บทที่ 4
ผลการทดลอง

การเตรียมโปรตีนฮีโมไซยานินจากเลือดปู

จากการเตรียมโปรตีนเลือดปู วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) ได้เท่ากับ 0.1319 (รูปที่ 4-1) ในขณะที่สารละลายโปรตีนที่ใช้เป็นมาตรฐานคือ BSA ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 68,000 ดาลตัน (Abbas *et al.*, 1994) ที่ความเข้มข้นของ BSA 1 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร วัดค่า A_{280} ได้เท่ากับ 0.7 โดยใช้น้ำกลั่นเป็นค่าปรับศูนย์ (blank) ฉะนั้น สารละลายที่เตรียมได้จากเลือดปูมีโปรตีนเท่ากับ 0.1319/0.7 หรือ 0.188 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนจากเลือดปูมีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า 12,000 ดาลตันและไม่สามารถผ่านเยื่อบางได้ (dialysis membrane) มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ (colloid) สีดำเข้ม ตกตะกอนได้ง่าย

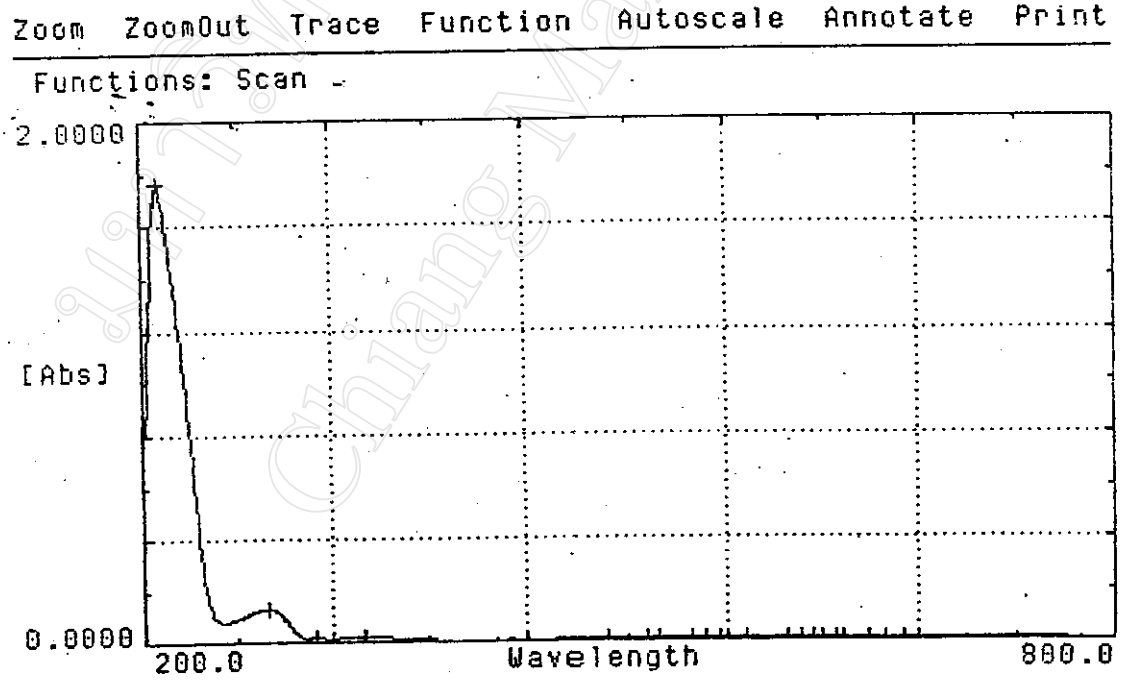

Figure 4-1. Absorbance at 200-800 nm of Partial Purified of Hemocyanin from Sea Crab (*Scylla serrata Rathbun*)

การเตรียมเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสจากหัวไชเท้า

เอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 38,000-42,000 ดาลตัน (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) สารละลายที่เตรียมจากหัวไชเท้ามีโปรตีนหลายชนิด วัดค่า A_{280} ได้เท่ากับ 1.255 และ A_{403} ได้เท่ากับ 0.5663 ซึ่งมีโปรตีนเท่ากับ 1.255/0.7 หรือ 1.7928 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน) และมีฮีม 24.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร RZ = 0.45 และใช้ฮีมคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสในสารละลายที่เตรียมได้ โดยเอนไซม์ CRP หนึ่งโมเลกุลประกอบด้วยฮีมหนึ่งโมลและโกลบินหนึ่งโมล เพราะฉะนั้น ฮีมมีความเข้มข้น 24.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดส 155.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามตารางที่ 2 นำมาศึกษา activity ของเอนไซม์ โดยการเติมเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสกับสารตั้งต้น (OPD) วัดค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 490 นาโนเมตร (A_{490}) ซึ่งเป็นค่าดูดกลืนแสงผลผลิตของปฏิกิริยานี้ตามระยะเวลาต่างๆ ให้แกนตั้งแสดง A_{490} แกนนอนแสดงระยะเวลาหลังจากเติม OPD (วินาที) ดังรูปที่ 4-2

