

การเตรียมแอนติซีรัมต่อเนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซิน
จากพิษงูเห่าไทย (Naja naja kaouthia)

นางสาว นันทดี สุวรรณบุณย์



ศูนย์วิทยพัชร์พยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534


ISBN 974-579-391-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018914

11๗๑๑๖๑๔๗

PREPARATION OF ANTISERA AGAINST NEUROTOXIN AND CARDIOTOXIN
FROM VENOM OF THAI COBRA (Naja naja kaouthia)



Miss Nantavadee Suwanabun

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School


Chulalongkorn University

1991

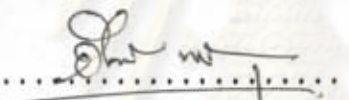
ISBN 974-579-391-4

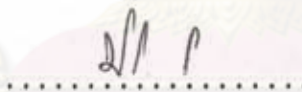
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเตรียมแอนติซีรัมต่อนิวโรทอกซิน และคาร์ดิโอทอกซินจากพิษ
งูเห่าไทย (*Naja naja kaouthia*)
โดย นางสาวนันท์ สวรรณะบุณย์
ภาควิชา ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ

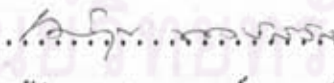
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร รัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันต์ พันธ์ชุกุล)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)


..... กรรมการ
(นางนอมล พักมณี)


..... กรรมการ
(น.สพ. มนตรี เขียวบำรุงเกียรติ)



ชันทวดี สุวรรณบุณย์: การเตรียมแอนติซีรัมต่อพิษงูเห่าและคาร์ดิโอทอกซินจากพิษงูเห่า
ไทย (Naja naja kaouthia) (PREPARATION OF ANTISERA AGAINST NEUROTOXIN
AND CARDIOTOXIN FROM VENOM OF THAI COBRA (Naja naja kaouthia)).

อ.ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ และ น.สพ. มนตรี เขียวป่ารุ้ง เกียรติ,
80 หน้า. ISBN 974-579-391-4

จากการแยกพิษงูเห่าและคาร์ดิโอทอกซินจากพิษงูเห่าไทย (Naja naja kaouthia)
โดยใช้คอลัมน์โบโอเร็กซ์-70 และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์เซฟา เด็กซ์-50 ปรากฏว่าได้พิษงูเห่า
และคาร์ดิโอทอกซินประมาณ 32 และ 27 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในพิษงูเห่าตามลำดับ และพิษงูเห่าที่ได้
มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 7,000 - 8,000 ดาลตัน พิษงูเห่าที่แยกได้มีความเป็นพิษสูงมากเมื่อ
เทียบกับพิษงูเห่า ความเป็นพิษของพิษงูเห่าจะลดลงหลังจากถูกคอนจูเกตกับไทโรโกลบูลิน พิษงูเห่าคอนจู-
เกตสามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่าการใช้พิษงูเห่าอิสระมาก โดยเฉพาะการใช้พิษงูเห่า
พิษงูเห่าคอนจูเกตจะทำให้มีการสร้างแอนติบอดีที่มีไตเตอร์สูงมาก คือมีไตเตอร์อยู่ในระดับ 10^6 โดยวิธี
เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ แอนติพิษงูเห่ามีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของ
พิษงูเห่าไทยได้ดีกว่าแอนติคาร์ดิโอทอกซิน อย่างไรก็ตามการใช้แอนติพิษงูเห่าผสมกับแอนติคาร์ดิโอ-
ทอกซินจะสามารถทำลายความเป็นพิษได้มากกว่าผลรวมของการใช้แอนติพิษงูเห่าแต่ละชนิดแยกกัน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต สุวรรณบุณย์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [Signature]

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาว่า [Signature]

NANTAVADEE SUWANABUN : PREPARATION OF ANTISERA AGAINST NEUROTOXIN AND CARDIOTOXIN FROM VENOM OF THAI COBRA (Naja naja kaouthia).
THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROF. PREEDA CHAISIRI, Ph.D. AND
MONTRI CHIOBAMROONGKIAT, D.V.M., ISBN 974-579-391-4.

