บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

การทดลองที่ 1

ไก่ไข่สาวพันธุ์ทางสำหรับการค้าพันธุ์อีซ่าบราวน์ (ESA-brown) อายุ 18 สัปดาห์ จำนวน 36 ตัว ขังเดี่ยวในกรงตับสองชั้น (double batteries) แต่ละกรงมีขนาด 10 × 12 × 18 นิ้ว (กว้าง × สูง × ลึก) พร้อมทั้งรางน้ำและรางอาหารพลาสติก (รูปที่ 3-1) มีอาหารและน้ำให้กินตลอดเวลา (*ad libitum*) อยู่ภายในโรงเรือนสัตว์ทดลองภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มีมุ้งพลาสติกสำหรับป้องกันนกและแมลงต่างๆ ที่รบกวน (รูปที่ 3-2) ไก่สาวกินอาหารสำหรับไก่สาววันละประมาณ 110 กรัม เมื่ออายุ 22 สัปดาห์ได้รับอาหารสำหรับไก่ไข่ วันละประมาณ 110 กรัม ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 08:00 นาฬิกาและเวลา 13:00 นาฬิกา รับแสงวันละ 18 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 04:00 นาฬิกาถึง 06:00 นาฬิกาและ 18:00 นาฬิกาถึง 22:00 นาฬิกา โดยการตั้งเวลาให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) และช่วงเวลา 06:00 นาฬิกาถึง 18:00 นาฬิกาได้รับแสงจากธรรมชาติ ออกแบบการทดลองและวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) (จันทลักขณา, 2535) มีสองกลุ่มการทดลอง (treatment) ได้แก่ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลด้วย cholesterol-3-partial purified keyhole limpet hemocyanin (cholesterol-3-pKLH) ตัวละ 250 ul มีซาโปนิน (saponin) และน้ำมันดิน (minerol oil) เป็นตัวช่วยให้ภูมิคุ้มกันทำงานได้ดียิ่งขึ้น (adjuvant) จำนวน 16 ตัว และกลุ่มที่สองได้รับซาโปนินและน้ำมันดิน ที่อายุ 22, 24 และ 26 สัปดาห์ (Alving *et al.*, 1996) ตั้งแต่เวลา 20:00 นาฬิกาเป็นต้นไป โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ จำนวน 20 ตัว เก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ทดลองที่เส้นเลือดดำปีก (wing vein) ในสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 8 และ 10 ตั้งแต่เวลา 08:00 นาฬิกาเป็นต้นไปก่อนการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Klopstock *et al.*, 1964) เพื่อวิเคราะห์หาแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี Indirect ELISA, ปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัม, เก็บไข่ในสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 8 และ 10 เพื่อวัดหาปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่, เปอร์เซ็นต์ไขมันในไข่แดงและ

เปอร์เซ็นต์ไข่แดงในไข่ไก่ ทำการวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม Statistic Analysis System (SAS) โดยโมเดล ANOVA (ดวงจินดา, 2537)

การทดลองที่ 2

ไก่เนื้อสำหรับเลี้ยงเพื่อการค้า (broiler) อายุ 1 วัน ซื้อจากตัวแทนจำหน่ายของบริษัทแหลมทอง จำกัด จำนวน 18 ตัวคละเพศ อายุ 1 ถึง 21 วัน กกในตู้กกขนาด 100 X 75 X 50 เซนติเมตร (กว้าง X ยาว X สูง) ที่มีหลอดไฟแบบมีไส้ 100 วัตต์ 2 หลอดให้แสงสว่างและความอบอุ่นตั้งแต่อายุ 1 ถึง 21 วัน และมุ้งลวดป้องกันแมลงต่างๆ ที่มารบกวน (รูปที่ 3-3) มีน้ำและอาหารให้กินตลอดเวลา (*ad libitum*) โดยอาหารสำหรับเลี้ยงไก่อายุ 1 ถึง 21 วันของบริษัท เครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด เมื่ออายุ 21 ถึง 42 วัน เลี้ยงปล่อยฝูง อยู่ในเล้าขนาด 9 ตารางเมตร (3 X 3) มีน้ำและอาหารให้กินตลอดเวลา (*ad libitum*) โดยอาหารสำหรับเลี้ยงไก่อายุ 21 วัน ถึง 49 วันของบริษัท เครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด ออกแบบการทดลองและวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (จันทลักขณา, 2535) มีสองกลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่งได้รับ cholesterol-3pKLH มีซาโปนินและน้ำมันดินเป็นตัวช่วยให้ภูมิคุ้มกันทำงานได้ดียิ่งขึ้น จำนวน 9 ตัว ที่อายุ 3, 10 และ 21 วัน กลุ่มที่สองได้รับซาโปนินและน้ำมันดิน จำนวน 9 ตัว ที่อายุ 3, 10 และ 21 วัน เมื่ออายุ 42 วัน ชั่งน้ำหนักตัว (body weight) และน้ำหนักตับสด (liver weight) ทำการวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SAS โดยโมเดล ANOVA (ดวงจินดา, 2537)

