บทที่ 5 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. การขอรับการรับรองการวิจัย

คณะผู้วิจัยดำเนินการขอรับการรับรองการทำวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ตามแบบฟอร์มในเอกสารแนบหมายเลข 1

2. การจัดหาและจัดซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ สารเคมี และอุปกรณ์ต่างๆและการติดต่อประสานงาน

คณะผู้วิจัยได้จัดหาและจัดซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์ สารเคมี และอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็นสำหรับการวิจัย ได้ดำเนินการซื้อและขออนุมัติการนำเข้าสารพิษ Tetrodotoxin มาตรฐานจากต่างประเทศสองแหล่งคือจาก Sigma Chemical Co., MO, USA และ American Radiolabeled Chemicals Inc. (ARC), MO, USA ดำเนินการซื้อ HPLC columns (ZIC®-HILIC) จาก Merck KGaA, Darmstadt, Germany

ซื้อสาร Veratridine จาก Sigma Chemical Co. และ Ouabain จาก Wako Pure Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan สำหรับใช้เป็นสารเคมีที่ทำให้เกิด sodium influx เข้าสู่เซลล์ในปริมาณมากเป็นผลให้เซลล์บวมและตายในที่สุด ซื้อ keyhole limpet hemocyanin (KLH) และ bovine serum albumin (BSA) จาก Sigma Chemical Co. เพื่อใช้เตรียม tetrodotoxin-carrier conjugates ซื้อ neuroblastoma cells (Neuro-2a) ซื้อหนูทดลองสายพันธุ์ ICR (outbred) และอุปกรณ์ การเลี้ยงเช่น กรง ขวดน้ำ อาหาร วัสดุรองนอน ถุงมือ syringes (various sizes), needles (various gauges), masks, thermometer, instrument for minor surgery, first aids, etc.

ติดต่อขอความอนุเคราะห์ใช้เครื่อง HPLC ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และติดต่อขอเช่าเวลาใช้เครื่อง HPLC ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กิจกรรมการวิจัยของส่วนที่หนึ่ง: การผลิตโมเลกุล HuScFv ที่จำเพาะต่อ Tetrodotoxin

กิจกรรมข้อที่หนึ่ง: การเตรียม Tetrodotoxin (TTX) จากปลาปักเป้า เพื่อใช้ในการคัดเลือกฟาจที่มีความเฉพาะต่อ tetrodotoxin

จัดหาและซื้อปลาปักเป้าสายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถจับมาได้จากทะเลไทย โดยไปติดต่อชาวประมงในจังหวัดต่างๆ ทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามันเพื่อขอความช่วยเหลือในการจับปลาปักเป้าเป็นพิเศษ เนื่องจากปลาปักเป้าเป็นปลาที่ถูกห้ามจับมาจำหน่าย จึงต้องขอความช่วยเหลือเป็นกรณีพิเศษ มีการนัดหมายรับปลาจากแต่ละแห่ง จากนั้นได้ทำการ transport แบบถนอมไม่ให้ปลาเน่าเสียเข้ามาที่ห้องปฏิบัติการวิจัยที่คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในกรุงเทพฯ เพื่อ identified species ของปลาปักเป้า ก่อนทำการชำแหละแยกส่วนเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ

หลังจาก Identified species แล้ว ชั่งน้ำหนักปลาแต่ละตัว ก่อนนำไปชำแหละเพื่อแยกอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ ตับ ทางเดินอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ กล้ามเนื้อ และหนัง นำแต่ละส่วนไปชั่งน้ำหนัก แล้วสกัดเอาสารพิษ TTX ด้วยวิธีของ Diener *et al.* (2007) ดังนี้

ตัดอวัยวะ/เนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใช้ Ultraturax mixer (IKA Labortachnik, Staufen, Germany) บดย่อยอวัยวะ/เนื้อเยื่อแต่ละชนิด แต่ละตัวอย่าง แล้วเติม 0.1% acetic acid ลงไปในอัตราส่วนเท่ากัน (w/v) นำไปต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 × *g*, 5°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสเพื่อนำไปทดสอบว่ามีสารพิษ TTX หรือไม่ **(Diagram 1)**

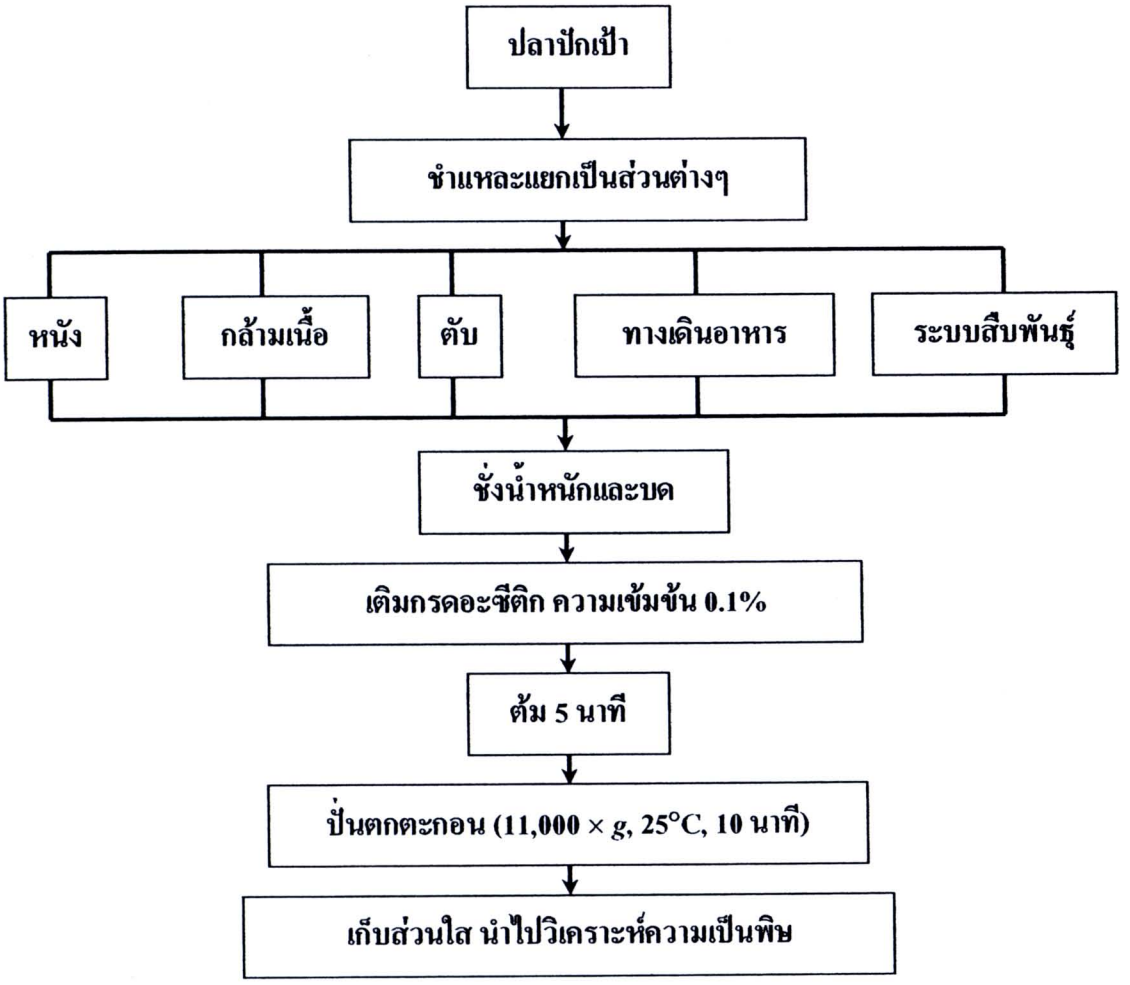

Diagram 1: แสดงขั้นตอนการสกัด Tetrodotoxin (TTX) จากอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้า

