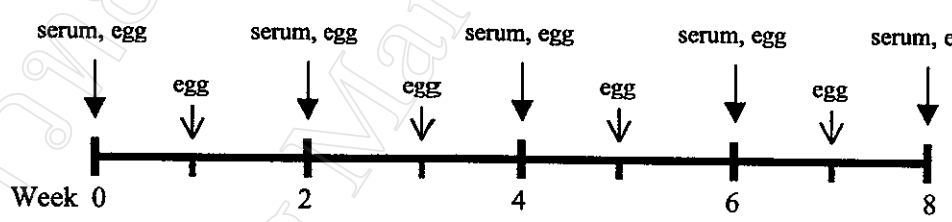
2. 1,000 PBS* 1,000 PBS 1,000 PBS 1,000 PBS 1,000 PBS

serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg



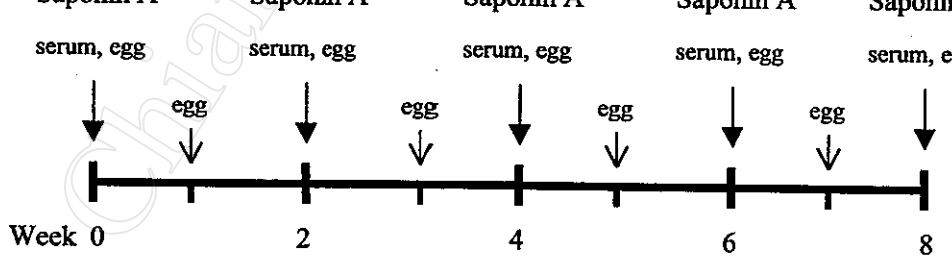
3. Chl-BSA1* Chl-BSA1 Chl-BSA1 Chl-BSA1 Chl-BSA1

serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg



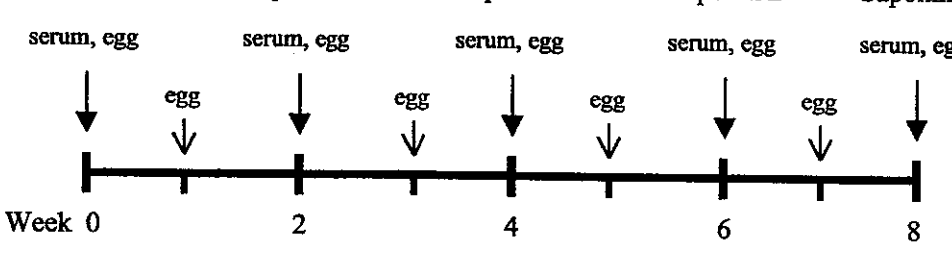
4. Saponin A* Saponin A Saponin A Saponin A Saponin A

serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg



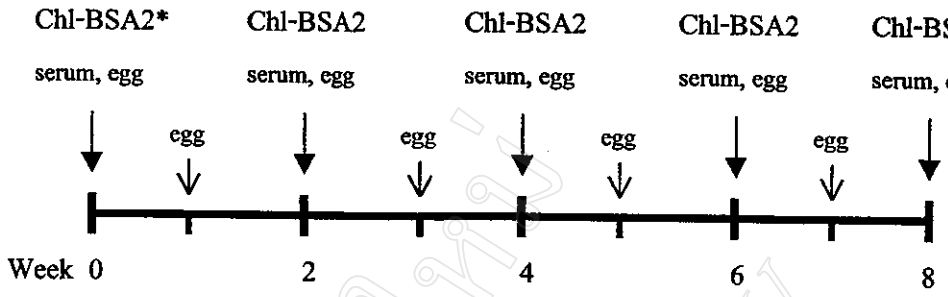
5. Saponin B* Saponin B Saponin B Saponin B Saponin B

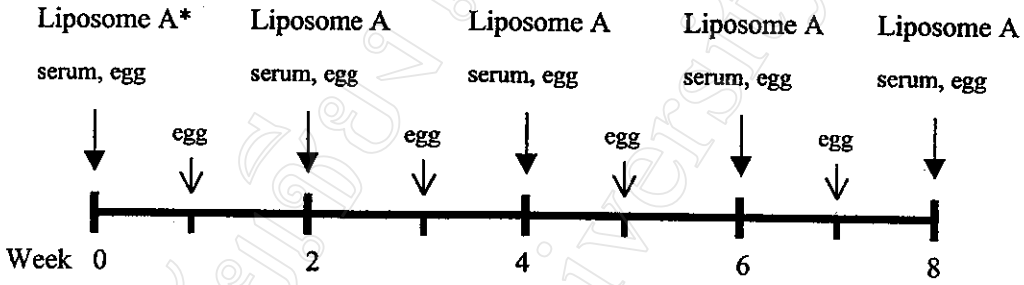
serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg serum, egg

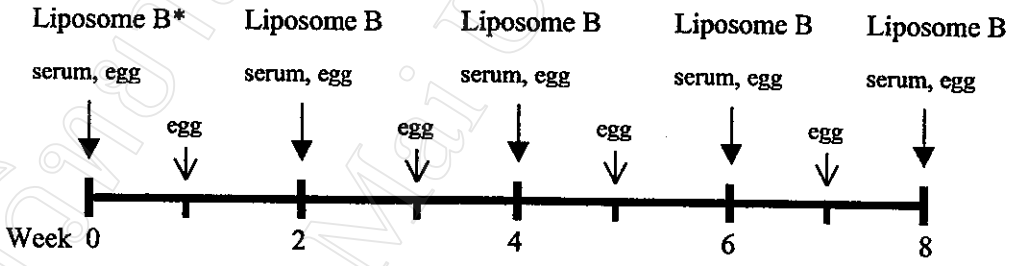


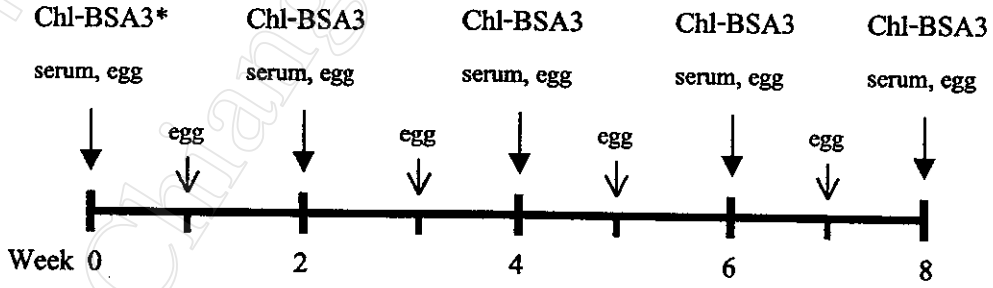
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

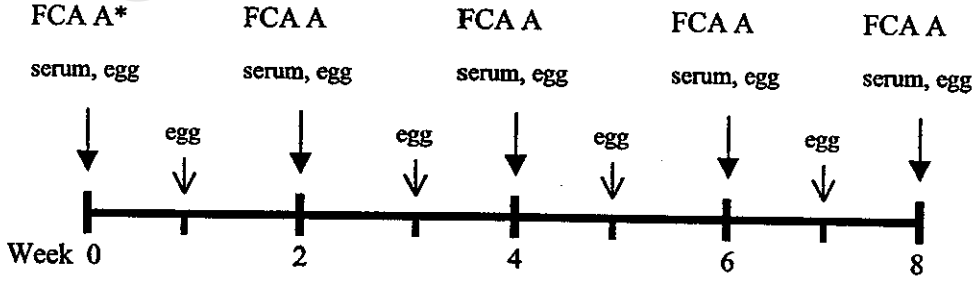
Group

6. 