การเตรียมแอนติเจน

การเตรียมโปรตีนฮีโมไซยานิน (hemocyanin) จากปูทะเล

(Partial purified of Keyhole limpets hemocyanin; pKLH)

ปูทะเลมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Scylla serrata Rathbun* (Suvatti, 1967) เลือดปูมีหน้าที่ขนส่งสารอาหารและออกซิเจน การขนส่งออกซิเจนของปูมีฮีโมไซยานิน เป็นตัวขนส่ง ฮีโมไซยานินประกอบด้วยฮีม (heme) และโกลบิน (globin) ซึ่งเป็นโปรตีน ฮีมมีทองแดงและพอไฟริน (porphyrin) ที่เรียกว่า protoporphyrin IX เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการแยกส่วนประกอบของโปรตีนฮีโมไซยานิน (รูปที่ 3-4) ต้องมีการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัล-

เฟต (Appendix B-1) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Harlow และ Lane, 1988) เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge: MISTRAL 3000, serial No. 87/933D, Fisons, England) ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดเอาของเหลวส่วนที่อยู่เหนือตะกอน (supernatant) ทิ้ง ละลายตะกอน (precipitant) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Appendix B-2) และตกตะกอนอีกครั้งหนึ่งด้วยสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ดูดเอาของเหลวส่วนที่อยู่เหนือตะกอนทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีปริมาณน้อยที่สุด กำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตและสารอื่นที่มีโมเลกุลน้อยกว่าหรือเท่ากับ 12,000-14,000 ดาลตัน โดยการผ่านเยื่อบาง (dialysis membrane) แล้วทำให้แห้งด้วยไนโตรเจนวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) ซึ่งเป็นค่าดูดกลืนแสงของโปรตีน

การเชื่อมโมเลกุลแฮปเทนกับโมเลกุลพาหะ

โคเลสเตอรอล -3- เฮมิซัคซิเนท (cholesterol-3-HS) 100 มิลลิกรัม (เตรียมโดย รศ. เพทาย พงษ์เพียจันทร์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ในไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (Sigma; dimethylformamide) 10 มิลลิลิตร (D 4254, Lot 56H1072) เติม glutaraldehyde (Sigma; G-5882, Lot 104H5015) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2% (Engvall และ Perlmann, 1972) เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Vortex Genie2, Scientific Industries) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม pKLH 200 มิลลิกรัม (Vaitukaitis *et al.*, 1971) เขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3-5) (Harlow และ Lane, 1988) เสร็จแล้วแยกสารที่ไม่ต้องการออกจากแอนติเจนที่เตรียมได้โดยผ่านเยื่อบางๆ (dialysis) ที่ยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าหรือเท่ากับ 12,000-14,000 ดาลตันผ่าน (Cello Sep T_3) เป็นเวลา 4 วัน (Mills, 1994) เพื่อขจัด glutaraldehyde

การฉีดแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายสัตว์ (Immunization)