กิจกรรมข้อที่สอง: การตรวจความเป็นพิษ ของ Tetrodotoxin ที่สกัดได้ด้วยวิธี Mouse bio-assay และศึกษามวลโมเลกุลด้วย HPLC

2.1 การศึกษาการกระจายของ TTX ในอวัยวะ/เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้า

นำสารสกัดจากอวัยวะ/เนื้อเยื่อของปลาตัวอย่างละ 0.5 ml ไปฉีดเข้าช่องท้องของหนู ICR เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 20 กรัม แล้ว observed ว่าหนูตัวที่ได้รับสารสกัดจากเนื้อเยื่อใดของปลาตัวใดมีอาการของการได้รับพิษ และตายภายใน 30 นาที

คำนวณปริมาณสารพิษในเนื้อเยื่อเป็น Mouse lethal unit (MU) จากตารางความสัมพันธ์ระหว่างเวลาตายของหนูทดลองกับ mouse lethal unit (Kodama and Sato, 2005) โดย 1 MU คือปริมาณน้อยที่สุดของสารสกัดที่มี tetrodotoxin ที่ทำให้หนูทดลองตายภายใน 30 นาที แล้วนำข้อมูลนี้ไปใช้ในการศึกษาความสามารถในการลบล้างพิษ tetrodotoxin ของ HuScFv ที่จะผลิตต่อไป

2.2 การศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างโมเลกุลของ TTX มาตรฐาน (sTTX) และ TTX ที่สกัดจากปลาปักเป้าจากทะเลไทย (pTTX) ด้วยวิธี HPLC และ LC-MS/MS

ก. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากปลาปักเป้า (pTTX) ด้วยวิธีที่ 1

ได้นำสารที่สกัดจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาปักเป้าไปทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1:10 ด้วย 0.03 M acetic acid แล้วนำไปกรองผ่าน 0.4 μm filter membrane จากนั้นนำสารสกัดที่กรองแล้วไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS ต่อไปตามวิธีการของ (Diener *et al.*, 2007)

ข. การวิเคราะห์ sTTX และ pTTX ที่สกัดด้วยวิธีที่ 1

เครื่อง LC-MS/MS เครื่อง HPLC ที่คณะผู้วิจัยใช้สำหรับวิเคราะห์ sTTX และ pTTX ที่สกัดจากปลาปักเป้าที่เตรียมตัวอย่างโดยวิธีที่ 1 นี้ เป็นเครื่องมือของหน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้แก่เครื่อง LC: Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA), MS: Esquire HCT triple-quadrupole mass spectrometer ESI source (Bruker Daltonics)

คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ ZIC-HILIC (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ขนาด 150 × 2.1 mm

การวิเคราะห์ ทำในรูปแบบของ Gradient analysis โดย eluents ที่ใช้ได้แก่ 10 mM ammonium formate และ 10 mM formic acid ในน้ำ (eluent A) และ 80% acetonitrile และ 20% ของน้ำโดยมี 5 mM ammonium formate และ 2 mM formic acid ผสมอยู่ (eluent B)

Flow rate ที่ใช้คือ 0.25 ml/min

Gradient program ที่ใช้มีดังนี้:

เวลา (นาที)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0.0	0	100
0.1	35	65
7.0	35	65
10.0	0	100
30.0	0	100

Condition ในการทำ Tandem mass spectrometry (MS/MS) มีดังต่อไปนี้

Mode		**Tune SPS**	
Mass Range Mode	Std/Enhanced	Target Mass	310 *m/z*
Ion polarity	Positive	Compound Stability	100%
Ion source type	ESI	Trap Drive Level	100%
Alternating Ion Polarity	Off	Optimize	Normal
Current Alternating Ion Pol	Positive	Smart Parameter Setting	Active
Divert Valve	To source		

Tune Source		**Trap**	
Trap Drive	37.6	Rolling	Off
Octopole RF Amplitude	154.7 Vpp	Scan Begin	140 *m/z*
Lens 2	−60.0 V	Scan End	350 *m/z*
Capillary Exit	114.3 V	Averages	5 Spectra
Dry Temp. (Set)	350°C	Max. Accu Time	50,000 µs
Nebulizer (Set)	30.00 psi	Smart ICC Target	50,000
Dry Gas (Set)	8.00 l/min	Charge control	On
HV Capillary	2,500 V		
HV End Plate Offset	−500 V		

Abbreviations: Accu, accumulation; ESI, electrospray ionization; l, liter; *m/z*, mass to charge ration; min, minute(s); psi, Pounds/square inch; µs, micro-seconds; V, Volt(s); Vpp, peak-to-peak Voltage

ค. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากปลาปักเป้าด้วยวิธีที่ 2

เตรียมสารสกัดจากปลาปักเป้าด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Kono *et al.* (2008) โดยใช้ activated charcoal ในการช่วย concentrated สารพิษ โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างดังต่อไปนี้

นำสารสกัดปลาปักเป้าที่เจือจางไว้แล้วจากการเตรียมตัวอย่างในวิธีที่ 1 ข้างต้น (เหลือจากเจือจางไว้สำหรับการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีที่ 1) ไปขจัดไขมันออก (defatted) ด้วย ethyl acetate โดยผสมตัวอย่างกับ ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนมีการแยกชั้น จากนั้นดูดของเหลวชั้นบนที่เป็นชั้นของ ethyl acetate ที่มีไขมันละลายอยู่ออกทิ้งไป แล้วนำของเหลวส่วนล่างไปผสมกับ 50% activated charcoal ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำในปริมาตรที่เท่ากัน จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 × *g* เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นผงถ่านที่ตกที่ก้นหลอดนำไปล้างด้วยน้ำ โดยเขย่ากับน้ำที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วเก็บผงถ่านไปสกัดเอาสารพิษด้วยสารละลายกรดอะซีติก : เมธานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 1 : 20 : 79 (v/v/v) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่งแล้ว เก็บส่วนที่เป็นของเหลวไปทดสอบหาสารพิษ TTX ต่อไป

ง. การวิเคราะห์ sTTX และ pTTX ที่สกัดจากปลาปักเป้าด้วยวิธีที่ 2

เครื่อง HPLC / LC-MS ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมโดยวิธีที่ 2 เป็นเครื่องของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้แก่เครื่อง LC: DGU-12AM degasser, LC-10AD liquid chromatography, SCL-10A system controller (Shimadzu, Duisburg, Germany) MS: LC-MS-2010 single quadrupole mass spectrometer ESI source (Shimadzu, Duisburg, Germany) การที่ต้องปลี่ยนเครื่องก็เพราะเครื่องที่คณะวิทยาศาสตร์ไม่ว่าง

คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ ZIC-HILIC (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 150 × 2.1 mm แบบเดิม