ผลการหา working titer โดยวิธี Indirect ELISA

นำเอนไซม์ที่ได้มาเชื่อมติดกับแอนติบอดีของกระต่ายเพื่อหา working titre (secondary antibody conjugated) เขียนกราฟโดยให้แกนตั้งแสดงค่า A_{492} แกนนอนแสดงค่าส่วนกลับของอัตราเจือจาง (reciprocal dilution) เส้นกราฟแต่ละเส้นแสดงอัตราส่วนโมลของเอนไซม์ต่อแอนติบอดีกระต่ายที่ต้านพลาสมาไก่และหาพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) โดยใช้โปรแกรม Auto Cad R.13 (เมฆฉาย, 2539) ปรากฏว่าที่อัตราส่วนโมลของเอนไซม์ต่อแอนติบอดีของกระต่ายที่ต้านพลาสมาไก่ 100:1, 1,000:1, 10,000:1 และ 100,000:1 เป็น 0.5525, 1.1480, 0.9410 และ 1.0030 หน่วยตามลำดับ (รูปที่ 4-3) ที่อัตราส่วนโมลเอนไซม์ต่อแอนติบอดีของกระต่ายที่ต้านพลาสมาไก่ 1,000:1 มีค่าพื้นที่ใต้กราฟของ working titre สูงที่สุดและอัตราเจือจาง 1:100 ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงและใกล้เคียงกับค่าอัตราเจือจาง 1:10 ดังนั้นจึงใช้อัตราส่วนโมลเอนไซม์ต่อแอนติบอดีกระต่ายที่ต้านพลาสมาของไก่ 1,000:1 ที่อัตราเจือจาง 1:100 และเมื่อนำไปหาปริมาณแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในไก่โดย indirect ELISA ปรากฏว่าค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ต่ำมาก

(เกือบจะเท่ากับค่าของ blank) ฉะนั้นจึงนำเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีกระต่ายที่ต้านพลาสมาไก่มาหาอัตราเจือจางใหม่ที่อัตราส่วนโมลเอนไซม์ต่อแอนติบอดีของกระต่ายที่ต้านพลาสมาไก่ 1,000:1 และเริ่มอัตราเจือจางที่ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 ปรากฏว่า ค่า working titre ครั้งใหม่นี้จะใช้ที่อัตราเจือจาง 1:2 ซึ่งเป็นค่าสูงสุดเพื่อหาปริมาณแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในไก่ต่อไป

Table 2. Calculation the CRP amounts of partial 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 (เมฆฉาย, 2539)	OD = E C I	
	0.1319 = 5,500 X C X 1	
	$C = 2.45 \times 10^{-05}$	
Heme (ug/l)		24.5
Heme (mole) = protein (mole)	0.000024/616.48=Prot/39383.52	
Protein (mg)		1.53
Heme (umole/L)		0.389
Chinese Radish Peroxidase (ug/ml)		155.6

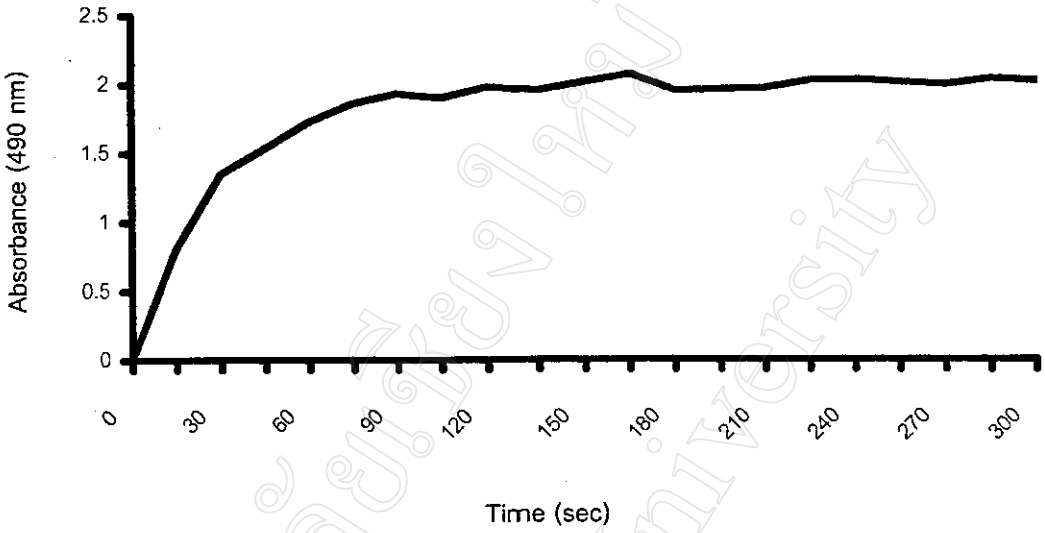

Figure 4-2. Peroxidase activity in Chinese Radish extract.