โดยนำแอนติเจนที่ได้ปริมาณ 500 ไมโครกรัมผสมกับซาโปนิน 50 ไมโครกรัมที่ละลายในสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตรและผสมกับน้ำมันดิน (mineral oil; No.4005, Lot 085H6134, Sigma) 500 ไมโครลิตร เมื่อรวมแอนติเจนและตัวช่วยให้ภูมิคุ้มกันทำงานได้ดีขึ้นเป็น 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (homogenization) โดยการใช้หลอดฉีดยา (syringe) และข้อต่อสามทางพลาสติก (3-ways catheter) (รูปที่ 3-6) สำหรับการฉีดแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายไก่ 1 ตัวจะใช้ปริมาตร 500 ไมโครลิตรส่วนกลุ่มควบคุมไม่มีแอนติเจนมีเฉพาะซาโปนิน น้ำมันและสารละลายบัฟเฟอร์ โดยใช้เข็มเบอร์ 24 (24G × 1 ½"; Nipro®) ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ (subcutaneous) ซึ่งทำให้ปริมาณของแอนติเจนที่ฉีดแต่ละครั้งมีปริมาณเท่ากับ 250 ul (รูปที่ 3-7)

การเก็บตัวอย่างเลือด (Bleeding)

เก็บตัวอย่างเลือดบริเวณเส้นเลือดดำที่ปีก (wing vein) (รูปที่ 3-8) หลอดเก็บตัวอย่างเลือด มี EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) เป็นตัวป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิโมลล่าร์ (Appendix B-3) จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อเลือด 3-5 มิลลิลิตรเมื่อเก็บตัวอย่างเลือดแล้วจะนำมาเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เก็บของเหลวที่อยู่เหนือเม็ดเลือด (supernatant) เพื่อวัดปริมาณโคเลสเตอรอลและภูมิคุ้มกันต่อไป (เมฆฉาย, 2539)

การวัดภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอล

วิธีการเตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวไชเท้า

(Partial purified of Chinese Radish Peroxidase)

เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Shannon และคณะ (1966) โดยการนำหัวไชเท้าสดจากตลาดมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ นำมาปั่นกับสารละลายบัฟเฟอร์ PBS อุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส ในเครื่องปั่นที่ติดใบมีด (blender) แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® no. 41 ภายใต้แรงดันสุญญากาศ (vacuum pump; Medi-Pump, Model 1132 RV.E) นำสารละลายที่ได้กรองผ่านผง

เซลลูโลส (Sigma; Diethylaminoethyl-cellulose; D-8257, Lot 085H6134) ที่บรรจุอยู่ในหลอดแก้วทรงกระบอกกลวง ภายใต้แรงดันสุญญากาศ เก็บของเหลวที่ได้ตกตะกอนด้วยสารละลายอิ่มตัวแอมโนเนียมซัลเฟต เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เหลือส่วนที่เป็นตะกอนและละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS อีกครั้งหนึ่ง ตกตะกอนด้วยสารละลายอิ่มตัวแอมโนเนียมซัลเฟตอีกครั้งหนึ่งแล้ว เก็บไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เหลือส่วนที่เป็นตะกอนและละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์อีกครั้งหนึ่ง นำไปผ่านเยื่อบาง (dialysis membrane) เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟต วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A_{280}) เพื่อหาปริมาณโปรตีน และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 403 นาโนเมตร (A_{403}) เพื่อหาปริมาณฮีม (protohemin IX) (Shannon *et al.*, 1966) ที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดส (peroxidase) ปรากฏว่า ค่า A_{280} เท่ากับ 1.2496 ค่า A_{403} เท่ากับ 0.5633 นำมาหาค่า Reinheitszahl (RZ) = 0.45 ค่า RZ หรือ Soret band (Shannon *et al.*, 1966) เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า A_{403} และค่า A_{280} ค่า RZ จะบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดส ยิ่งมีค่า RZ สูงแสดงว่ามีความบริสุทธิ์มาก (Maehly, 1950)

การเตรียมเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีของกระต่าย

การเชื่อมเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสที่เตรียมจากหัวไชเท้า (partial purified of Chinese Radish Peroxidase: pCRP) ติดกับแอนติบอดีของกระต่ายที่ต้านพลาสมาของไก่โดยวิธี glutaraldehyde มีขั้นตอน ดังนี้ เริ่มจากคำนวณหาปริมาณของ pCRP ก่อนการเชื่อมติด โดยมีอัตราส่วนโมลของ pCRP: แอนติบอดีของกระต่ายที่ต้านพลาสมาของไก่เป็น 100:1, 1000:1, 10000:1 และ 100000:1 โดยการกระตุ้น pCRP ด้วย glutaraldehyde ที่มีความเข้มข้น 1.25% ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อปริมาตรของ pCRP 1,000 ไมโครลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีของกระต่ายในอัตราส่วนดังกล่าว ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมงแล้วนำมาทำ dialysis ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 วัน (Harlow และ Lane, 1988)

Figure 3-1. Battery cages with feeder.