7. 

8. 

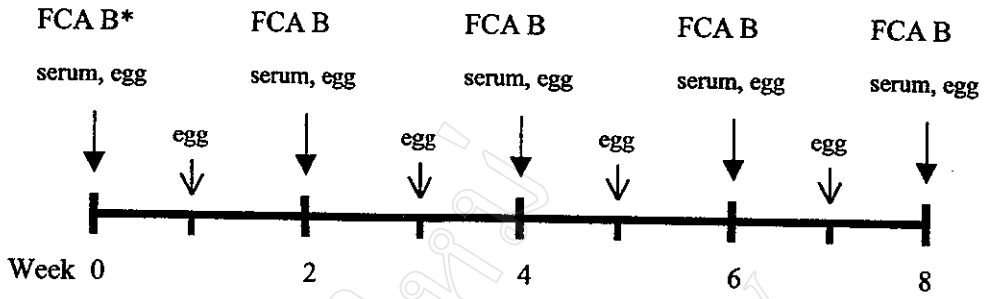
9. 

10. 

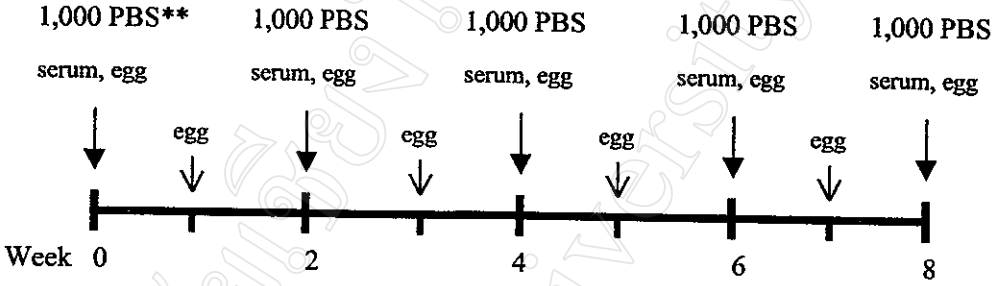
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Group

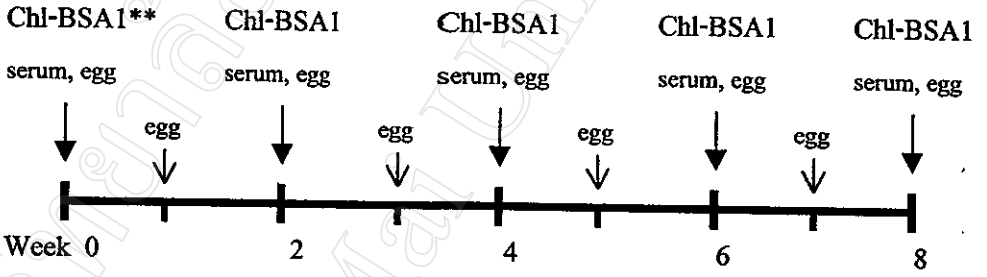
11.



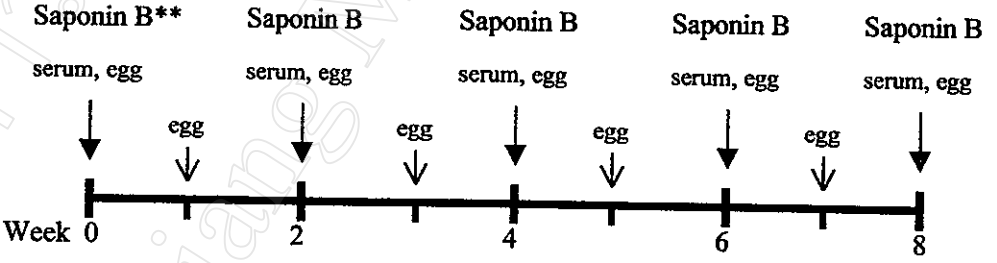
12.



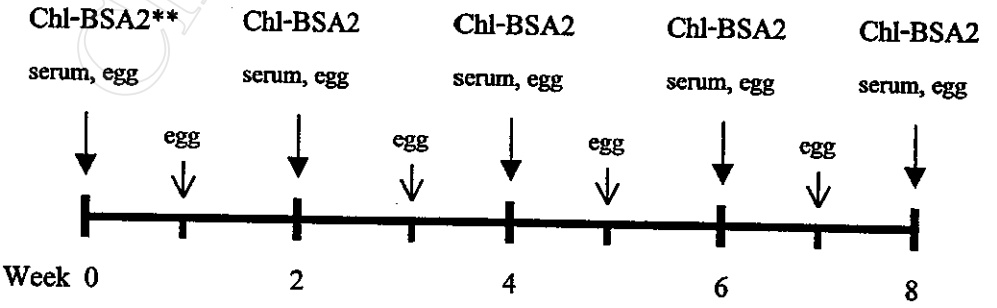
13.



14.



15.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Group

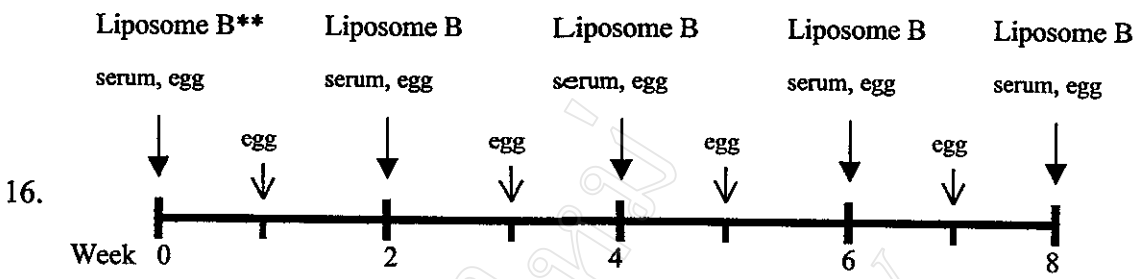


Figure 3-1. Experimental plans (Chl-BSA = cholesterol-BSA; Chl-BSA1 = cholesterol-BSA + mineral oil adjuvant; Chl-BSA2 = cholesterol-BSA + balanced salt solution (BSS); Chl-BSA3 = cholesterol-BSA + phosphate buffer saline (PBS); Saponin A = cholesterol-BSA + saponin 50 μg; Saponin B = cholesterol-BSA + saponin 100 μg; Liposome A = cholesterol-BSA + liposome 1,400 μg; Liposome B = cholesterol-BSA + liposome 2,800 μg; FCA A = cholesterol-BSA + Freund's complete adjuvant 50 μl; FCA B = cholesterol-BSA + Freund's complete adjuvant 100 μl; * = subcutaneous injection; ** = oral administration; serum = collect blood sample; egg = collect egg sample).