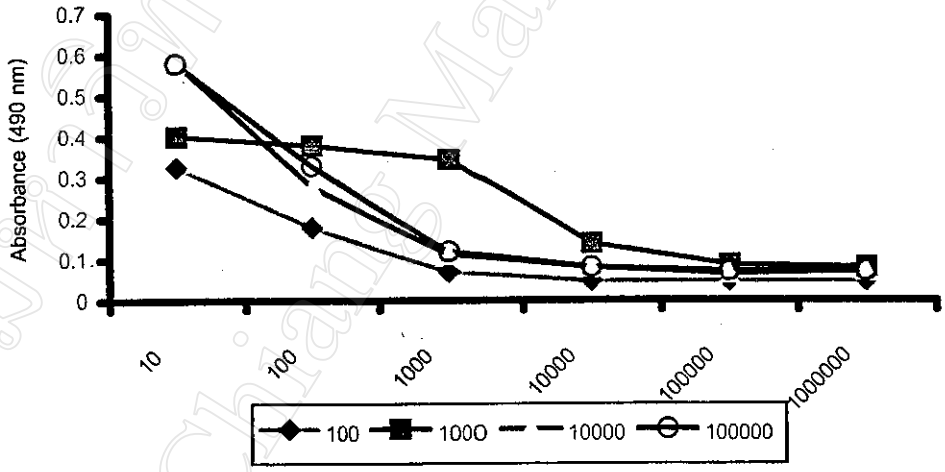

Figure 4-3. Working titer of rabbit-anti chicken serum conjugated with peroxidase by using Indirect ELISA.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การหาเส้นกราฟสารละลายมาตรฐานของโคเลสเตอรอล

การหาปริมาณสารละลายมาตรฐานของโคเลสเตอรอลโดยการเขียนกราฟ ให้แกนตั้งแสดงค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 560 นาโนเมตร (A_{560}) แกนนอนแสดงปริมาณสารละลายโคเลสเตอรอลมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำมาหาสมการถดถอย (regression equation) โดยใช้โปรแกรม Statistic Analysis System (SAS) และหาค่าสัมประสิทธิ์ของสมการทำนาย (ตาราง 3) พบว่า โคเลสเตอรอล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ $5.577 \times A_{560} + 0.066$ ดังรูปที่ 4-4

Table 3. Coefficients of Predicted Regression Equation

Coefficients[a]	Unstandardized coefficients		Standardized coefficient		Statistics
	B	Std. Error	Beta	t	Sig.
Constant	6.6×10^{-02}	.010		6.324	.000
OD	5.577	.163	.918	34.295	.000

[a]Dependent Variable: Cholesterol

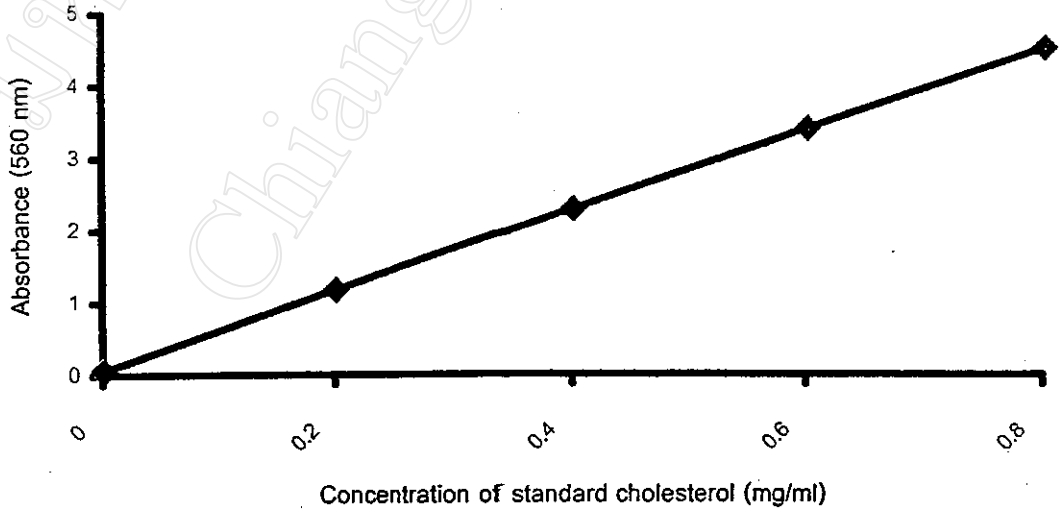

Figure 4-4. Standard curve of cholesterol.

แอนติบอดีไตเตอร์ของโคเลสเตอรอลในซีรั่มของไก่ไข่

หลังจากที่ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอล ในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4 ปรากฏว่า แอนติบอดีไตเตอร์ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (treatment) ในสัปดาห์ที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (75 ± 30 *vs* 36 ± 20 หน่วย) และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 ($P<0.01$) (273 ± 844 *vs* 3285 ± 1459 หน่วยและ 345 ± 914 *vs* 3685 ± 1262 หน่วย) รูปที่ 4-5

ปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรั่มของไก่ไข่

ระดับโคเลสเตอรอลในซีรั่มของไก่ไข่ หลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่า การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลมีผลต่อระดับโคเลสเตอรอลในซีรั่มในสัปดาห์ที่ 4 และ 10 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (572.0 ± 531.756 mg/dL *vs* 245.6 ± 75.83 mg/dL และ 850.2 ± 430.18 mg/dL *vs* 595.8 ± 227.3 mg/dL) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ในสัปดาห์ที่ 8 (774.0 ± 512.6 mg/dL *vs* 362.0 ± 176.8 mg/dL) รูปที่ 4-6

ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดง

ระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดง การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอล มีผลต่อระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (96.5 ± 20.5 mg/g yolk *vs* 49.11 ± 11.98 mg/g yolk และ 96.15 ± 28.49 mg/g yolk *vs* 35.98 ± 17.76 mg/g yolk ตามลำดับ) รูปที่ 4-7