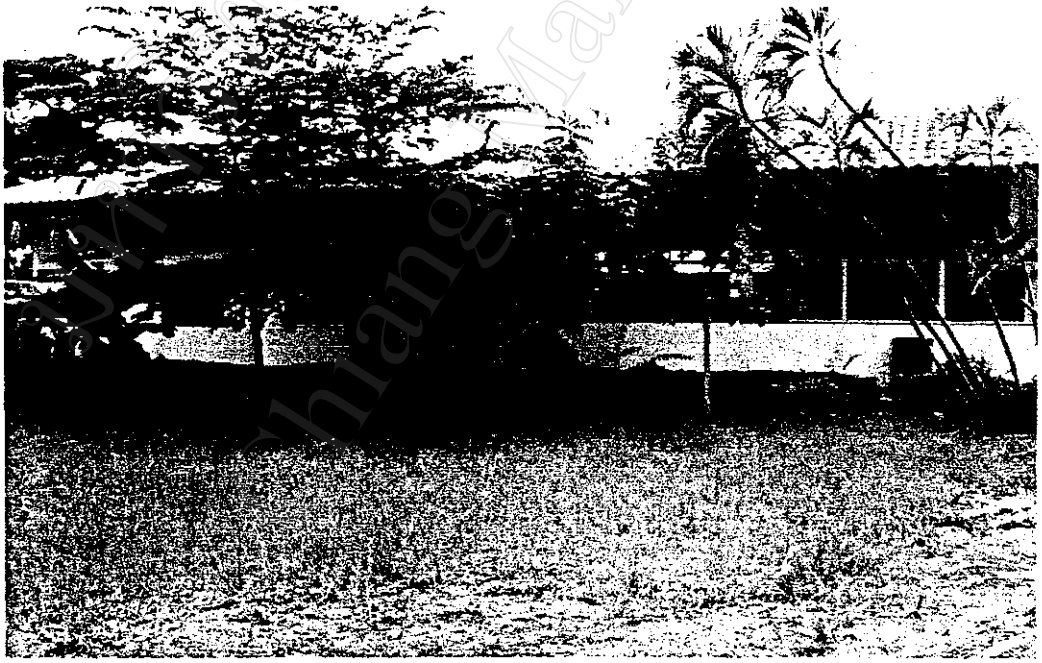

Figure 3-2. Experimental house at Department of Animal Science, Faculty of Agriculture , Chiang Mai University.