การวิเคราะห์ เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ในรูปแบบของ Gradient analysis แบบเดิมโดย eluents ที่ใช้ได้แก่ 10 mM ammonium formate และ 10 mM formic acid ในน้ำ (eluent A) และ 80% acetonitrile และ 20% ของน้ำโดยมี 5 mM ammonium formate และ 2 mM formic acid ผสมอยู่ (eluent B) **แต่ไม่สามารถตรวจพบสารพิษมาตรฐานได้ จึงได้เปลี่ยนเป็นรูปแบบของการวิเคราะห์เป็น Isocratic analysis ตามวิธีของ Wang *et al.*, (2008) คือใช้ 5 mM ammonium formate และ 5 mM formic acid ในน้ำเป็น eluent A และใช้ 5 mM ammonium formate และ 5 mM formic acid ใน 90% acetronitrile เป็น eluent B** โดยตั้งค่า flow rate ไว้ที่ 0.2 ml/min และตั้งค่าการ elute เอาสารออกโดยใช้ 30% ของ eluent A ส่วนที่เหลือเป็น eluent B

กิจกรรมข้อที่สาม: การคัดเลือกฟาจที่จำเพาะต่อ TTX และการเพิ่มปริมาณการผลิตฟาจ

3.1 การเตรียม human antibody phage display library

Human antibody phage display library ที่ใช้ในการวิจัยนี้สร้างมาจาก ทุก families ของ human VH และ VL gene repertoires ของทุก immunoglobulin classes และ subclasses โดยได้ genes มาจาก B lymphocytes ของ blood donors สัญชาติไทย จำนวน 60 คน human antibody phage display library นี้เป็น human antibody phage display library ที่ใหญ่และมี epitope diversity หลากหลายที่สุดในขณะนี้ ใน library ประกอบด้วย filamentous M13 phages ที่ display human single chain antibody fragments (HuScFv) อยู่บนผิวของฟาจแต่ละอนุภาค โดย HuScFv linked อยู่กับ PIII protein ที่เป็น phage ligands สำหรับจับกับ F pili ของ *E. coli* bacteria ในรูปแบบของ fusion protein คือ HuScFv-PIII รวมทั้งมี gene segment ที่ encode HuScFv นั้นๆ (*huscfv*) อยู่ใน phage genome ด้วย ฟาจแต่ละอนุภาคมี HuScFv display อยู่ไม่เกิน 3 molecules เพื่อเหลือ free PIII ไว้ประมาณ 2-3 โมเลกุลเป็นอย่างน้อยเพื่อให้ทำหน้าที่จับกับ F pili เมื่อฟาจจะ transfect เข้าไปเพิ่มจำนวนใน *E. coli* โดย phages ใน library นี้มี antibody diversity 2.6×10^8 และ phagemids เก็บอยู่ใน TG1 *E. coli* host เมื่อนำ TG1 *E. coli* ไป propagate โดย co-transfected *E. coli* host ด้วย helper phages (phage rescue process) ก็จะได้ mature phage particles ที่มีจำนวน phage particles ประมาณ 1×10^{12} โดยร้อยละ 85 ของ phage particles มี *huscfv* gene segments ที่ encode HuScFv ที่มี epitope diversity หลากหลายดังกล่าวแล้ว และ มีฟาจประมาณ 50 particles ที่มีความเฉพาะต่อ epitope เดียวกัน (Kulkeaw *et al.*, 2009)

คณะผู้วิจัยได้นำ Human antibody phage display library ที่สร้างไว้แล้วในห้องปฏิบัติการไป infect TG1 *E. coli* และทำ phage rescue ให้ได้ complete phage particles โดยการ co-infected *E. coli* ด้วย helper phages หลังจากนั้นปั่นเอา *E. coli* cells ออกทิ้งไป นำ supernatant ที่มี complete phage particles ไปตกตะกอนด้วย polyethylene glycol เพื่อให้ได้ตะกอนของ complete phage particles ที่ displayed HuScFv ในสภาพ fusion protein กับ phage coat protein ชนิด PIII และมี *huscfv* อยู่ใน phage genome ด้วย (ได้ human antibody phage library)

3.2 การใช้ sTTX เป็นแอนติเจนใน bio-panning

3.2.1 การ conjugate sTTX กับ keyhole limpet hemocyanin (KLH) เพื่อใช้เป็น bio-panning antigen

เนื่องจาก sTTX เป็น highly hydrophilic molecule ดังนั้น sTTX ซึ่งเป็น purified TTX (ไม่มีโปรตีนปนเปื้อน) จึงไม่ค่อยจับกับผิวพลาสติกใน ELISA plate และหลุดออกได้ง่าย รวมทั้ง TTX เป็น hapten ซึ่งแต่ละโมเลกุลมี B cell epitope เพียง epitope เดียว คณะผู้วิจัยจึงต้องใช้ sTTX-keyhole limpet hemocyanin (KLH) conjugate เป็นแอนติเจนใน bio-panning โดยได้เตรียม sTTX-KLH conjugate ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

ผสมสารพิษ sTTX ปริมาณ 300 µg ใน 1 ml sodium acetate buffer (1 M, pH 7.4) เติม KLH (53 mg/ml) ปริมาตร 80 µl และ 37% formaldehyde ปริมาตร 60 µl เพื่อเป็น coupling agent ลงไปในสารละลาย sTTX นำของผสมไปเขย่าที่ 37°C เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วนำไป dialyzed ใน PBS ที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ sTTX-KLH conjugate

3.2.2 การ immobilize แอนติเจน (sTTX-KLH)

นำ sTTX-KLH conjugate (10 µg/ml of coating buffer; *i.e.*, PBS, pH 7.4) ปริมาตร 100 µl ไปใส่ในหลุมของ ELISA plate (Costar, USA) แล้วนำ plate ไป incubated ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้าง sTTX-KLH conjugate coated wells ด้วย PBS สามครั้ง แล้วเติม blocking buffer (3% BSA ใน PBS) ปริมาตร 150 µl ลงไปในแต่ละหลุมที่ coated ไว้ด้วย sTTX-KLH conjugate นำ plate ไปเก็บที่ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูด blocking buffer ออกให้หมดแล้วล้าง wells ด้วย PBS สามครั้ง

3.2.3 การทำ phage bio-panning โดยใช้ sTTX-KLH เป็น panning antigen (Hoogenboom *et al.*, 1992; Akamatsu *et al.*, 1993; Griffith *et al.*, 1994; Barbas *et al.*, 2001; Kulkeaw *et al.*, 2009)

นำ suspension ของ HuScFv phage display library ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 ปริมาตร 100 µl ไปเติมลงใน sTTX-KLH conjugate coated-wells แต่ละ well ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2 นำ plate ไป incubated ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว ดูดของเหลวออกจาก well ให้หมดทุก well ล้าง wells ด้วย PBS สิบครั้ง แล้วล้างด้วย PBS-Tween-20 (PBS-T) อีกสิบครั้งเพื่อกำจัด unbound phages ออกให้หมด จากนั้นเติม log phase culture ของ competent non-suppressor HB2151 *E. coli* ปริมาตร 100 µl ลงใน wells ที่ล้างเอา unbound phages ออกหมดแล้วทุก well เก็บ plate ที่ 25°C เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วเก็บ *E. coli* ออกจาก wells นำ aliquot ประมาณ 50 µl ไป spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด LB-AG agar plate เพื่อทำการคัดเลือก HB2151 *E. coli* clones ที่ถูก infected ด้วย phages ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ เก็บ plate ไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ข้ามคืนจนเห็น *E. coli* colonies ซึ่งก็คือ phagemid-transformed *E. coli* colonies ส่วน phagemid transformed *E. coli* preparation ที่เหลือจากการ spread ลงบน LB-AG agar plate นำไปเก็บเป็น glycerol stock ไว้ที่ −70°C