เปอร์เซ็นต์ไขมันในไข่แดง

เปอร์เซ็นต์ไขมันในไข่แดง การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (treatment)ไม่มีผลต่อระดับไขมันในไข่แดง (P>0.05) (11.79 ± 1.04% *vs* 12.02 ± 0.81%, 13.21 ± 1.00% *vs* 13.61 ± 1.08%, 14.30 ± 1.34% *vs* 14.58 ± 1.39%, 15.92 ± 1.18% *vs* 17.79 ± 7.07% และ14.61 ± 1.74% *vs* 15.31 ± 0.98%) ในสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 8 และ 10 ตามลำดับ (รูปที่ 4-8)

เปอร์เซ็นต์ไข่

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไข่ของไก่กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น โดยเปอร์เซ็นต์ไข่ = (จำนวนไข่ของไข่ที่ได้รับทรีทเมนต์ X 100)/ จำนวนไก่ที่ได้รับทรีทเมนต์เดียวกัน ปรากฏว่า เปอร์เซ็นต์ของไก่กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (P>0.05) รูปที่ 4-9

น้ำหนักตัวและน้ำหนักตับสดของไก่เนื้อ

น้ำหนักตัวของไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลมีน้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 42 วันไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางสถิติ (P>0.05) (1.74 ± 0.10 กิโลกรัม *vs* 1.88 ± 0.12 กิโลกรัม) ส่วนน้ำหนักตับสดของไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 42 วันไม่แตกจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางสถิติ (P>0.05) (55.56 ± 0.10 กรัม *vs* 57.33 ± 0.13 กรัม) รูปที่ 4-10

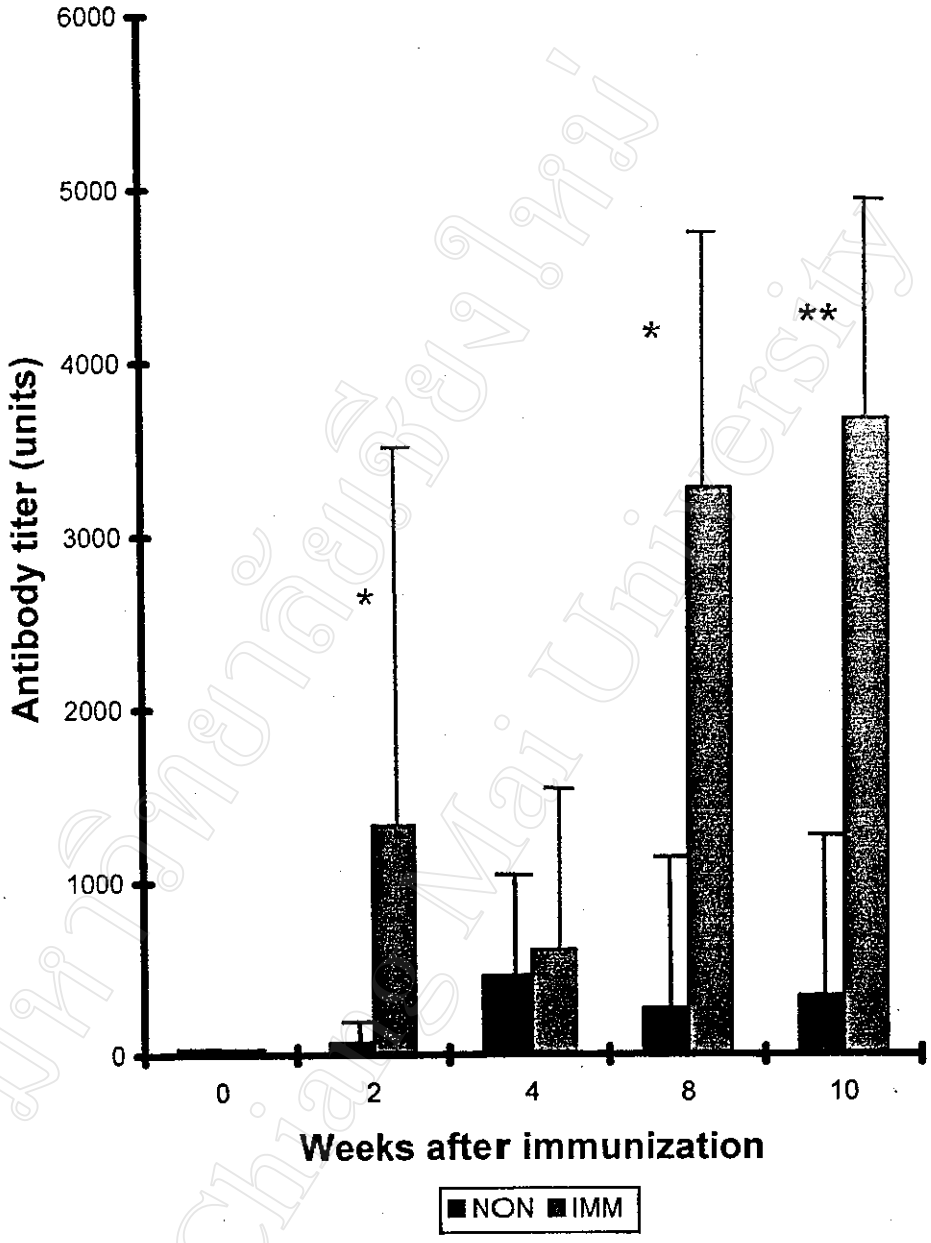

Figure 4-5. Antibody titer after immunization of cholesterol-3-pKLH.