ห้องสมุดคณะเกษตรศาสตร์

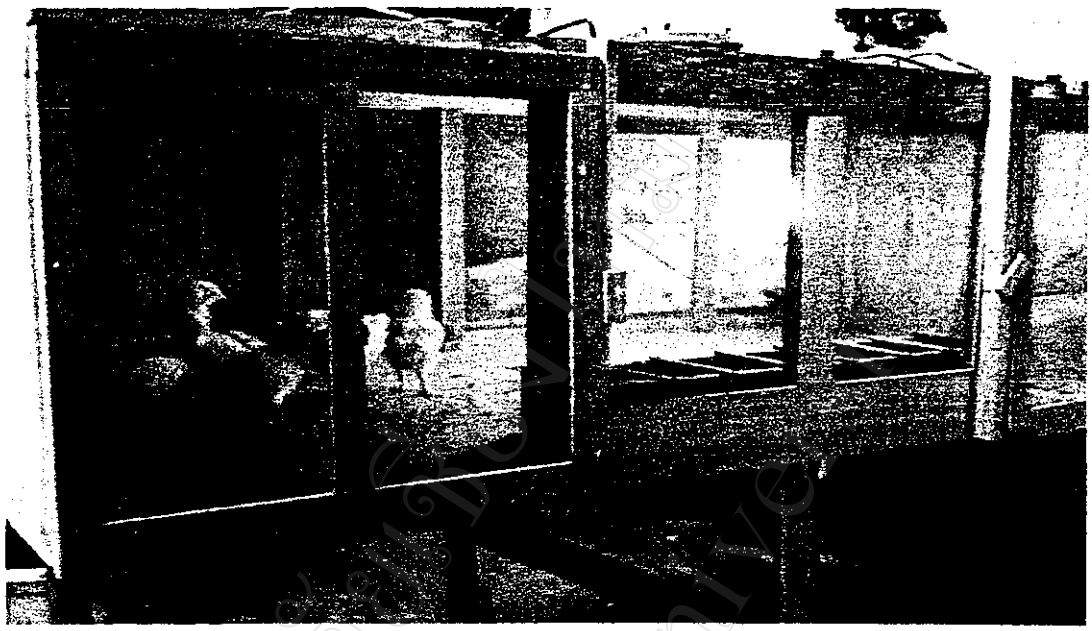

Figure 3-3. Brooder box for day-old chicks.

Figure 3-4. Bleeding Sea Crab for hemocyanin preparation.

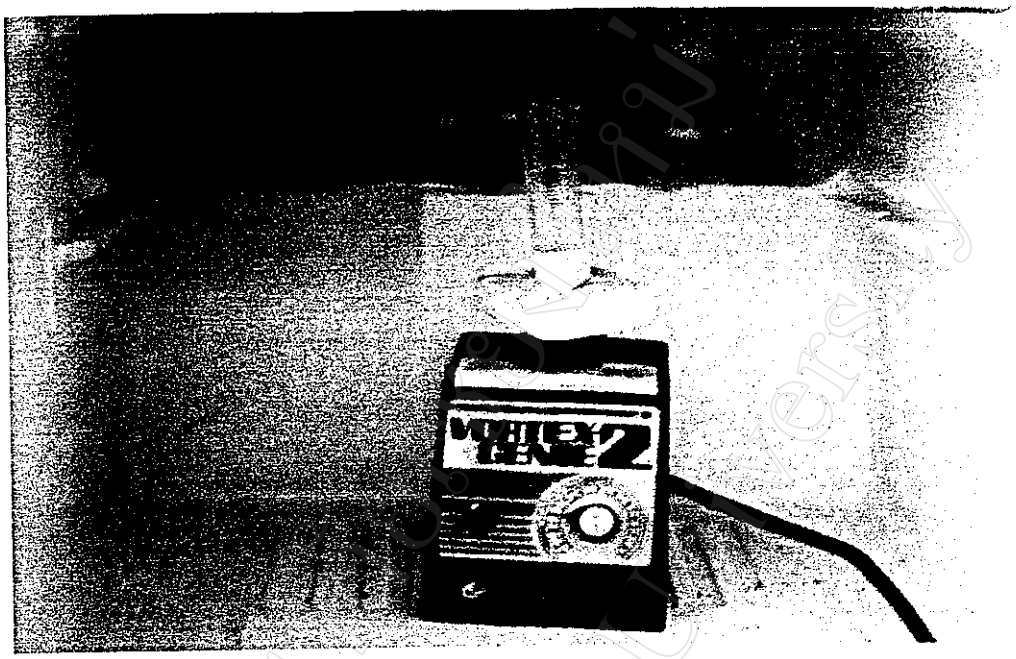

Figure 3-5. Preparation of antigen by conjugating cholesterol-3-HS with pKLH from Sea Crab on vortex mixture in refrigerator.