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การกระตุ้นโดยวิธี การฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection)

ผสมสารในแต่ละกลุ่มให้เข้ากัน (homogenization) โดยการบรรจุสารลงในหลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 15 มิลลิลิตร 2 หลอดและเชื่อมหลอดฉีดยาทั้งสองด้วยข้อต่อสามทางพลาสติก (3-way catheter) (รูปที่ 3-11) ดันแกนหลอดฉีดยาขึ้นลงประมาณ 50 ครั้ง หรือจนกว่าสารรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ (subcutaneous injection) (รูปที่ 3-12) ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 23 ในสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และ 8

3.3.2 การกระตุ้นโดยวิธี การป้อนให้กิน (oral administration)

ผสมสารให้เข้ากันตาม 3.3.1 ทำการกระตุ้นโดยการป้อนให้กิน (oral administration) โดยใช้ combitip ขนาด 12.5 สอดลงไปทางปากจนถึงบริเวณหลอดคอ (pharynx) แล้วค่อย ๆ หยดลง (รูปที่ 3-14) รอจนกว่านกกระทาจะกลืนสารจนหมด แล้วจึงปล่อยนกกระทาลง

3.3.3 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ทดลองที่เส้นเลือดคำปีก (wing vein) ในสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Appendix A-9) เป็นตัวป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยใช้ EDTA 200 ไมโครลิตร (รูปที่ 3-13) เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดแล้วนำมาเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บของเหลวที่อยู่เหนือเม็ดเลือด (supernatant) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาแอนติบอดี ไตเตอร์โดยวิธี Indirect Enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) และหาปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัม

3.3.4 การเก็บตัวอย่างไข่

เก็บตัวอย่างไข่ทุกวันจากนกกระทาทุกกลุ่มการทดลอง นำไข่มาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง ชั่งน้ำหนักไข่ทั้งฟองด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งและทำการบันทึกผล จากนั้นทำการแยกไข่แดงออกจากไข่ขาวโดยใช้กระบอกกลวงสำหรับทำการแยกสาร (seperate tube) นำไข่แดงที่ได้ไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง บันทึกผลเพื่อทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ไข่แดง นำไข่แดงไปวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอล สกัดและวัดปริมาณ immunoglobulin Y (IgY)

3.4 การเตรียมแอนติเจน

3.4.1 การเชื่อมโมเลกุลเฮปเทนกับโมเลกุลพาหะ

เตรียมโดยวิธีของกนกวรรณ (2543) โดยใช้โคเลสเตอรอล-3-เฮมิซัคซิเนท (cholesterol-3-HS) 2.5 มิลลิกรัม ในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (N,N-Dimethyl-formamide) 2.5 มิลลิลิตร เติม 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiamide 2.5 มิลลิกรัม ในน้ำ 2.5 มิลลิลิตร ปั่นนาน 20 นาที หลังจากนั้น เติมโบวาย ซีรัม อัลบูมิน 50 มิลลิกรัม ที่ละลายใน PBS 2.5 มิลลิลิตร เขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกสารที่ไม่ต้องการออกจากแอนติเจนที่เตรียมได้โดยผ่านเยื่อบางๆ (dialysis) ที่ไม่ให้สารน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 12,000 ผ่านใน 0.05 M$NaHCO_3$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง dialysed ต่อในน้ำกลั่นอีก 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization คำนวณการเกาะติด cholesterol-3-HS กับ BSA ตามวิธีการของ Erlanger *et al.* (1959) เท่ากับ 17.3:1

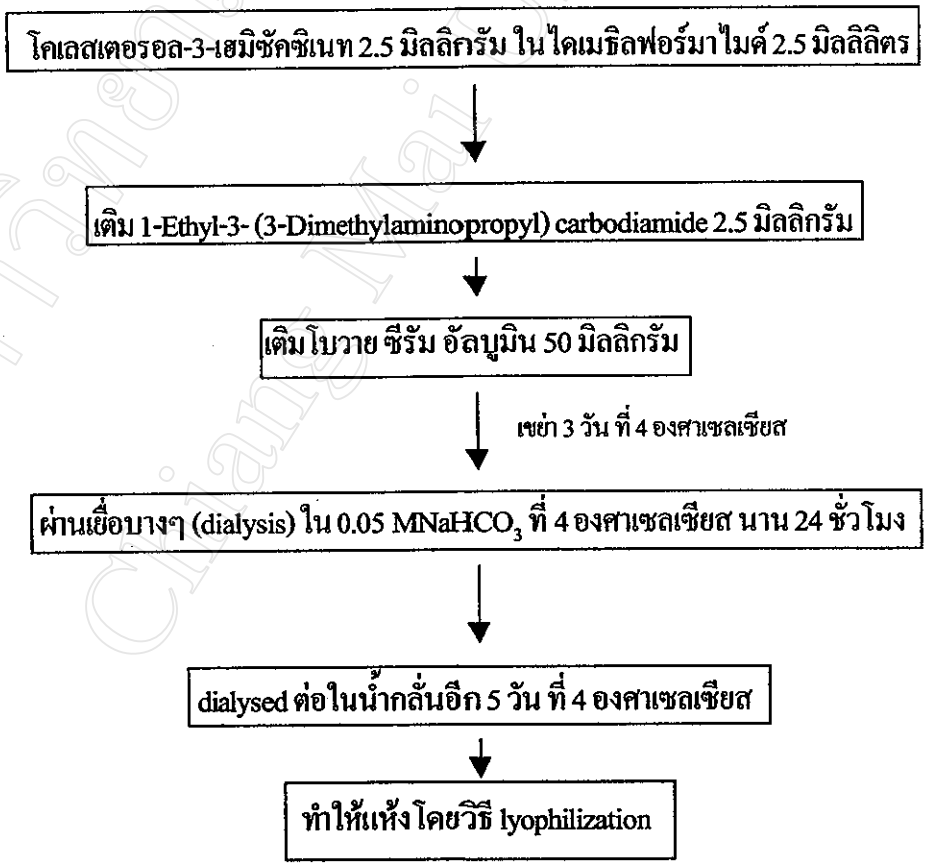


Figure 3-2. Diagram of conjugated cholesterol with bovine serum albumin (BSA).

3.4.2 การเตรียมไลโปโซม

เตรียมจากวิธีของ Roger *et al.* (1985) มีวิธีการโดยย่อดังนี้ ละลาย sphingomyelin 20 มิลลิกรัม และ โคเลสเตอรอล 8 มิลลิกรัม ที่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอีเทอร์ (ether) 3 มิลลิลิตร เขย่าสารทั้งหมดด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลาประมาณ 1 นาที นำสารที่ได้ทั้งหมดมาผสมกับ cholesterol-BSA 10 มิลลิกรัม นำส่วนผสมทั้งหมดตั้งในตะแกรงเหล็กซึ่งอยู่ในเครื่อง cavitator ultrasonic cleaner ที่มีน้ำอยู่พอประมาณ เปิดเครื่องให้มีคลื่นอัลตราซาวน์ (รูปที่ 3-8) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม osmium tetroxide (OsO_4) ที่ละลายใน balanced salt solution (BSS) (Appendix A-2) ความเข้มข้น 0.1 % เขย่าสารทั้งหมดด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลาประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารที่เตรียมได้ไปผ่านเยื่อ cellulose tubular membrane ด้วยน้ำ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เพื่อแยก cholesterol-BSA อิสระออก เก็บส่วนของไลโปโซมละลายใน BSS เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