IMM is Immunization (n=16) and 1 IMM hen died at 2nd week after 1st immunization.

NON is non-immunization (n=20) and 2 NON hens died at 2nd week after 1st immunization.

* is significant different (P<0.05).

** is highly significant different (P<0.05).

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

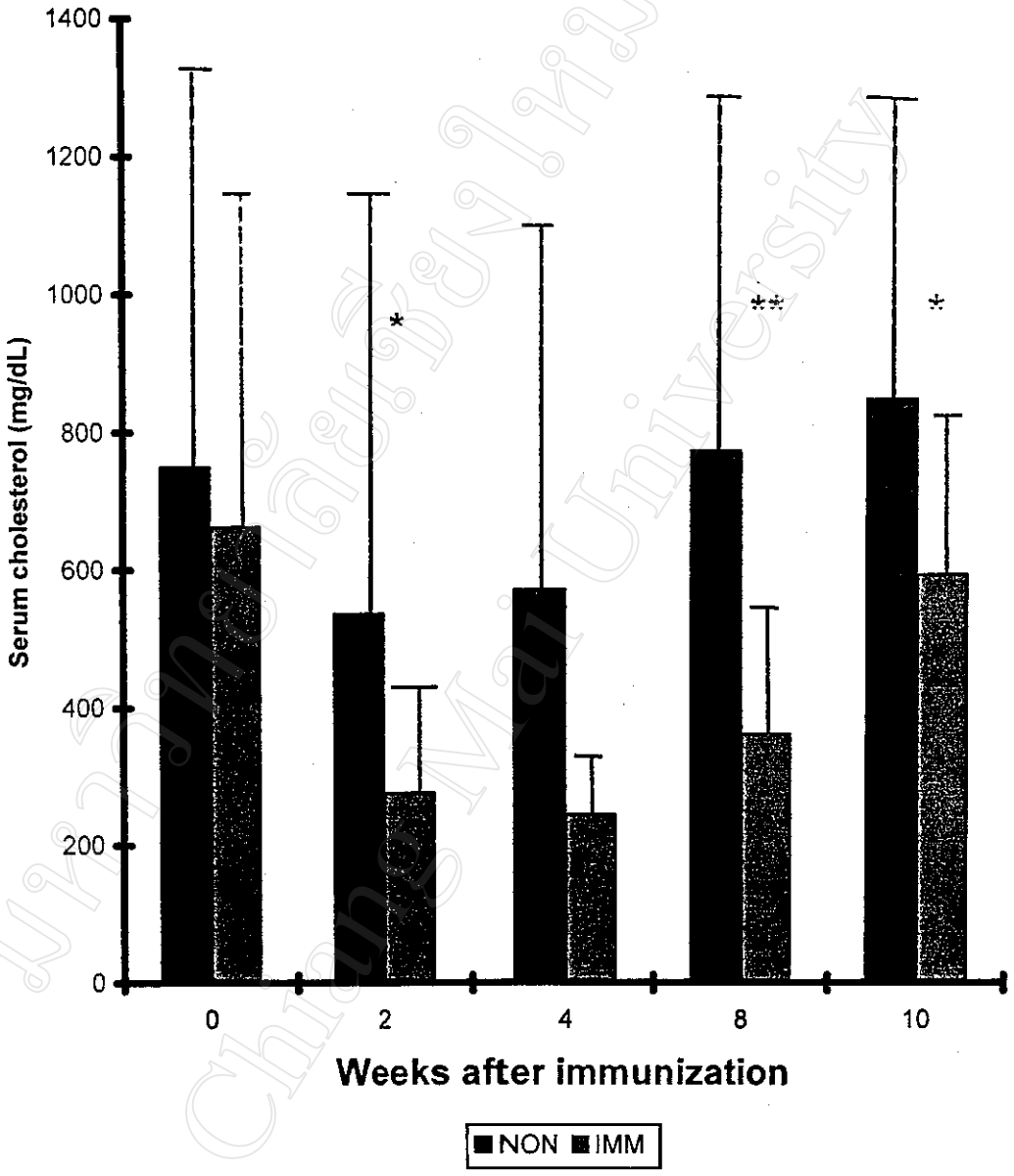

Figure 4-6. Serum cholesterol levels after immunization of cholesterol-3-pKLH.

IMM is Immunization (n=16) and 1 IMM hen died at 2nd week after 1st immunization.

NON is non-immunization (n=20) and 2 NON hens died at 2nd week after 1st immunization.

* is significantly different (P<0.05).