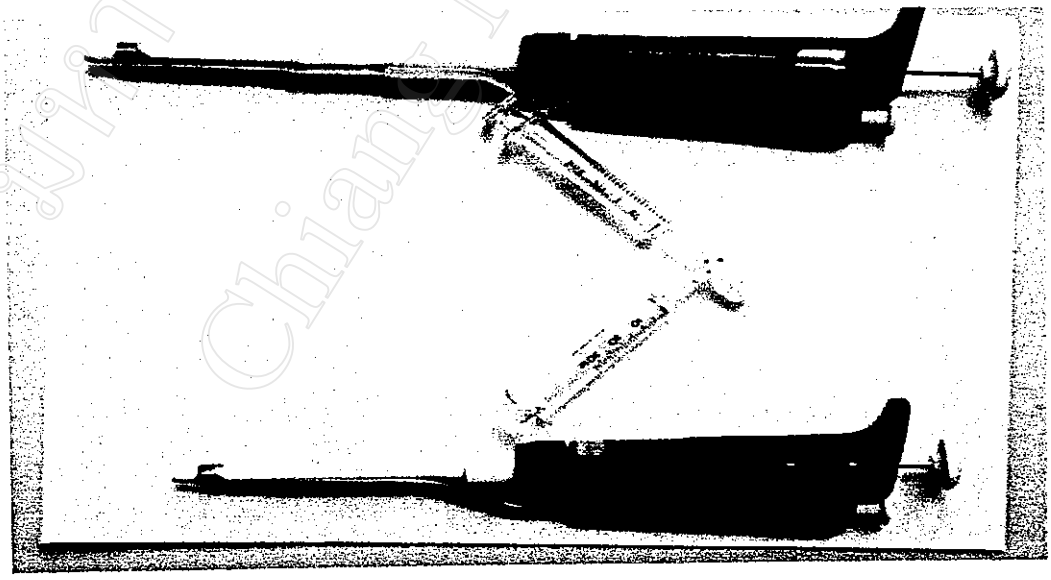

Figure 3-6. Preparation of cholesterol-3-pKLH in the small amount by homogenization technique using micropipet and syringe.

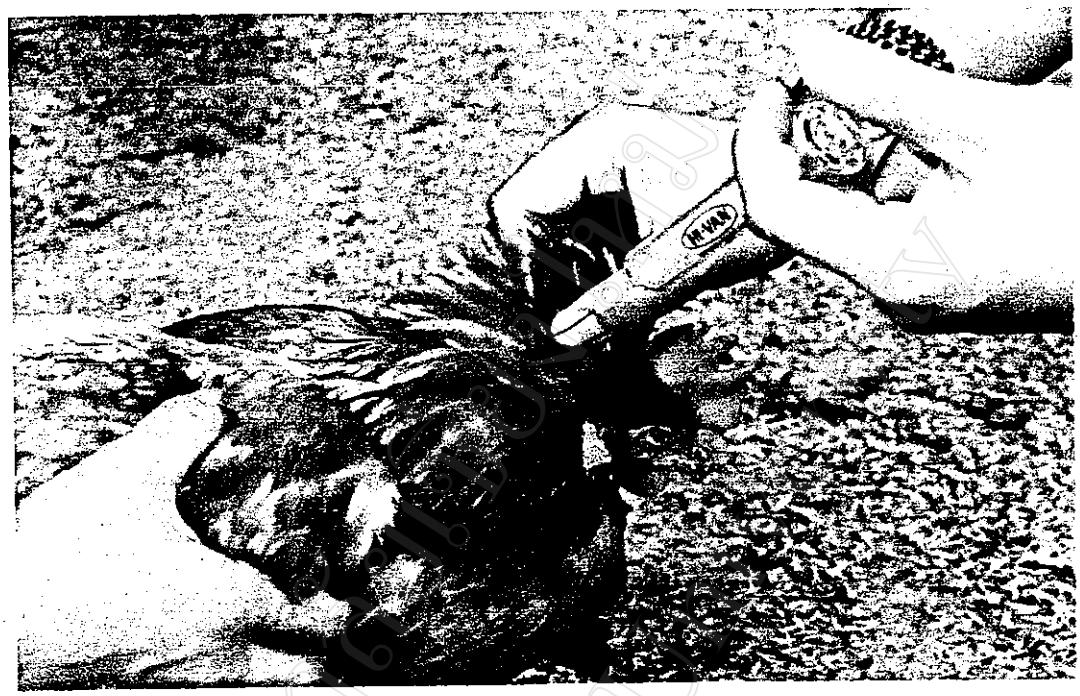

Figure 3-7. Immunization of Cholesterol-3-pKLH by injection at neck's subcutaneous.