3.2.4 การตรวจกรองหา phagemid-transformed *E. coli* ที่มี *huscfv* insert

การตรวจหา Phagemid-transformed *E. coli* clones ที่มี *huscfv* sequence ใน phagemid vector ทำโดยใช้ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ *huscfv* จาก transformed *E. coli* cells โดยตรง

HB2151 *E. coli* clones ที่ถูก infected ด้วย phages จะสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนบน LB-AG ซึ่งเป็น selective agar plate ได้ ในขั้นตอนนี้ *huscfv* sequence ที่ inserted อยู่ใน

genome ของ phagemid vector จะถูก amplified โดยตรงจากแบคทีเรียที่ harvested จาก colonies บน LB-AG plate โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อส่วนของ phagemid vector ที่อยู่ทาง 5′-end ของ *Sfi*I restriction site (*R1*) และทาง 3′-end ของ *Not*I restriction site (*R2*) ซึ่ง PCR product เมื่อรวมกับ *huscfv* จะมีขนาดประมาณ 1,000 base pairs (bp)

เตรียม DNA template จาก colony แต่ละ colony ของ *E. coli* บน selective agar plate โดยใช้ปลาย pipette tip เขี่ย colony แล้วนำแบคทีเรียไป suspended ใน ultrapure distilled water จากนั้นนำไปผสมกับ PCR reaction mixture ที่เตรียมไว้ดังตารางข้างล่างนี้แล้วนำไป amplify โดย PCR condition ตามที่แสดงไว้ในตารางถัดไป

แบคทีเรียส่วนที่เหลือใน Colony แต่ละ colony นำไปเตรียม replica plate โดย spread บน LB-AG agar

PCR reaction mixture (12.5 µl)

Ingredient	**Volume (µl)**	**Final concentration**
Sterile ultrapure distilled water (UDW)	7.4	-
PCR buffer (10×)	1.25	1x
$MgCl_2$ (25 mM)	0.75	1.5 mM
dNTP (2.5 mM each)	1.0	0.2 mM
Primer *R1* (10 µM)	0.5	0.4 µM
Primer *R2* (10 µM)	0.5	0.4 µM
DNA template	1.0	-
DNA polymerase (5 units/µl)	0.1	0.5 unit

PCR thermal cycle

First denaturation	at 94°C for 5 minutes
35 cycles of Denaturation,	at 94°C for 1 minute
Annealing	at 55°C for 2 minutes
and Extension	at 72°C for 2 minutes
Final extension	at 72°C for 10 minutes

หลังจาก Amplified แล้วนำ PCR amplicons ไปวิเคราะห์โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis และ ethidium bromide staining เพื่อดูว่ามี amplicons ของ *huscfv* ที่ขนาด ~1,000 bp หรือไม่

3.2.5 การตรวจหา *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* ที่สามารถสร้าง HuScFv ได้

HB2151 *E. coli* clones ที่ carried *huscfv*-phagemid vector จากข้อ 3.2.4 ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ว่าสามารถสร้างโมเลกุล HuScFv ได้หรือไม่ โดยมีขั้นตอนดังนี้

การเตรียม Lysates จาก *huscfv*-phagemid transformed-HB2151 *E. coli*

1. ทำการ picked single colonies ของ *huscfv*-phagemid transformed-HB2151 *E. coli* บน replica plate แต่ละ colonies ใส่ลงใน LB-AG broth ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง
2. เติม overnight culture จากข้อ (1) ปริมาตร 100 µl ลงใน LB-A broth ปริมาตร 10 ml และนำไปเพาะเลี้ยงแบบเดิมเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง
3. เติม 1 mM IPTG ปริมาตร 10 µl ลงใน bacterial culture แต่ละหลอด แล้วเลี้ยงเชื้อแบบเดิมเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง
4. ปั่นเก็บ bacterial cells ที่ 3,500 × *g* ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 20 นาที
5. ทำการ resuspended bacterial cells ใน PBS
6. นำ *E. coli* suspension ไปทำให้แตกด้วยวิธี sonication แล้วนำ homogenate ที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 × *g* ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนจากแต่ละหลอดเก็บไว้เป็น ***E. coli* whole cell lysates**

การวิเคราะห์หา HuScFv ใน *E. coli* whole cell lysates ด้วยวิธี Western blot analysis

1. แยกโปรตีนใน lysates ของ *E. coli* แต่ละ preparations ด้วย 12% SDS-PAGE ย้ายแถบโปรตีนจาก SDS-PAGE gel ไปไว้บน nitrocellulose membrane (NC) แล้ว blocked unoccupied sites บน NC ด้วย 1% BSA จากนั้นล้างเอา excess BSA ออก
2. Incubated โปรตีนบน NC กับ 1:3,000 diluted mouse anti-E-tag monoclonal antibody (primary antibody ต่อ E-tagged-HuScFv) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง
3. หลังจากนั้นล้าง excess mouse anti-E-tag monoclonal antibody บน NC ออกด้วย 0.05% Tween-20 ใน PBS, pH 7.4 (PBST) แล้ว incubated NC ใน 1:3,000 diluted goat anti-mouse immunoglobulins ที่ถูกติดฉลากด้วย alkaline phosphatase (AP) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง
4. ล้าง excess goat anti-mouse immunoglobulins-AP บน NC ออกด้วย PBST จากนั้น incubated NC ใน 0.15 M Tris pH 9.6 เป็นระยะเวลา 15 นาที

คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

5. ใส่ substrate ของ AP คือ freshly prepared working solution ของ commercial BCIP/NBT (KPL, USA)] ลงใน tray ที่มี NC แล้วเก็บ tray ไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที
6. หยุดปฏิกิริยาของ AP และ substrate โดยการล้าง NC หลายๆ ครั้งด้วยน้ำกลั่น
7. อ่านผลโดยสังเกตว่ามีแถบสีปรากฏตรงบริเวณ ~25-35 kDa หรือไม่ โดยแถบสีที่ปรากฏอาจเป็น single band, doublet หรือ multiple bands ก็ได้ ซึ่งเมื่อมีแถบสีปรากฏก็แสดงว่า transformed *E. coli* ที่ carry *huscfv* clone นั้นๆ สามารถผลิต HuScFv ได้

3.2.6 การตรวจความสามารถของ HuScFv ที่ expressed จาก *huscfv*-positive *E. coli* clones ใน การจับกับ sTTX ด้วยวิธี indirect ELISA

คณะผู้วิจัยได้ใช้ whole cell lysates จาก *huscfv*-positive *E. coli* clones ที่สามารถ expressed HuScFv ได้ มาตรวจสอบความสามารถของ HuScFv จากแต่ละ clone ในการจับกับ sTTX โดยแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบคือ sTTX จาก American Radiolabeled Chemicals Inc. (ARC), MO, USA) ที่ conjugated กับ bovine serum albumin (BSA) (sTTX-BSA conjugate) การใช้ sTTX-BSA แทน sTTX-KLH ก็เพื่อไม่ให้ HuScFv ที่มีความเฉพาะต่อ KLH ทำให้เกิดผลบวกของ indirect ELISA