** is highly significant different (P<0.01).

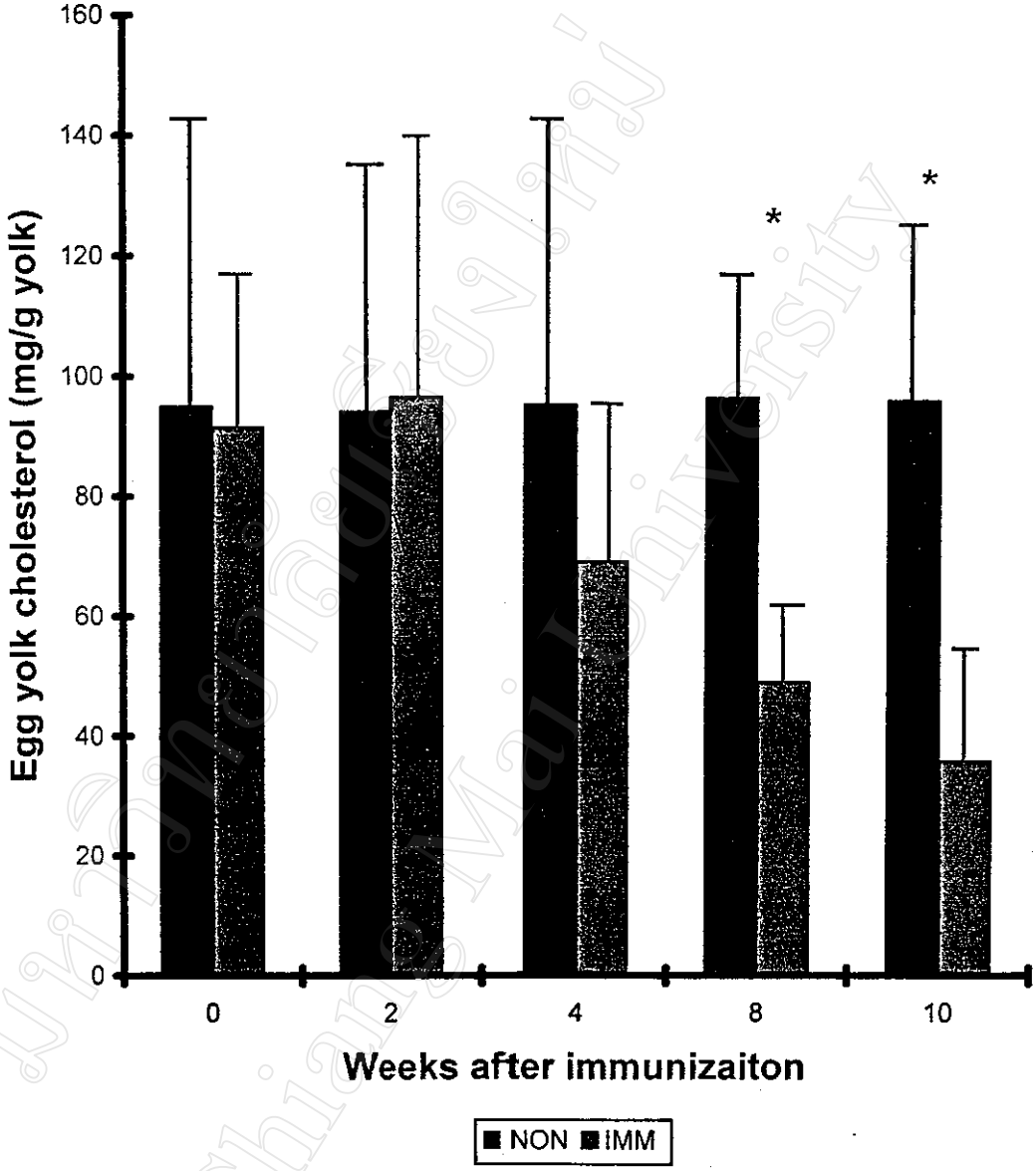

Figure 4-7. Egg yolk cholesterol levels after immunization of cholesterol-3-pKLH.
IMM is immunization (n=16) and 1 IMM hen died at 2nd week after immunization.
NON is non-immunization (n=20) and 2 NON hen died at 2nd week after immunization.
* is significant different (P<0.05).