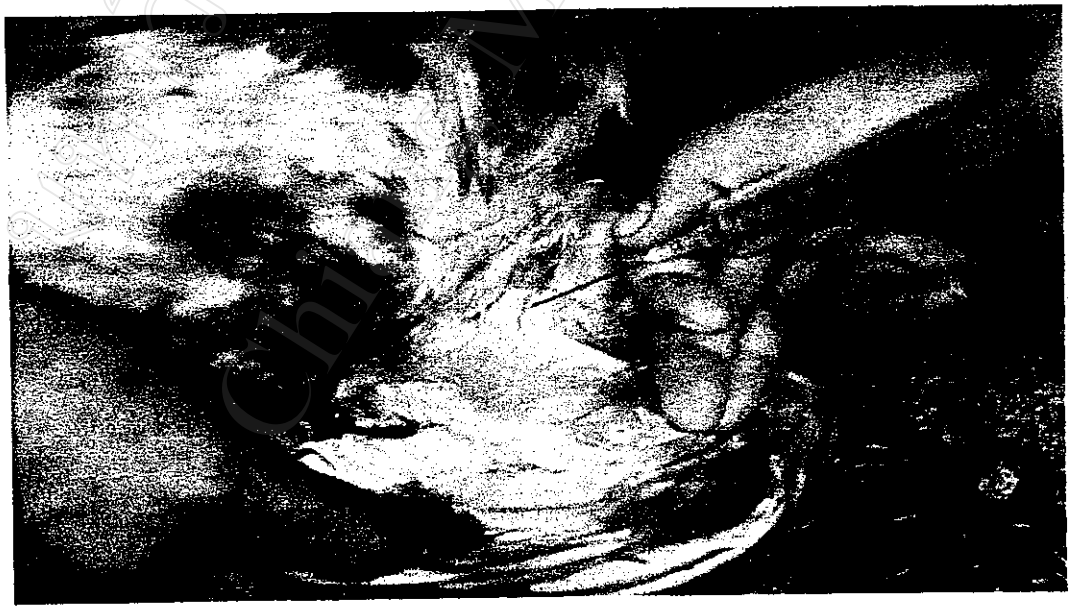

Figure 3-8. Blood collecting by bleeding hen with no. 21 needle at wing vein.

การหาปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์

การหาปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ (working titre) มีขั้นตอนดังนี้ (Appendix A-2) เคลือบไมโครเพลท (polystyrene plate; Nunc, Denmark) ด้วยพลาสมาของไก่ที่เจือจางโดยบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบ (Appendix B-4) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส (Incubator; Model 3194, serial No. 35305-398, Forma Scientific) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (Appendix B-5) หลุมละ 150 ไมโครลิตรโดยเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าไมโครเพลท เป็นเวลา 1 นาที 3 ครั้ง เติมเจลาติน (ART.407, Lot 450K-4988770, Merck) ที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบเข้มข้น 1% (Appendix B-6) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้างหลุมละ 150 ไมโครลิตรโดยเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าไมโครเพลท เป็นเวลา 1 นาที 5 ครั้ง เติมเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีของกระต่ายที่ต้านพลาสมาของไก่ในความเจือจางต่างๆ ดังนี้ 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 และ 1:1,000,000 ตามลำดับในสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเจือจาง (Appendix B-7) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้างหลุมละ 150 ไมโครลิตรโดยเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าไมโครเพลท เป็นเวลา 1 นาที 5 ครั้ง เติมสารตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของ ELISA (Appendix B-8) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 4 N H_2SO_4 หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวแสง 492 นาโนเมตร (A_{492}) ด้วยเครื่องอ่าน ELISA (Benchmark : Microplate Manager 4.0 Bio-Rad Laboratories, Inc.)