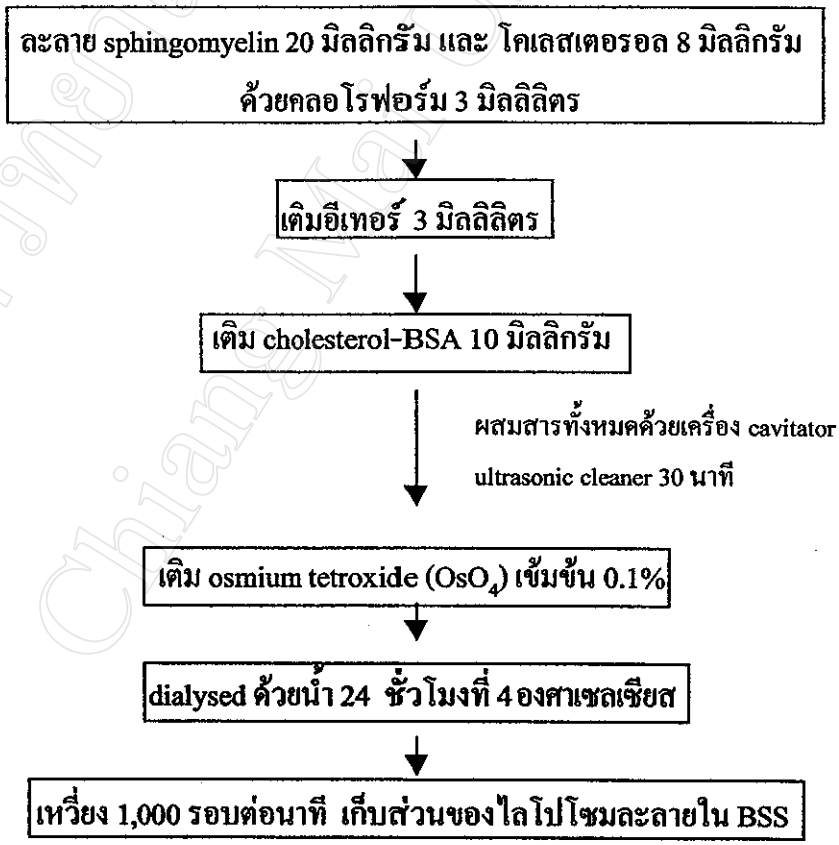


Figure 3-3. Diagram of preparation liposome.

3.5 การวัดภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอล

3.5.1 วิธีการเตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวไชเท้า (partial purified of Chinese Radish Peroxidase) ดัดแปลงจากวิธีของ Shannon *et al.* (1966) โดยนำหัวไชเท้าสดมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ นำมาปั่นกับสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในเครื่องปั่นติดใบมีด (blender) แล้วกรองเอาส่วนตะกอนออก เก็บของเหลวที่ได้ไปตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียม ซัลเฟต นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดของเหลวส่วนบนไปผ่าน Sephadex G-25 จากนั้นนำสารละลายที่ได้กรองผ่านผงเซลลูโลส (diethylaminoethyl-cellulose, DEAE-cellulose) ที่บรรจุอยู่ในหลอดแก้วทรงกระบอกกลวง ภายใต้แรงดันสูญญากาศ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A_{280}) เพื่อหาปริมาณโปรตีนและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 403 นาโนเมตร (A_{403}) เพื่อหาปริมาณฮีมที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส นำมาหาค่า Reinheitszahl (RZ) ค่า RZ หรือ Soret band เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า A_{403} และค่า A_{280} นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization ค่า RZ จะบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ยิ่งมีค่า RZ สูง แสดงว่ามีความบริสุทธิ์มาก ทำการวัด activity ของเอนไซม์โดยหยด สารละลายตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสี (Appendix A-8) ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส สังเกตสีและระยะเวลาที่สีของเอนไซม์เปลี่ยน หากเกิดสีเหลืองเข้ม ถือว่าเอนไซม์มี activity และ activity จะมากขึ้นหากสีเข้มขึ้น (Shannon *et al.*, 1966)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 38,000-42,000 ดาลตัน (เฉลี่ย 40,000 ดาลตัน) ประกอบด้วยหมู่ฮีม 1 หมู่ (Mw = 616.48) มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตร (A_{403}) และโปรตีน (Mw = 39,383.52) มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) (Shannon *et al.*, 1966) นำเอนไซม์ที่เตรียมได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A_{280}) เพื่อหาปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.727 และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 403 นาโนเมตร (A_{403}) เพื่อหาปริมาณฮีมที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 0.578 นำมาหาค่า Reinheitszahl (RZ) ค่า RZ หรือ Soret band เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า A_{403} และค่า A_{280} เท่ากับ 0.59/0.73 = 0.80 จากการคำนวณ (ตารางที่ 3) ในสารละลายมีฮีม 27.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ฮีมคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารละลายที่เตรียมได้ โดยเอนไซม์ CRP หนึ่งโมเลกุลประกอบด้วยฮีม 1 โมเลกุล ดังนั้น ฮีมมีความเข้มข้น 27.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 175.71 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร การวัด activity ของเอนไซม์พบว่า เมื่อหยดสับสเตรทเพื่อทำปฏิกิริยา พบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำอย่างรวดเร็ว แสดงว่า เอนไซม์ที่เตรียมได้มี activity สูง

Table 3. Calculation the CRP amounts of purified Chinese Radish extract

Molecular weight of CRP (Shannon et al., 1966)		40,000
Molecular weight of heme		616.48
Molecular weight of protein		39,383.52
Beer's Law (Erlanger *et al.*, 1957)	OD = ECl	
	0.149 = 5,500 x C x 1	
	$C = 2.710 \times 10^{-5}$	
Heme (μg/l)		27.1
Heme (mole) = protein (mole)	0.0000271/616.43	= Prot/39383.52
Protein (mg)		1.73
Heme (μmole/l)		0.439
Chinese Radish Peroxidase (μg/ml)		175.71

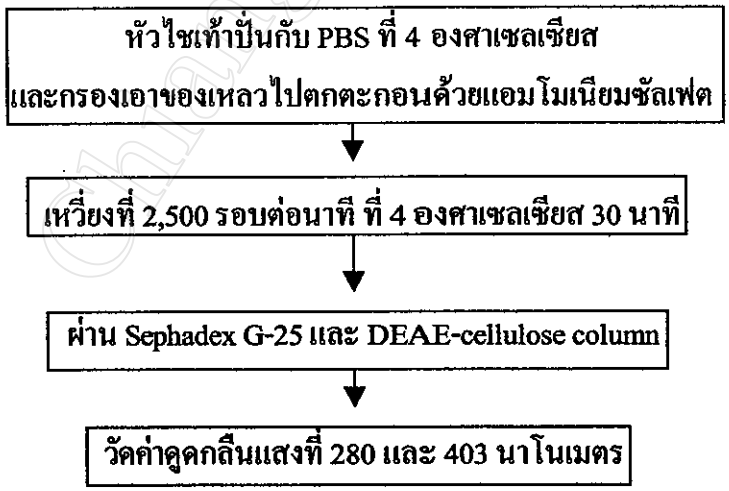


Figure 3-4. Diagram of preparation partial purified of Chinese Radish Peroxidase.