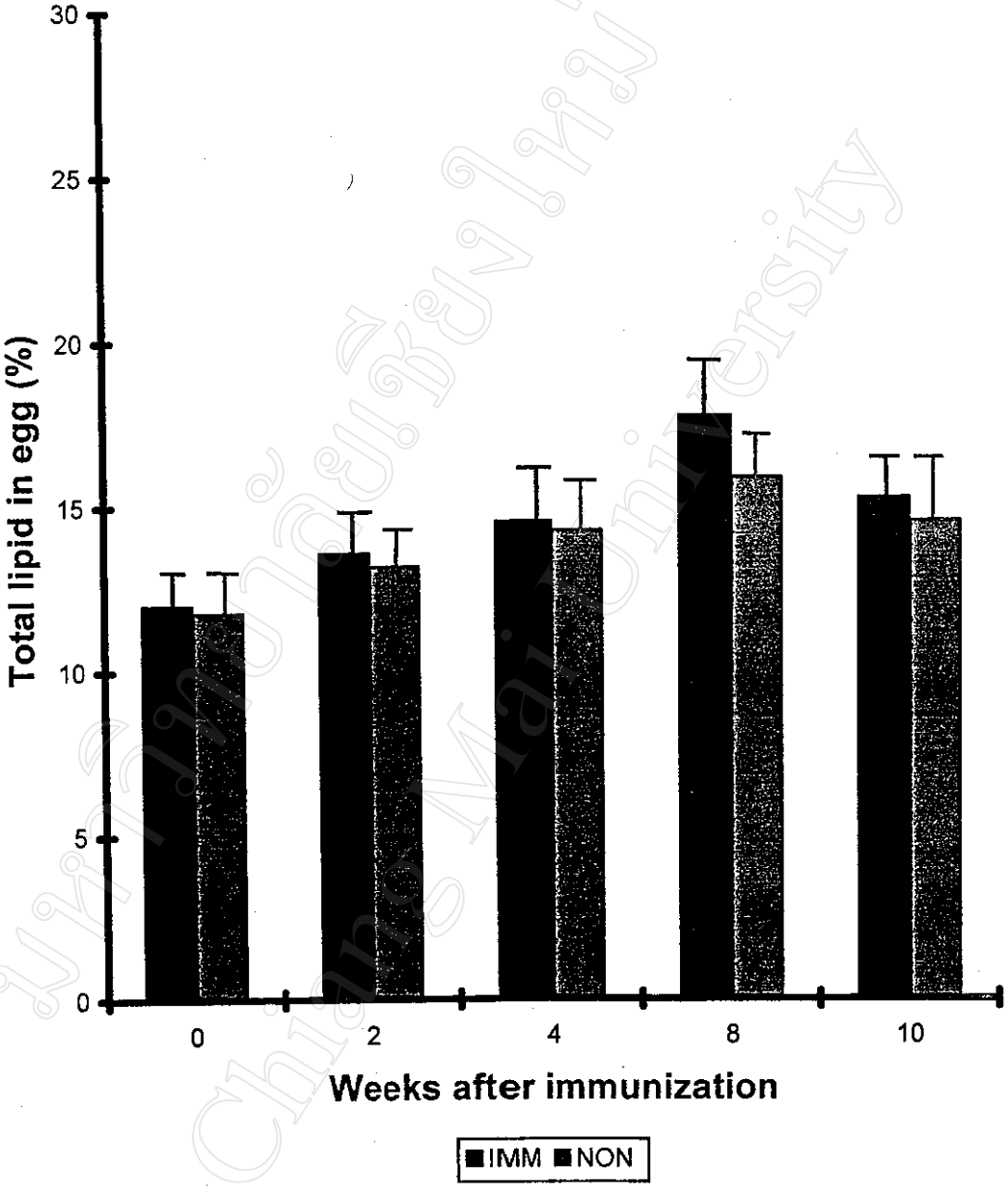

Figure 4-8. Total lipids in egg after immunization of cholesterol-3-pKLH.
IMM is immunization (n=16) and 1 IMM hen died at 2nd week after immunization. NON is non-immunization (n=20) and 2 NON hens died at 2nd week after immunization.