การเตรียม sTTX-BSA conjugate

เตรียม TTX-BSA conjugate ตามวิธีการของ Zhou *et al.* (2009) โดยผสม sTTX ปริมาณ 100 µg (จาก stock sTTX 1 mg/ml) กับ 0.8 mg BSA ใน PBS จากนั้นเติม 37% formaldehyde 15 µl แล้วนำของผสมไปเขย่าที่ 25°C เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไป dialyze ใน PBS ที่ 4°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

นอกจากนี้ยังได้เตรียม BSA-BSA conjugate เพื่อเป็น antigen control สำหรับตัด background ที่เกิดจาก non-specific binding ของโปรตีนใน *huscfv*-phagemid transformed-HB2151 *E. coli* lysates กับ BSA โดยการเตรียม BSA-BSA conjugate ด้วยวิธีเดียวกันกับการเตรียม sTTX-BSA conjugate แต่ใส่ acetate buffer, pH 5.0 แทน sTTX

Standard TTX-BSA และ BSA-BSA conjugates ที่เตรียมได้ถูกนำไปตรวจสอบว่ามีการ conjugate จริงโดยการแยกสารที่เตรียมได้ใน 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ภายใต้สภาวะ native (non-denaturing) condition แล้วย้อม separarted-proteins ด้วยสีย้อมโปรตีน Coomasie Brilliant Blue G-250

การ Immobilize แอนติเจน (sTTX-BSA) ใน ELISA wells (การ coat plate)

การ Coat ด้วยวิธีที่ 1:

นำ sTTX-BSA conjugate (8 μg/ml of coating buffer, *i.e.*, phosphate buffered saline solution, pH 7.4; PBS) ปริมาตร 100 μl ไปใส่ในหลุมของ ELISA plate (Costar, USA) หลุม antigen control ใช้ BSA-BSA conjugate เป็น coating antigen แล้วนำ plate ไปเก็บที่ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้าง conjugate coated wells ด้วย PBS สามครั้ง แล้วเติม blocking buffer (1% BSA ใน PBS) ปริมาตร 150 μl ลงไปในแต่ละหลุมที่ coated ไว้ด้วย sTTX-BSA และ BSA-BSA conjugates นำ plate ไปบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูด blocking buffer ออกให้หมดแล้วล้าง wells ด้วย PBS สามครั้ง

การทำ Indirect ELISA

วัดปริมาณโปรตีนของ *huscfv*-positive *E. coli* whole cell lysate แต่ละ clone ด้วยวิธี Bradford (1976) เพื่อ titrate ปริมาณโปรตีนใน lysate ของแต่ละ clone ให้เท่ากัน แล้วเติม 100 μl ของโปรตีนแต่ละ preparation ลงในแต่ละหลุมของ ELISA plate ที่ coated ด้วย sTTX-BSA conjugate และ BSA-BSA conjugate นอกจากนี้ยังเพิ่มหลุม negative antibody control คือหลุมที่ coated ไว้ด้วย sTTX-BSA conjugate แล้วเติม lysate original HB2151 *E. coli* ลงไป จากนั้นนำไป incubated ใน moist chamber ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้าง excess proteins ในแต่ละหลุมออกด้วย PBST ปริมาตร 250 μl ทำการล้างซ้ำอีก 3 ครั้ง จากนั้นเติม 1:3,000 diluted mouse anti-E tag monoclonal antibody (Amersham Biosciences, USA) หลุมละ 100 μl แล้วนำไป incubated เช่นเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง excess mouse anti-E-tag monoclonal antibody ออกด้วย PBST แล้วเติม 1:3,000 diluted goat anti-mouse immunoglobulins-horse radish peroxidasse (HRP) (Southern Biotech, USA) ลงไป 100 μl ทุกหลุม นำ plate ไป incubated เช่นเดิม เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง excess goat anti-mouse immunoglobulins-HRP ในแต่ละหลุมออกด้วย PBST จากนั้นเติม substrate ของ HRP คือ commercially available ABTS® (KPL) แล้วเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25°C, 30 นาที อ่านผล optical density ของ content ของแต่ละหลุม ที่ absorbance 405 nm (A_{405nm}) ด้วย ELISA reader และกำหนดว่าผลบวก ELISA คือ OD ที่ 405 nm มากกว่า negative antibody control และมากกว่า BSA-BSA control อย่างน้อย 1.5 เท่า

3.3 การใช้ TTX ที่สกัดได้จากปลาปักเป้าที่จับจากทะเลไทย (pTTX) เป็นแอนติเจนใน bio-panning

นอกจากการใช้ sTTX-KLH เป็น bio-panning antigen แล้ว คณะผู้วิจัยยังทำ การคัดเลือก *huscfv*-positive phage clones จาก human antibody phage display library โดยใช้ TTX จากปลา

ปักเป้าที่จับจากทะเลไทย (pTTX) เป็น bio-panning antigen ด้วย ซึ่งรายละเอียดของการวิจัยมีดังต่อไปนี้

3.3.1 การเตรียม pTTX เพื่อใช้เป็น แอนติเจน สำหรับ coat plate เพื่อทำ bio-panning

เนื่องจากคณะผู้วิจัยพบว่า pTTX จากปลาปักเป้าไทยเหมือนกัน ไม่ว่าจะเป็นจากปลาปักเป้าสายพันธุ์ใด และจับมาจากอ่าวไทยหรือทะเลอันดามัน จึงได้นำ pTTX ที่สกัดจากตับของปลาปักเป้าสายพันธุ์ *Lagocephalus lunaris* มาทำให้เจือจาง 1:4 ด้วย 0.1% acetic acid จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง pore size 0.45 μm แล้วนำไปผ่าน SPE C_{18} cartridges (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) ที่ถูก equilibrated ไว้แล้วด้วย methanol และ sterile deionized distilled water การนำไปผ่าน SPE C_{18} cartridges นี้ก็เพื่อกำจัดโปรตีนบางส่วนและไขมันออก เก็บสารสกัดจากปลาที่ผ่านออกมาจาก SPE C_{18} cartridges (Horie *et al.*, 2002) เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนใน phage bio-panning ต่อไป

เตรียม Control (subtractive) antigen คือ เนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าสายพันธุ์เดียวกันแต่ไม่พบความเป็นพิษเมื่อทดสอบด้วยวิธี mouse bioassay ที่จับมาได้พร้อมกันกับตัวที่มีพิษ โดยใช้ control (subtractive) antigen นี้สำหรับ remove phage clones ที่ display HuScFv ที่จับกับเนื้อเยื่อปกติของปลาปักเป้าออกไปจากคลังฟาจ ก่อนนำคลังฟาจ (subtractive phage library) ไปใช้ในการทำ bio-panning กับ TTX ที่สกัดจากตับของปลาปักเป้า (pTTX)

3.3.2 การ immobilize แอนติเจน (pTTX)

ทำการปรับปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าที่มีพิษคือ pTTX preparation (test antigen) และสารสกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าที่ไม่มีพิษ (control antigen) ที่ผ่าน SPE C_{18} cartridges แล้วให้เท่ากัน (20 μg/ml) จากนั้นนำ test และ control antigens แต่ละ preparations ไปใส่ในหลุมของ ELISA plate (Costar, USA) ปริมาตร 100 μl/หลุม แล้วนำ plate ไป incubated ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้าง coated wells ด้วย PBS สามครั้ง แล้วเติม blocking buffer (3% BSA ใน PBS) ปริมาตร 150 μl ลงไปในแต่ละหลุมที่ coated ไว้ นำ plate ไปเก็บที่ 25°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูด blocking buffer ออกให้หมดแล้วล้าง wells ด้วย PBS สามครั้ง

3.3.3 การทำ subtractive bio-panning ด้วยสารสกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าที่ตรวจไม่พบสารพิษ (control หรือ subtractive antigen)

นำ suspension ของ HuScFv phage display library จากข้อ 3.1 ปริมาตร 100 μl ไปเติมลงในหลุมที่ coated ด้วยสารสกัดของเนื้อเยื่อตับของปลาปักเป้าสายพันธุ์ *Lagocephalus lunaris* ที่ตรวจไม่พบสารพิษ ด้วยวิธี mouse bioassay (control/subtractive antigen) ตามที่เตรียมไว้ในข้อ (3.3.2) นำ plate ไป incubated ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว ดูดเก็บ phages ที่

ไม่จับกับ control/subtractive antigen เพื่อนำไปทำ bio-panning กับ สารสกัดของเนื้อเยื่อตับของปลาสายพันธุ์ *Lagocephalus lunaris* ที่มีสารพิษ tetrodotoxin (test antigen) ต่อไป

3.3.4 การทำ bio-panning ต่อ test antigen (สารสกัดของเนื้อเยื่อตับของปลาสายพันธุ์ *Lagocephalus lunaris* ที่มีสารพิษ หรือ pTTX)

นำ phages ที่ผ่านการทำ subtractive bio-panning กับสารสกัดจากเนื้อเยื่อตับของปลาที่ตรวจไม่พบสารพิษ (control/subtractive antigen) จากข้อ (3.3.3) เติมลงในหลุมที่ coated ไว้ด้วยสารสกัดจากเนื้อเยื่อตับของ *Lagocephalus lunaris* ที่มีสารพิษ tetrodotoxin (test antigen) ที่เตรียมไว้ข้างต้น ในข้อ (3.3.2) นำ plate ไป incubated ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วดูดของเหลวออกจาก wells ให้หมดทุก wells ล้าง wells ด้วย PBS สิบครั้ง แล้วล้างด้วย PBS-Tween-20 (PBST) อีกสิบครั้งเพื่อกำจัด unbound phages ออกให้หมด จากนั้นเติม log phase culture ของ competent non-suppressor HB2151 *E. coli* ปริมาตร 100 µl ลงใน wells ที่ล้างเอา unbound phages ออกหมดแล้วทุก wells นำ plate ไปเก็บที่ 37°C เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วเก็บ *E. coli* ออกจาก wells นำ aliquot ประมาณ 50 µl ไป spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด LB-AG agar plate เพื่อทำการคัดเลือก phagemid-transformed HB2151 *E. coli* clones ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ เก็บ plate ไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ข้ามคืนจนเห็น *E. coli* colonies ซึ่งก็คือ phagemid-transformed *E. coli* colonies ส่วน *E. coli* preparation ที่เหลือจากการ spread ลงบน LB-AG agar plate นำไปเก็บเป็น glycerol stock ไว้ที่ −70°C

3.3.5 การตรวจกรองหา phagemid-transformed-HB2151 *E. coli* ที่มี *huscfv* insert

การตรวจกรองหา Phagemid-transformed-HB2151 *E. coli* ที่มี *huscfv* insert ใช้วิธี PCR เช่นเดียวกับการตรวจกรองหา *huscfv*-positive phagemid transformed *E. coli* ที่ได้มาจากการทำ bio-panning ด้วย standard TTX ที่กล่าวมาแล้วในข้อ (3.2.4)

3.3.6 การตรวจหา *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* ที่สามารถสร้าง HuScFv ได้

ทำการตรวจด้วย Western blot analysis เช่นเดียวกับการตรวจหา *huscfv*-phagemid transformed- HB2151 *E. coli* ที่ได้มาจากการทำ bio-panning ด้วย sTTX ที่กล่าวมาแล้วในข้อ (3.2.5)

3.3.7 การตรวจความสามารถของ HuScFv ที่ expressed จาก *huscfv*-positive *E. coli* clones ใน การจับกับ pTTX ของปลาปักเป้าที่จับจากทะเลไทยด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการตรวจเช่นเดียวกับการตรวจความสามารถของ HuScFv ที่ expressed จาก *huscfv*-positive *E. coli* clones ที่จับกับ sTTX (ข้อ 3.2.6)

3.4 การศึกษา Restriction fragment length polymporphism (RFLP) ของ DNA sequences ที่เป็นรหัสของแอนติบอดีของมนุษย์ (*huscfv*) เพื่อดูความหลากหลายของแอนติบอดี

นำ *huscfv*-positive *E. coli* clones จากการทำ bio-panning กับ sTTx และ pTTX ไปทำ PCR เพื่อ amplified *huscfv* sequence ของแต่ละ clone ดังวิธีในข้อ 3.2.4 แล้วนำ PCR product ที่ได้จากแต่ละ clone ไปตัดย่อยด้วย *Mva*I restriction enzyme (Fermentas, Lituania) การเตรียม reaction mixture ในการตัด *huscfv* sequence ได้ทำโดยผสม reaction mixture คือ *Mva*I restriction enzyme 1 µl, nuclease-free water 34 µl และ PCR product 10 µl เข้าด้วยกัน หลังจากที่บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้ว นำ product ที่ได้จากการตัดไปตรวจสอบ RFLP ของ DNA fragments ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ 12% polyacrylamide TBE gel

กิจกรรมข้อที่สี่: การผลิตและเตรียมโมเลกุล HuScFv ที่จับจำเพาะกับ tetrodotoxin ให้บริสุทธิ์จาก *huscfv*-phagemid transformed HB2151 *E. coli* แต่ละ clones

4.1 การย้าย *huscfv* จาก phagemid เข้าสู่ pET23b$^+$ และ transformed เข้าสู่ BL21 (DE23) *E. coli*

เนื่องจากมีความจำเป็นต้องผลิต HuScFv ที่จับจำเพาะกับ TTX ให้ได้บริสุทธิ์และมีปริมาณมากพอ จึงได้ทำการย้าย *huscfv* จาก *huscfv*-phagemid transformed *E. coli* ที่สนใจเข้าสู่ plasmid vector คือ pET23b$^+$ ซึ่งมี restriction sites ของ *SfiI* และ *NotI* จากนั้นนำ *huscfv*-pET23b$^+$ vector เข้าสู่ BL21 (DE3) *E. coli* ตามวิธีของ Poungpair *et al.* (2009)