3.5.2 การสกัดอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) จากซีรัม

เตรียมจากวิธีของ Johnstone and Thorpe (1982) มีวิธีการโดยย่อดังนี้ อุ่นซีรัม 50 มิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส เติมโซเดียมซัลเฟตที่ละลายในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 18 % 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที นำไป incubate ที่ 25 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที 30 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนนำไปละลายในน้ำ ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร อุ่นสารละลาย ที่ 25 องศาเซลเซียส เติมโซเดียมซัลเฟตที่ละลายในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 14 % 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน incubate ที่ 25 องศาเซลเซียส 30 นาที นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที 30 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนนำไปละลายในน้ำอีกครั้ง ปรับปริมาตรเป็น 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผ่านเยื่อบางๆ (dialysis) ที่ไม่ให้สารน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 12,000 ผ่านใน PBS ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้กรองผ่านผงเซลลูโลส (diethylaminoethyl-cellulose, DEAE-cellulose) ที่บรรจุอยู่ในหลอดแก้วทรงกระบอกกลวง ภายใต้แรงดันสูญญากาศ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 (A_{260}) และ 280 (A_{280}) นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Johnstone and Thorpe (1982) protein concentration = $1.55A_{280} - 0.77A_{260}$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การเตรียม DEAE-cellulose โดยวิธีของ Johnstone and Thorpe (1982) มีวิธีการโดยย่อ คือ เติม DEAE-cellulose 100 มิลลิกรัม ลงใน PBS 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 15 นาที บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งสารละลายใสส่วนบนและเก็บตะกอน จากนั้น เติม PBS 500 มิลลิลิตร มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 15 นาทีนำไปเหวี่ยงและเก็บตะกอนเช่นเดียวกับครั้งแรก ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้น นำตะกอนไปบรรจุลงในหลอดแก้วทรงกระบอกกลวงขนาด 150 มิลลิลิตรโดยทำการบรรจุภายใต้แรงดันสุญญากาศ (รูปที่ 3-9)

3.5.3 การเตรียมเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับ IgG ของกระต่าย

ดัดแปลงจากวิธีของ Erlanger *et al.* (1959) โดยการเชื่อมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เตรียมจากหัวไชเท้า (partial purified of Chinese Radish Peroxidase, pCRP) ติดกับ IgG ของกระต่ายที่ต้านพลาสมาของนกกระทา ใช้ IgG 1.5 มิลลิกรัม เติมไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (N,N-Dimethyl-formamide) 0.27 มิลลิลิตร เติม 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiamide 4.50

มิลลิกรัม ในน้ำ 0.45 มิลลิลิตร ปั่นนาน 20 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 3.0 มิลลิกรัม เขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจากนั้นแยกสารที่ไม่ต้องการออกจากแอนติเจนที่เตรียมได้โดยผ่านเยื่อบางๆ (cellulose tubular membrane) ที่ไม่ให้สารน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 12,000 ผ่านใน 0.05 M $NaHCO_3$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง dialysed ต่อในน้ำกลั่นอีก 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

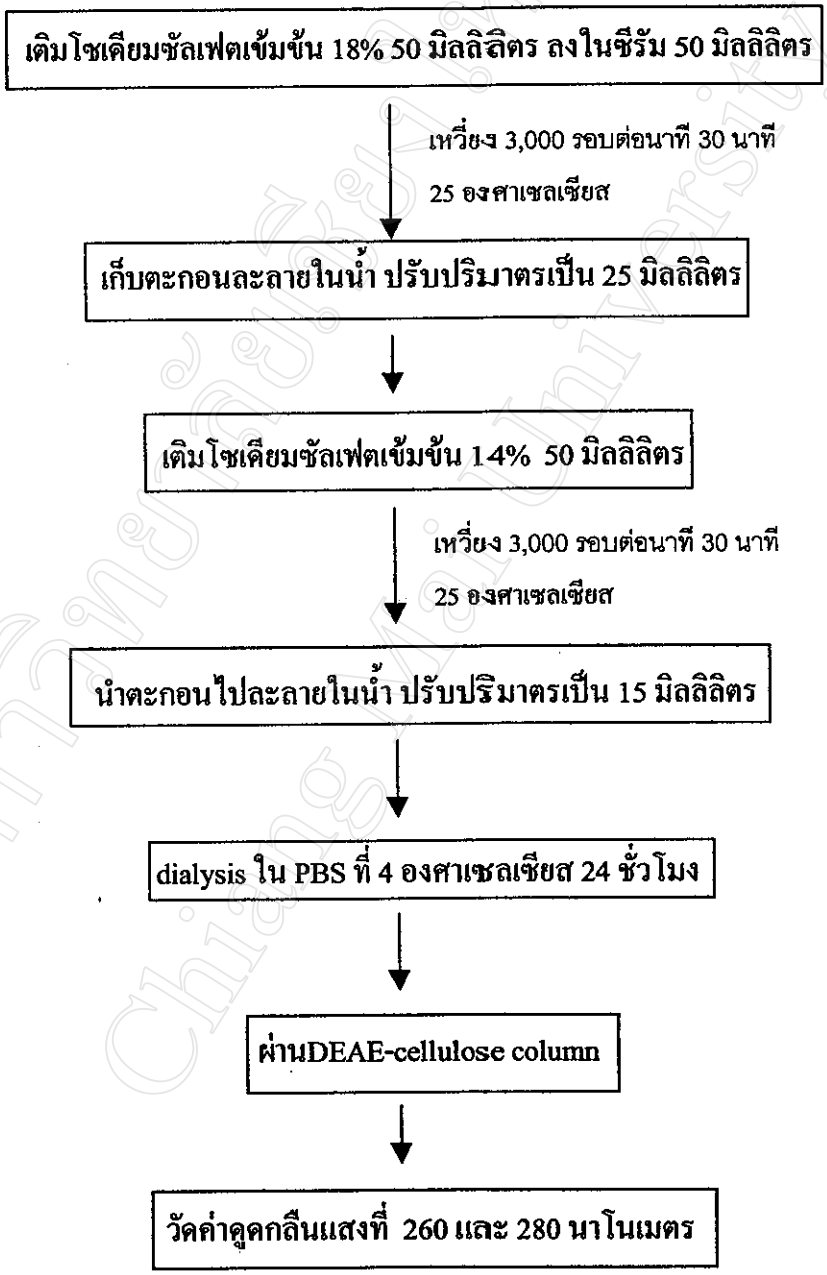


Figure 3-5. Diagram of isolation immunoglobulin G (IgG) from serum.

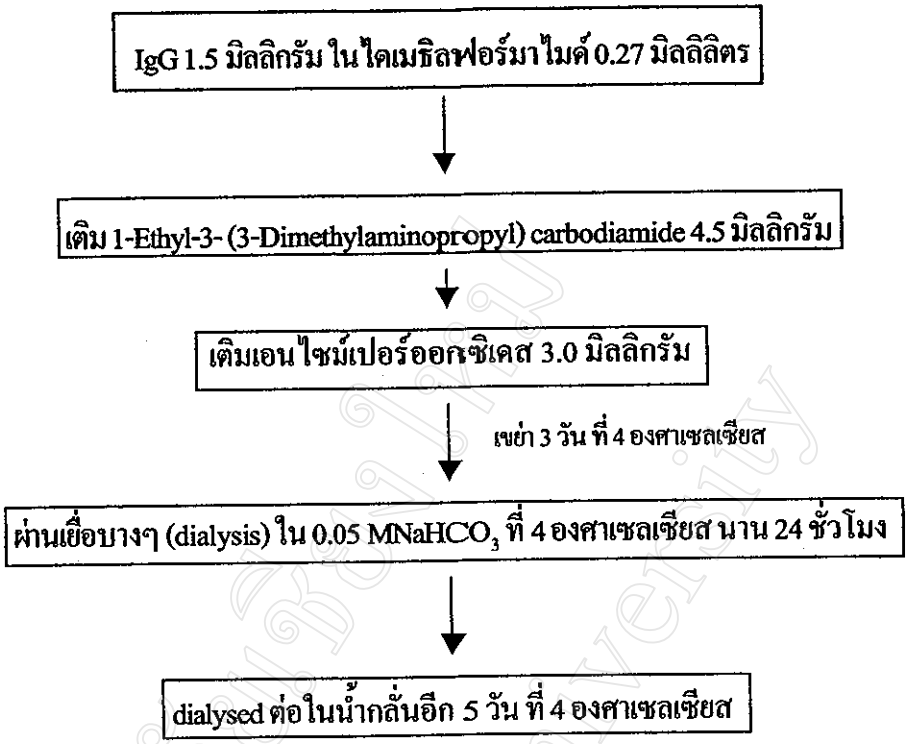


Figure 3-6. Diagram of conjugated immunoglobulin G (IgG) with Chinese Radish Peroxidase.