การทำ Indirect ELISA

Indirect ELISA ทำโดยดัดแปลงจากวิธี Exon และ Talcott (1995) ขั้นตอนโดยย่อมีดังนี้ (Appendix A-3) : เคลือบไมโครเพลท (microplate) ขนาด 96 หลุม ด้วยโคเลสเตอรอลที่เชื่อมติดกับโปรตีนจากเลือดปูในบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบ (coating buffer) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้างด้วย บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (washing buffer) 3 ครั้ง ครั้งละ 150 ไมโครลิตร เติมเจลาตินที่ละลายในบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบเข้มข้น 1% หลุมละ 100 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 5 ครั้ง ครั้งละ 150 ไมโครลิตร เติมพลาสมาของไก่ที่

เตรียมเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 5 ครั้ง ครั้งละ 150 ไมโครลิตร เติมพลาสมาจากกระต่ายที่มีภูมิคุ้มกันต่อพลาสมาของไก่ซึ่งเชื่อมอยู่ติดกับเอนไซม์จากหัวไชเท้า ที่อัตราการเจือจาง 1:2 ในบัฟเฟอร์สำหรับเจือจาง หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 5 ครั้ง ครั้งละ 150 ไมโครลิตร เติมสารละลายตั้งต้น (substrate reagent) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลานาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น (4 N H_2SO_4) หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านค่าดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่องอ่าน (ELISA reader) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (A_{490}) (Benchmark : Microplate Manager 4.0 Bio-Rad Laboratories, Inc.)

การวัดปริมาณโคเลสเตอรอล

การหาปริมาณสารละลายมาตรฐานโคเลสเตอรอล

วิธีวัดนี้ดัดแปลงจาก Abell และคณะ (1951) วิธีการโดยย่อมีดังนี้: เตรียมสารละลายมาตรฐานโคเลสเตอรอล (0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองสำหรับเครื่องเหวี่ยง (centrifuge tube; Nunc, Denmark) เติมโปแตสเซียมไฮดร็อกไซด์ที่มีความเข้มข้น 33% ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ปิดหลอดทดลองด้วยจุกยาง บ่มที่ 37-40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม petroleum ether 10 มิลลิลิตร (petroleum ether, LAB-SCAN; Analytical Reagent A.R.) เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (vortex) เป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 นาที นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดเอาของเหลวที่อยู่ในชั้นของ petroleum ether มา 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร ทำให้แห้งซึ่งจะมีปริมาณของโคเลสเตอรอลอยู่ 0.4, 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัม หลังจากนั้นนำไปเติมสารละลายสำหรับพัฒนาสีของโคเลสเตอรอล (Appendix B-10) ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวแสง 560 นาโนเมตร (A_{560}) (BECKMAN DU750 Spectrophotometer) ค่าที่ได้นำไปพลอตกราฟและสมการทำนาย

การวัดปริมาณโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด

นำพลาสมา 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 X 150 มิลลิลิตร เติม alcoholic KOH 10 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (vortex) เป็นเวลา 1 นาที แล้วบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 นาที เก็บของเหลวส่วนที่ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether phase) และทำให้แห้ง (Abell *et al.*, 1951) เติมสารละลายเพื่อการพัฒนาสีของโคเลสเตอรอล (coloring reagent) ทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 560 นาโนเมตร (BECKMAN DU750 Spectrophotometer) (Appendix A-4)

การวัดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดง

นำไข่ต้มจนสุกที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ชั่งน้ำหนักไข่ทั้งฟองและไข่แดง เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ไข่แดงในไข่ไก่ เก็บไข่แดงไว้ในถุงพลาสติกที่มีฝาปิด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาหาปริมาณไขมันและโคเลสเตอรอล (Folch *et al.*, 1951) ชั่งตัวอย่างไข่แดงประมาณ 0.8 กรัม ทำให้ละเอียดและเติมส่วนผสมของ petroleum ether : ethanol (2:1) ในหลอดทดลองพลาสติกที่มีฝาปิด เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex ประมาณ 1 นาที เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำเอาส่วนที่ละลายในส่วนผสมของ petroleum ether : ethanol (2:1) มาระเหยให้แห้ง ชั่งน้ำหนักของไขมันทั้งหมด (total lipid) (Bitman และ Wood, 1980) นำส่วนของไขมันทั้งหมดมาเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรและโปแตสเซียมไฮดร็อกไซด์ที่ละลายในเอธานอล 2.5% นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เติม petroleum ether 12 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex นาน 1 นาทีและน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วย vortex นาน 1 นาทีและนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนที่ละลายใน petroleum ether มาทำให้แห้งสนิทเพื่อหาปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธี colorimetric (Appendix A-5)