4.2 การ purify HuScFv โดยใช้ Ni-NTA resin ใน denaturing condition

คณะผู้วิจัยได้นำ *huscfv*-pET23b$^+$transformed-BL21 (DE3) *E. coli* ไป inoculated ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด LB broth ปริมาตร 200 ml ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ (ampicillin, 100 μg/ml) แล้วนำไป incubated ที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm จนได้ OD ที่ A_{600nm} ประมาณ 0.4-0.5 จึงทำการเติม IPTG เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.05 mM จากนั้น ทำการ incubated พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อ *E. coli* โดยนำ culture ไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 × *g*, 4°C เป็นเวลา 20 นาที ดูดน้ำใสทิ้ง และเติม lysis buffer ลงใน bacterial pellet ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 12,000 × *g* เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ที่มี denatured HuScFv preparation ไว้ นำ denatured HuScFv preparation ไป purified เอา HuScFv โดยใช้ Ni-NTA resin (Qiagen, Germany) โดยทำตาม instruction manual จากนั้นนำไปทำ refolding ด้วย PBS ให้ความเข้มข้นของยูเรียลดลงเหลือประมาณ 2 M ก่อนนำไปประเมินประสิทธิภาพการลบล้างพิษ tetrodotoxin ต่อไปในกิจกรรมส่วนที่สองของการวิจัย

กิจกรรมการวิจัยของส่วนที่สอง:
การประเมินคุณสมบัติของ HuScFv จาก phagemid transformed *E. coli* ในการลบล้างพิษของ tetrodotoxin

กิจกรรมข้อที่ห้า: การทดสอบคุณสมบัติและความสามารถของ HuScFv จาก phagemid-transformed *E. coli* ในการลบล้างความเป็นพิษ ของ TTX

5.1 ความสามารถของ HuScFv จาก transformed *E. coli* ในการลบล้างความเป็นพิษของ TTX จากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell based assay)

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษาการลบล้างความเป็นพิษของ Tetrodotoxin โดย HuScFv คือ mouse neuroblastoma (Neuro-2a)

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีทดสอบด้วยการดัดแปลงวิธีการของ Kogure และคณะ (1988) และวิธีของ Gallacher และ Birkbeck (1992) ในการตรวจสอบสารพิษที่สามารถปิดกั้น sodium channel ได้ โดยมีหลักการคือใช้สารเคมีสองชนิดที่กระตุ้นให้เกิดการ influx ของ sodium ion เข้าสู่เซลล์ ได้แก่ veratridine และ ouabain สารทั้งสองชนิดนี้จะเสริมฤทธิ์กันในการนำ sodium ion เข้าสู่เซลล์ เมื่อ sodium ion เข้าสู่เซลล์ในปริมาณมากจะส่งผลต่อแรงดัน osmotic ของเซลล์เพิ่มขึ้นมาก ทำให้เซลล์บวม และตายในที่สุด แต่เมื่อมีสารพิษ tetrodotoxin ซึ่งมีฤทธิ์ปิดกั้น sodium channel อยู่ร่วมกับ veratridine และ ouabain ด้วย จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการนำ sodium ion เข้าสู่เซลล์โดย veratridine และ ouabain ทำให้ยับยั้งการบวมและการตายของเซลล์ได้

สำหรับการศึกษาการลบล้างความเป็นพิษของ Tetrodotoxin ด้วย HuScFv ที่ผลิตมาจากการคัดเลือก HuScFv display phage clones ด้วย phage display library นั้น มีหลักการคือถ้าหาก HuScFv สามารถจับและลบล้างความเป็นพิษของ tetrodotoxin ได้จะส่งผลให้เซลล์ที่ exposed ต่อ TTX + veratridine + ouabain บวมและตายเนื่องจากฤทธิ์ของ veratridine และ ouabain ที่ไม่มี tetrodotoxin มาขัดขวาง

วิธีการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การเตรียมสารต่างๆ

เตรียม stock solution ของ veratridine (Sigma, MO, USA) โดยละลาย veratridine 7 mg ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, MO, USA) 1 ml จะได้ stock veratridine solution ที่มีความเข้มข้น 10 mM จากนั้นเตรียม 0.2 mM veratridine เพื่อใช้ในการทดลองลบล้างความเป็นพิษ โดยนำ stock veratridine solution ผสมลงใน minimum essential medium (MEM) (Gibco, NY, USA) และเตรียม DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% เพื่อใช้แทน veratridine ในกลุ่มควบคุม

เตรียม stock solution ของ ouabain (Wako, Japan)โดยละลาย ouabain 6 mg ใน sterile water 1 ml จะได้ stock ouabain solution ที่มีความเข้มข้น 8.23 mM จากนั้นเตรียม 0.4 mM ouabain เพื่อใช้ในการทดลองลบล้างความเป็นพิษ โดยนำ stock ouabain solution ผสมลงใน MEM และเตรียมสารละลายเพื่อใช้แทน ouabain ในกลุ่มควบคุม โดยใช้น้ำผสมลงใน medium แทน stock ouabain solution โดย medium จะถูกทำให้เจือจางลงเหลือ 95.14%

เตรียม pTTX จากสารสกัดจากเนื้อเยื่อปลาปักเป้าโดยใช้ SPE C_{18} cartridges (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) เช่นเดียวกับการเตรียมแอนติเจนเพื่อ coat plate ในข้อ 3.3.1 จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของ pTTX ที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยคำนวณกลับจาก mouse lethal units (MU) per gram of tissue ของตัวอย่างนั้นๆ โดยที่ 1 MU มีความเข้มข้นของ pTTX ~ 0.2 µg จากนั้นเจือจาง pTTX ด้วย MEM ให้มีความเข้มข้นของ pTTX สุดท้ายเท่ากับ 400 nM และใช้สารละลาย 0.001% acetic acid ใน medium แทน pTTX ในกลุ่มควบคุม

HuScFv ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น purified HuScFv ที่อยู่ใน PBS ที่มีความเข้มข้นของยูเรีย 2 M เนื่องจาก 2M urea มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงเจือจาง purified HuScFv ลงครึ่งหนึ่งด้วย MEM แล้วนำ purified HuScFv ที่เจือจางแล้วนี้ไปใช้ในการทดลองลบล้างความเป็นพิษของ tetrodotoxin ต่อไป

วิธีการทดลองมีดังนี้

ก. นำเซลล์ mouse neuroblastoma (CLS, Eppelheim, Germany) ไปเลี้ยงใน MEM ที่มี penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) (Gibco, NY, USA), 10% fetal bovine serum (Gibco, NY, USA) และ 1.0 mM sodium pyruvate (Sigma, MO, USA) ให้มี confluent growth ที่เหมาะสม จากนั้น subpassage เซลล์ (1×10^5 cells/ml) ลงใน 96 well cell culture cluster (Corning, NY, USA) หลุมละ 200 µl (2×10^4 cells) หลังจาก 24 ชั่วโมงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกให้หมดแล้วเติม 100 µl ของผสมของยูเรีย 1 M ใน 50% cell culture medium กับ 0.001% acetic acid ใน medium ที่ผสมไว้ล่วงหน้าเป็นเวลา 30 นาทีลงในหลุมทุกหลุม จากนั้นเติม 0.05 mM veratridine (V) และ 1.0 mM ouabain (O) อย่างละ 50 µl ลงในเซลล์ทุกหลุมทดสอบ (a = cells + V + O) ส่วนเซลล์ในหลุมที่จะใช้เป็นหลุมควบคุมในการทดลองนี้เติม DMSO เข้มข้น 4% ปริมาตร 50 µl แทน veratridine และ medium ที่ถูกเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้น 95.14% ปริมาตร 50 µl แทน ouabain (b = cells + diluents of V และ diluent of O) จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจหาจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยการย้อมด้วยสี neutral red (40 µg/ml ของ neutral red ใน Hank's balance salt solution) หลุมละ 100 µl โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะติดสี หลังจากเติมสีลงไปในเซลล์แล้วนำเซลล์ไปบ่มเป็นระยะเวลา 30 นาที เมื่อบ่มจนครบเวลาแล้วล้างสี neutral red ในแต่ละหลุมออกสองครั้งด้วย Hank's balance salt solution ปริมาตรครั้งละ 200 µl จากนั้นทำการสกัดสี neutral red ออกจากเซลล์เพื่อนำไปวัด OD ที่ absorbance 540 nm (A_{540nm}) โดยเติมสารละลาย 1%

acetic acid ใน 50% ethanol ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุมที่มีเซลล์ที่ย้อมด้วย neutral red นำ plate ไปเก็บเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำ content ของทุกหลุมไปอ่านค่า OD ที่ A_{540nm}

คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิตจากค่า OD ที่ A_{540nm} ในกลุ่มที่เติม veratridine และ ouabain (a = cells + V + O) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (b = cells + diluents of V และ diluent of O) ซึ่ง (a) จะต้องมี OD น้อยกว่า (b) มาก เนื่องจากเซลล์ส่วนใหญ่ใน (a) จะตายเพราะ osmotic lysis จากการที่ veratridine และ ouabain นำ sodium ions เข้าเซลล์เป็นจำนวนมาก ส่วนเซลล์ของ (b) จะมีตายบ้างและใช้เป็น background cell death

ข. ในส่วนของการปิดกั้น Sodium ion channel ของ tetrodotoxin เพื่อ rescue เซลล์จากพิษของ veratridine และ ouabain นั้น ทำการทดลองโดยผสมยูเรีย 1 M ใน 50% cell culture medium กับ pTTX ที่มีความเข้มข้น 400 nM ในปริมาตรที่เท่ากัน เก็บของผสมไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมออกให้หมด แล้วเติมของผสมดังกล่าวข้างต้นปริมาตร 100 µl (200 nM of TTX) ลงในเซลล์แต่ละหลุม จากนั้นเติม 0.05 mM veratridine และ 1.0 mM ouabain ปริมาตรอย่างละ 50 µl ลงไป (c = cells + TTX + V + O) นำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจหาเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยการย้อมด้วยสีย้อมเซลล์ neutral red และวัด OD ที่ A_{540nm} เช่นเดียวกับข้อ ก.

ค่า OD ที่วัดได้จะถูกนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปกป้องเซลล์ของ tetrodotoxin ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การปกป้องเซลล์ของ Tetrodotoxin จากพิษของ veratridine และ ouabain

$= (c-a) / (b-a) \times 100$

a, ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ veratridine และ ouabain จากข้อ ก.

b, background cell death จากข้อ ก.

c, ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ pTTX ก่อนเติม veratridine และ ouabain ลงไป

ค. ในส่วนของการศึกษาประสิทธิภาพของ HuScFv ในการลบล้างความเป็นพิษของ tetrodotoxin มีดังนี้ ทำ purified HuScFv (50 µg/ml) จาก transformed *E. coli* clone นำ HuScFv ปริมาตร 100 µl ไปผสมกับ pTTX ความเข้มข้น 400 nM ปริมาตร 100 µl เก็บไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมของผสม (HuScFv กับ pTTX) ปริมาตร 100 µl ลงในเซลล์แต่ละหลุม หลังจากนั้นเติม 0.05 mM veratridine และ 1.0 mM ouabain ปริมาตร อย่างละ 50 µl ลงไป (d = HuScFv + TTX + V + O) หลุมควบคุมคือหลุมที่ cells ได้รับ TTX ที่ incubated กับ irrelevant HuScFv ก่อนได้รับ veratridine และ ouabain (e = HuScFv + TTX + V + O) นำเซลล์ไปบ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจหาจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยการย้อมด้วยสี neutral red และวัด OD ที่ A_{540nm} เช่นเดียวกับข้อ ก.

ค่า OD ที่วัดได้จะถูกนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ HuScFv ในการยับยั้ง (neutralize) Tetrodotoxin ไม่ให้ปกป้องเซลล์จากพิษของ veratridine และ ouabain ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ HuScFv ในการยับยั้ง Tetrodotoxin ไม่ให้ปกป้องเซลล์จากพิษของ veratridine และ ouabain (HuScFv สามารถ neutralize TTX ได้) = 100–[(c–a) × (d–a) ÷(c × (e–a)] × 100

a, ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ veratridine และ ouabain จากข้อ ก. (maximum cell death)

c, ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ pTTX, veratridine และ ouabain ในข้อ ข. (cell rescued by TTX)

d, ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ HuScFv, pTTX, veratridine และ ouabain ในข้อ ค. (high cell death because the TTX was inhibited by HuScFv)

e, ค่า OD ที่ A_{540nm} ของเซลล์ที่บ่มกับ irrelevant HuScFv, pTTX, veratridine และ ouabain ในข้อ ค. (cells could still be rescued by the TTX because the TTX was not inhibited by the irrelevant HuScFv)

HuScFv จาก transformed *E. coli* clone ที่ให้ผลดี ในการลบล้างความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกนำไปใช้ศึกษาความสามารถในการลบล้างพิษในหนูทดลองต่อไป

5.2 ความสามารถของ HuScFv จาก *huscfv*-phagemid transformed *E. coli* ในการลบล้างความเป็นพิษของ TTX จากการทดสอบในหนูทดลอง (HuScFv mediated-TTX neutralization in mice)

5.2.1 วิธีมาตรฐาน คือ incubate HuScFv/PBS control กับ TTX ก่อนนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนูทดลอง

หนูไมซ์ ICR เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 20 กรัม จะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว คือ

กลุ่มทดสอบ: หนูแต่ละตัวได้รับของผสมระหว่าง TTX ในปริมาณสารพิษ 1 mouse lethal unit (1 MU) ผสมกับโมเลกุล HuScFv ในอัตราส่วนต่างๆ หลังจาก incubated ของผสม HuScFv + TTX ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้ว นำไปฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูแต่ละตัว แล้วนับจำนวนหนูที่รอดชีวิตในแต่ละกลุ่มเมื่อหนูในกลุ่มควบคุมลบตายหมด

กลุ่มควบคุมลบ (Negative control): หนูแต่ละตัวถูกฉีดด้วย TTX (1 MU) ที่ incubated กับ PBS เข้าทางช่องท้อง ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรที่ฉีดหนูกลุ่มทดสอบ จับเวลาที่หนูกลุ่มนี้ตาย (หนูกลุ่มนี้ควรตายหมด) เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ได้รับ TTX ที่ incubated กับ HuScFv

5.2.2 วิธีเลียนแบบการได้รับพิษก่อนแล้วจึงได้รับการรักษา

กลุ่มทดสอบ: หนูแต่ละตัวได้รับ 1.5 MU หรือ 0.3 μg TTX ฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากนั้นฉีด HuScFv เข้าช่องท้อง

กลุ่มควบคุมลบ (Negative control): หนูแต่ละตัวได้รับ 1.5 MU หรือ 0.3 μg TTX ฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากนั้นได้รับการฉีด PBS เข้าช่องท้อง

เปรียบเทียบเวลาการตายของหนูทั้งสองกลุ่ม