3.5.4 การหาปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์

การหาปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ (working titre) มีขั้นตอนดังนี้ เคลือบไมโครเพลทด้วยซีรัมของนกกระทาที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบ (Appendix A-3) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Appendix A-4) หลุมละ 150 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที 3 ครั้ง เติมเจลลาตินที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบเข้มข้น 1 % หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้างหลุมละ 150 ไมโครลิตร เขย่าไมโครเพลท เป็นเวลา 1 นาที 5 ครั้ง เติมเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับ IgG ของกระต่ายที่อัตราส่วนโมล 2:1, 20:1 และ 200:1 และนำมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเจือจาง 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000 และ 1:100,000 เติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้าง หลุมละ 150 ไมโครลิตร เขย่าไมโคร เพลท เป็นเวลา 1 นาที 3 ครั้ง เติมสารตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของ ELISA (Appendix A-8) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 4 MH_2SO_4 หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (A_{492}) ด้วยเครื่องอ่าน ELISA คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ โดยใช้โปรแกรม Auto Cad

R.13 (ศุภมิตร, 2539) (Appendix A-10) ปรากฏว่าที่อัตราส่วนโมลของเอนไซม์ต่อ IgG ของกระต่ายที่ต้านพลาสมาของนกกระทา 2:1, 20:1, 200:1 มีพื้นที่ใต้กราฟเป็น 1.32, 0.78, 0.21 หน่วยตามลำดับ จึงเลือกเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับ IgG กระต่ายที่ต้านพลาสมาของนกกระทาที่อัตราส่วน 2:1 มาเจือจางใน PBS โดยอัตราส่วนของเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับ IgG กระต่ายต่อ PBS เท่ากับ 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000 และ 1:100,000 ค่า working titre เท่ากับ 0.79, 0.35, 0.10, 0.08, 0.08 และ 0.08 ดังนั้น จึงเลือกใช้อัตราเจือจาง 1:1 ในการหาปริมาณแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในซีรัมของนกกระทาต่อไป

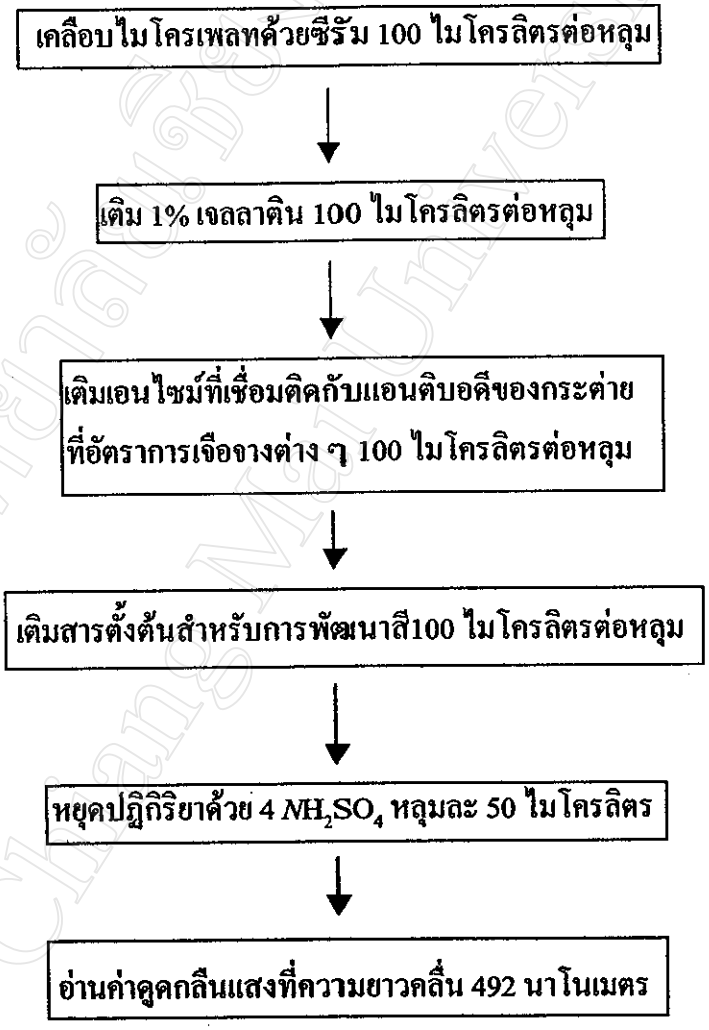


Figure 3-7. Diagram of working titre protocol.

3.5.5 การทำ Indirect Enzyme-link immunosorbent assay (ELISA)

เริ่มจากนำ ไมโครเพลทมาแบ่งเป็น 2 ด้าน คอลัมน์ที่ 1-6 เติมโคเลสเตอรอลที่เชื่อมกับโบวาย ซีรัม อัลบูมิน ที่ละลายในบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ส่วนคอลัมน์ที่ 7-12 เติม BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์แล้วนำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วยบัพเฟอร์สำหรับการล้าง (washing buffer) 150 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบใช้ dryer เป่าเพลทให้แห้ง เติม 1 % เจลลาติน ทุกหลุม ในปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ นำเข้าตู้อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วย บัพเฟอร์สำหรับการล้าง 150 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมตัวอย่างซีรัมที่ต้องการหาค่า ที่อัตราการเจือจางระหว่างซีรัมและ PBS ที่ 1:1, 1:10, 1:100, 1:1,000 1:10,000 และ 1:100,00O จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำเข้าตู้อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วยบัพเฟอร์สำหรับการล้าง 150 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม CRP-antiserum 10 ไมโครลิตรต่อหลุม (2:1) ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ นำเข้าตู้อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วยบัพเฟอร์สำหรับการล้าง 150 ไมโครลิตรต่อหลุม 5 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมสารตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของ ELISA 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ใช้ 4 MH_2SO_4 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อัตราการเจือจางระหว่างซีรัมและ PBS ที่ระดับต่าง ๆ มาเขียนกราฟ ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุดในแต่ละสัปดาห์จะถูกนำมาลบกับค่าการดูดกลืนแสงทุกค่าในสัปดาห์เดียวกัน เมื่อลบแล้ว พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงจะสูงสุดที่อัตราการเจือจางที่ 1:1,000 จึงเลือกค่าการดูดกลืนแสงที่อัตราเจือจาง 1:1,000 มาหาค่า percentage relative โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับโคเลสเตอรอลเชื่อมกับโบวาย ซีรัม อัลบูมิน (cholesterol-BSA) อย่างเดียว ที่สัปดาห์ต่าง ๆ มาปรับเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับ PBS ได้รับ cholesterol-BSA ร่วมกับซาโปนินที่ระดับ 50 และ 100 ไมโครกรัม และกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA ร่วมกับ ไลโปโซมที่ระดับ 1,400 และ 2,800 ไมโครกรัม มาเปรียบเทียบว่ามากหรือน้อยกว่า โดยคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง

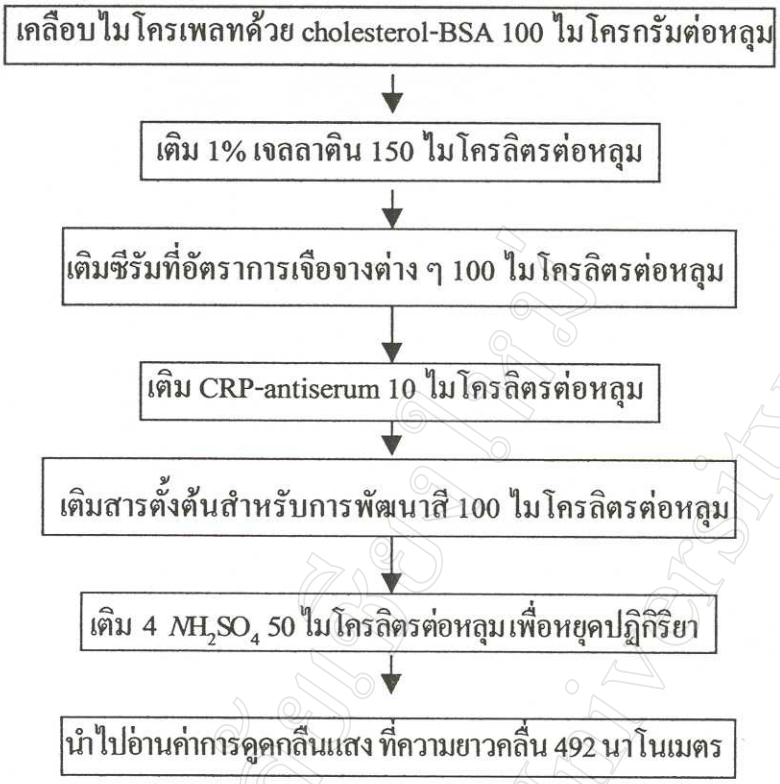


Figure 3-8. Diagrame of Indirect Enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) method.

Figure 3-9. Battery cages in experimental room at Faculty of Agriculture, Chiang Mai University.

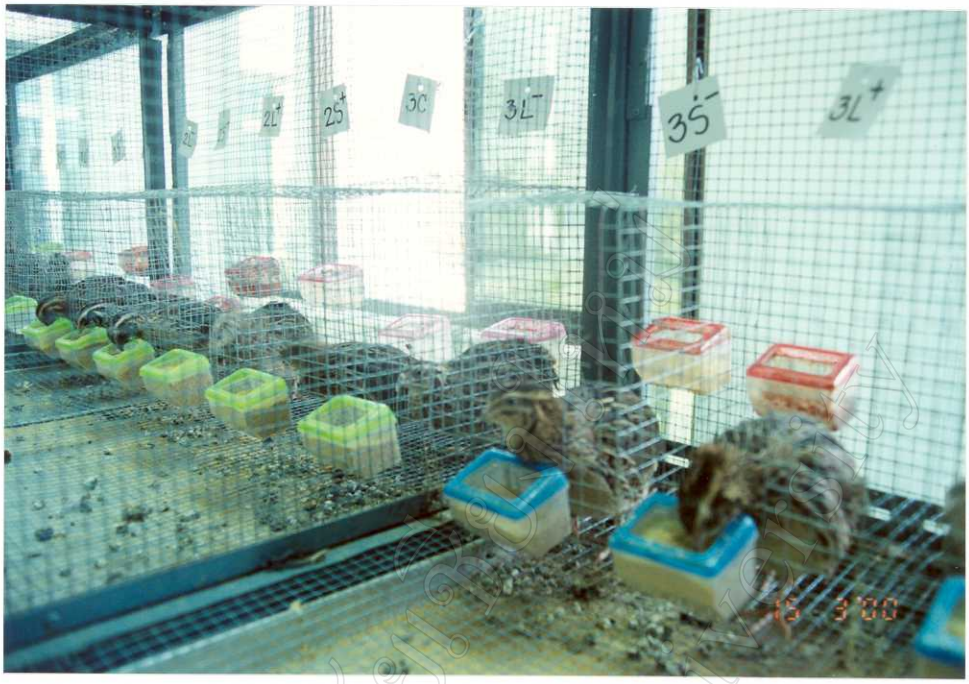


Figure 3-10. Battery cages with feeder.

Figure 3-11. Preparation of immunogen by homogenization technique using syringe and 3-way catheter.

Figure 3-12. Immunization of cholesterol-BSA with adjuvant at neck's subcutaneous injection.

Figure 3-13. Collect blood with no. 23 needle at wing vein.

Figure 3-14. Immunization of cholesterol-BSA with adjuvant by oral administration.

Figure 3-15. Preparation of liposome by cavitator ultrasonic.

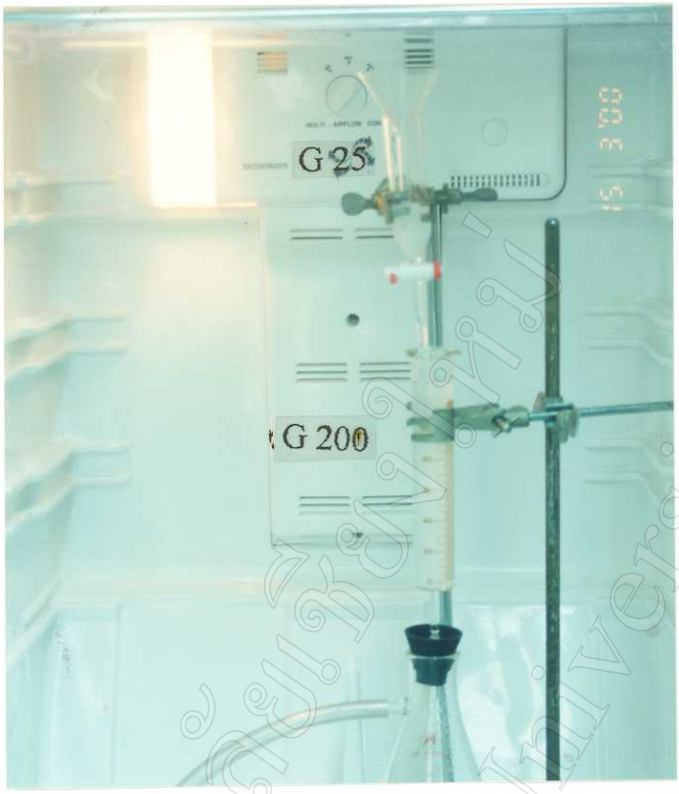


Figure 3-16. Gel filtration technique using Sephadex G-25 and G-200.