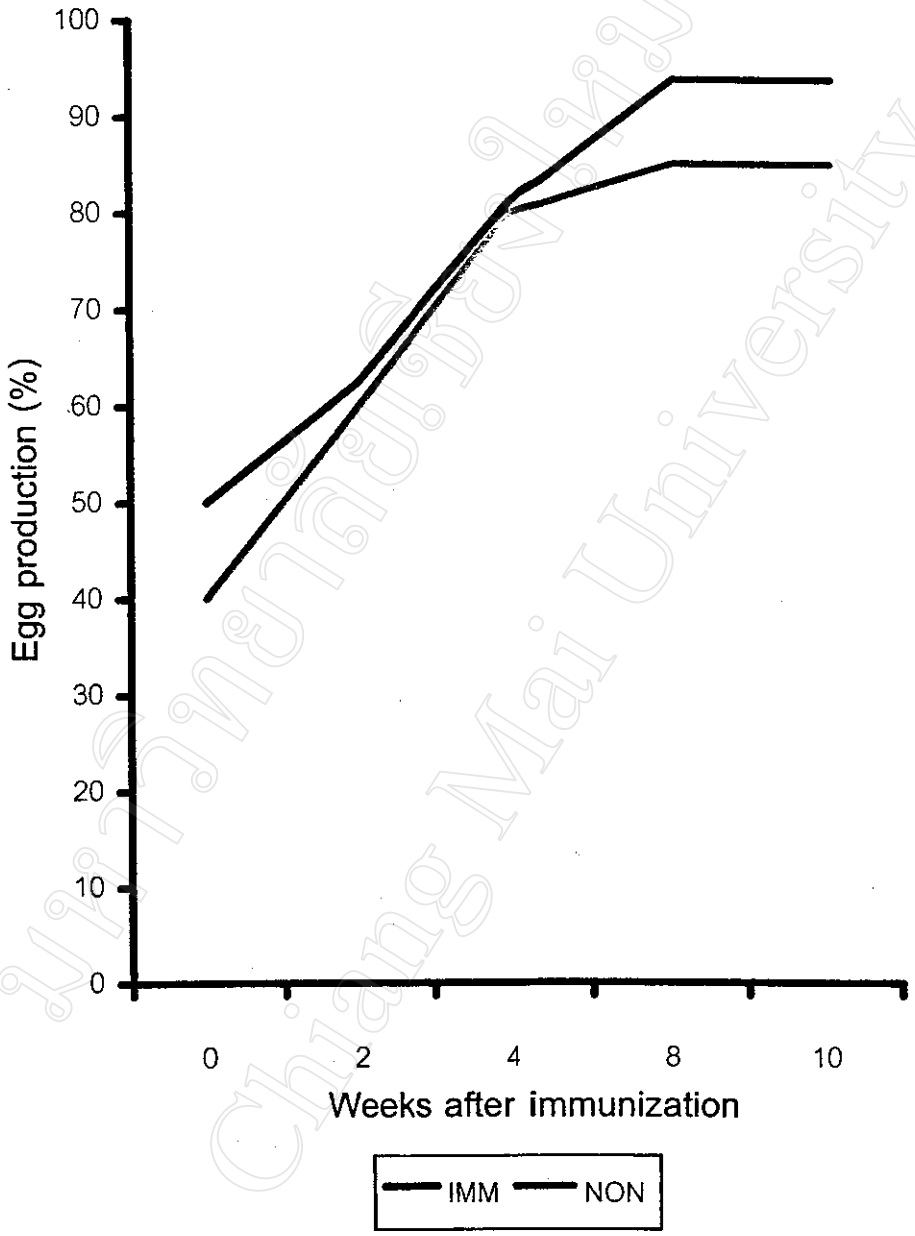

Figure 4-9. Percent of egg production of immunized and non-immunized hens. IMM is immunization with cholesterol-3-pKLH (n=16). NON is non-immunization (n=20).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

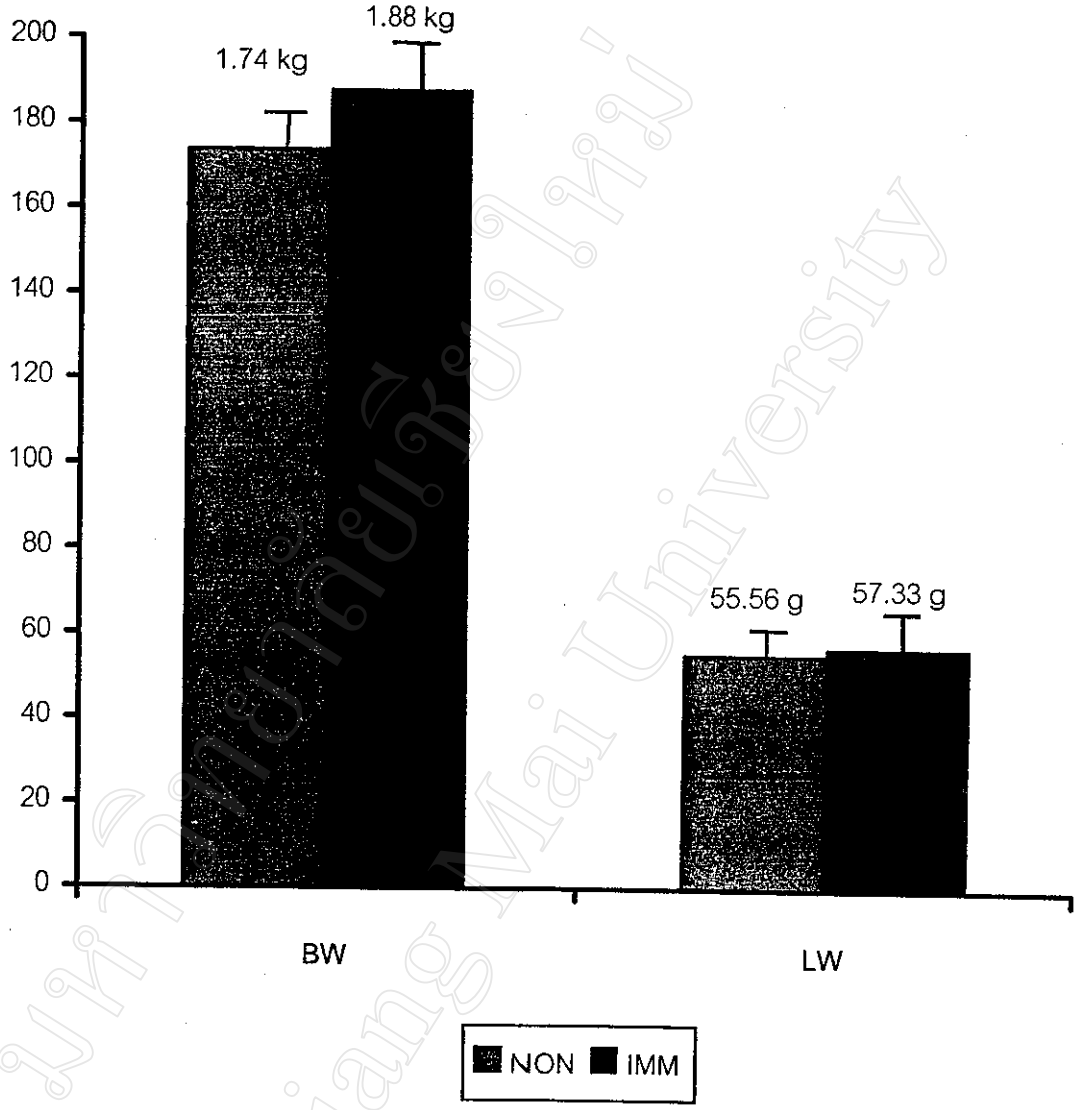

Figure 4-10. Body weights and liver weights of IMM and NON broiler at 42 days
IMM is immunization of cholesterol-3-pKLH at 0, 3 and 21 days (n=9).
NON is non-immunization (n=9).

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University