Figure 3-17. Ion exchange technique by Diethylaminoethyl-cellulose.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

3.6 การวัดปริมาณโคเลสเตอรอล

วิธีนี้ดัดแปลงจาก Zak (1957) สารเคมีที่ใช้ในการวัดประกอบด้วย: Ferric chloride stock reagent เตรียมจาก 840 มิลลิกรัมของ $FeCl_3.6H_2O$ ในกรดอะซิติดเข้มข้น 98 % 100 มิลลิลิตร; Ferric chloride precipitating reagent เตรียมโดยเจือจาง stock reagent: กรด อะซิติดเข้มข้นในอัตราส่วน 1:10; Ferric chloride blank and diluting reagent เจือจาง 8.5 มิลลิลิตรของ stock reagent ใน 100 มิลลิลิตรของ กรดอะซิติดเข้มข้น; Cholesterol stock standard ละลาย 100 มิลลิกรัม ของ pure dry cholesterol ในกรดอะซิติดเข้มข้น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และ Cholesterol working standard ปีเปต 1.0 มิลลิลิตร ของ stock standard และ 0.85 มิลลิลิตร ของ stock reagent แล้วเจือจางด้วยกรดอะซิติดเข้มข้น ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ควรใช้หลังจากเตรียมทันที

3.6.1 การหาปริมาณสารละลายมาตรฐานโคเลสเตอรอล

เจือจาง 0, 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร ของ working standard ด้วย 4 มิลลิลิตรของ ferric chloride blank and diluting reagent แล้วเติม 0.1 มิลลิลิตร ของ physiologic saline solution (Appendix A-1) เขย่าให้เข้ากัน ด้วย vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปีเปตสารละลายส่วนบน 3 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติมลงบน 2.0 มิลลิลิตรของ กรดซัลฟูริคเข้มข้น เขย่าให้เข้ากัน ด้วย vortex เป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร (A_{560})

3.6.2 การวัดปริมาณโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด

ปีเปต ซีรัม 0.1 มิลลิลิตร ลงใน ferric chloride precipitating reagent 4.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ด้วย vortex เป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ถึง 3 นาที หรือจนกว่าเห็นตะกอนชัดเจน ปีเปตสารละลายสีเหลืองใสส่วนบน 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 2.0 มิลลิลิตรของกรดซัลฟูริคเข้มข้น ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร (A_{560})

3.6.3 การวัดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดง

ดัดแปลงจากวิธีของ Abell *et al.* (1951) มีวิธีโดยย่อดังนี้ ละลายไข่แดง 100 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์สำหรับการเจือจาง 400 ไมโครลิตร จากนั้น เติม alcoholic-KOH (33%KOH 6 มิลลิลิตร:absolute alcohol 94 มิลลิลิตร) 5.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แอลกอฮอล์จะตกตะกอนสารประกอบโปรตีนโปแตสเซียมไฮดรอกซด์จะซาปอนนิไฟด์ (saponified) ไขมันและตกตะกอนในน้ำ นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส 55 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 10 มิลลิลิตรของ อีเทอร์ เพื่อละลายโคเลสเตอรอลออกมา และเติม 5 มิลลิลิตร ของน้ำกลั่น นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที 5 นาที แยกชั้นของอีเทอร์ออกจากชั้นน้ำ แล้วนำส่วนที่เป็นอีเทอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง เพื่อให้อีเทอร์ระเหยออก นำไปวัดหาปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธีของ Zak (1957)

3.7 การสกัดอิมมูโนโกลบูลิน วาย (IgY) จากไข่แดง

เตรียมจากวิธีของ Johnstone and Thorpe (1982) มีวิธีการโดยย่อดังนี้ ละลายไข่แดง 100 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่น 900 ไมโครลิตรใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 30 นาที นำสารละลายเหนือตะกอนมาเติมโซเดียมซัลเฟต (14 % w/v) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนนาน 24 ชั่วโมง เก็บตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำ และกรองผ่าน sephadex G-25 (รูปที่ 3-9) ที่บรรจุอยู่ในหลอดแก้วทรงกระบอกกลวง ภายใต้แรงดันสูญญากาศ เก็บเป็น fraction และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 (A_{260}) และ 280 (A_{280}) นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Johnstone and Thorpe (1982) protein concentration = 1.55 A_{280}-0.77 A_{260} มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

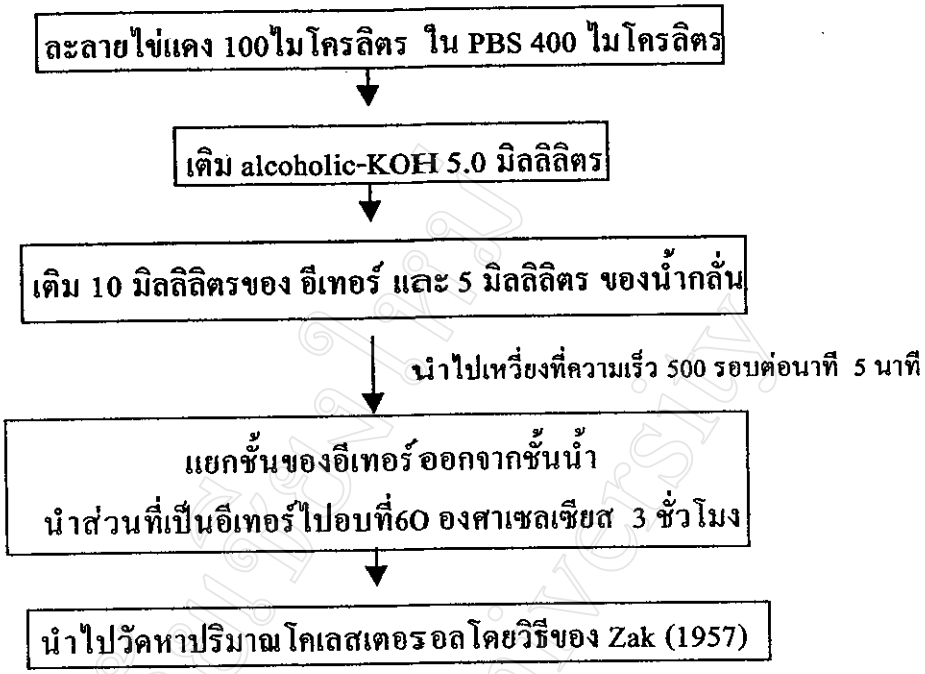


Figure 3-18. Diagram of isolation cholesterol from egg yolk.

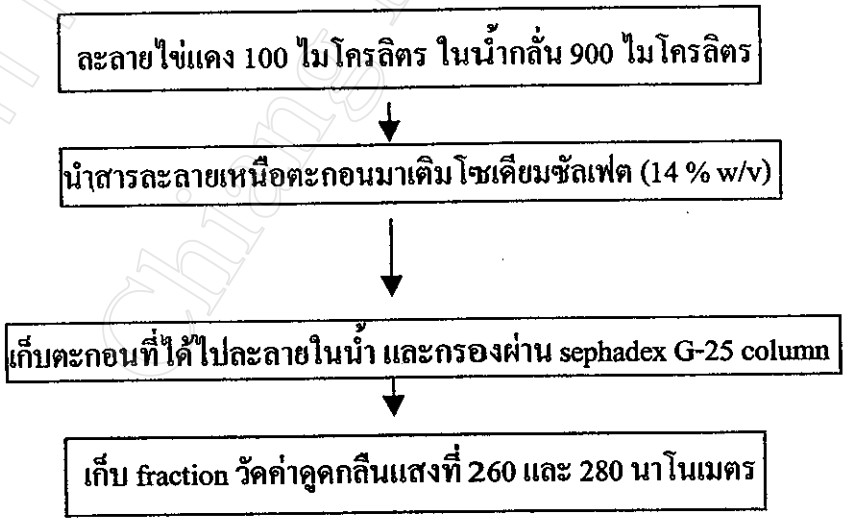


Figure 3-19. Diagram of isolation immunoglobulin Y (IgY) from egg yolk.