Neurotoxin and cardiotoxin were purified from venom of Thai cobra (Naja naja kaouthia) by ion exchange chromatography on Bio-Rex 70 column, followed by gel filtration on Sephadex G-50. About 32% and 27% of total venom protein were neurotoxin and cardiotoxin respectively. The molecular weight of the toxins determined by gel filtration were in the range of 7,000 - 8,000 daltons. The toxicity of purified neurotoxin was greatly increased comparing to crude venom. Neurotoxin and cardiotoxin were detoxified by conjugating to thyroglobulin. A greater antibody response was elicited by toxin-thyroglobulin conjugates than by the free toxins. A higher antibody response was obtained when neurotoxin-thyroglobulin was used for immunization. The highest antibody titer determined by enzyme-linked immunosorbent assay was about 1×10^6 . Antineurotoxin showed a higher neutralization potency than anticardiotoxin. However the combination of those antitoxins could neutralize crude venom with the synergistic effect of the two antibodies.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต พัทธดา สิริสมานกุล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา นพ. /
ลายมือชื่อคณบดีฝ่ายวิชาการ นพ. /
.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้โดยคำแนะนำอย่างดียิ่ง ของ ผศ.ดร. ปรีดา ชัยศิริ และ รศ.ดร.นิคม ชัยศิริ ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือและความเข้าใจ ตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์นี้

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ลัทธิ พณิชกุล ที่ได้กรุณาให้คำชี้แนะและเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ น.สพ มนตรี เชี่ยวบำรุงเกียรติและคุณภมร พักมณี ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.จรรยา บุญวัฒน์ และคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี ที่ได้ให้ความกรุณาและคำชี้แนะต่างๆ ตลอดระยะเวลาการทําวิจัย

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีวเคมี และสภากาชาดไทย สำหรับเครื่องมือและสถานที่ในการทําวิจัย ขอขอบพระคุณ คุณจุฑาทิพ วั่งซ้าย และเจ้าหน้าที่กองวิทยาศาสตร์สภากาชาดไทยทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำเกี่ยวกับสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณ คุณเกสร ประเสริฐสุวรรณ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับรังสี

ขอขอบคุณ คุณกิจจา หุตายนต์ ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณ คุณ บุญยง คำทีระ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมี ในความช่วยเหลือเรื่องต่างๆไป

ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ นิสิตปริญญาชีวเคมี นิสิตเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัยสำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้กำลังใจอันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียนตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. เดมีกันท์ วัสดุกันรั่วและเครื่องมือ	7
3. วิธีทดลอง	
3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับทำนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินให้กับวิธี	9
3.2 สารละลายสำหรับทดสอบสมรรถิการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก	10
3.3 สารละลายสำหรับหาแอดติวิตีของแอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ	10
3.4 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบความบริสุทธิ์ของทอกซินโดยวิธี โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	11
3.5 สารละลายสำหรับทำ เอสดีเอส โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	12
3.6 การเตรียมสารละลายสำหรับติดฉลากนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซิน ด้วยไอโอดีน-125	14
3.7 การเตรียมสารละลายสำหรับทำ เอชเทอโลนีอิมมูโนดิฟฟิวชัน	14
3.8 การเตรียมสารละลายสำหรับหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA	15
3.9 วิธีแยกนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินออกจากหนึ่งๆ โดยคอลัมน์ ไฮโอเร็กซ์-70	16
3.10 การทดสอบสมรรถิการทำให้ เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก	18
3.11 วิธีหาแอดติวิตีของแอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ	19
3.12 การแยกโปรตีนด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ชนิดไม่ต่อเนื่อง	20

3.13	การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเอสดีเอส โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	20
3.14	การหาค่า LD ₅₀	21
3.15	วิธีติดฉลากนิวโรทอกซินและคาร์ดีโอทอกซินด้วยไอโอดีน-125	21
3.16	การเตรียมคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินและคาร์ดีโอทอกซินกับโปรตีนตัวนำ	22
3.17	การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนตินิวโรทอกซินและแอนติคาร์ดีโอทอกซิน	24
3.18	การทำเอาส์เทอโลแกรมโมดิงิวชัน	25
3.19	การหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA	26
3.20	การทดสอบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษ	27
4.	ผลการทดลอง	
4.1	ผลการแยกนิวโรทอกซินและคาร์ดีโอทอกซินออกจากพิษงูเห่า และการทำให้บริสุทธิ์	29
4.2	ผลการทดสอบสมรรถภาพทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก	36
4.3	ผลการหาแอกติวิตีของแอนไซม์เอสไปโลเปส เอในโปรตีนที่แยกจากพิษงูเห่า	36
4.4	ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของทอกซินโดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	36
4.5	ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	39
4.6	ผลการติดฉลากนิวโรทอกซินและคาร์ดีโอทอกซินด้วย ไอโอดีน-125	39
4.7	ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินและคาร์ดีโอทอกซินกับโปรตีนตัวนำ	42
4.8	ผลการทดสอบความเป็นพิษของคอนจูเกต	43
4.9	ผลการหาปริมาณแอนติบอดี	47
4.10	ผลการทดสอบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของแอนติซีรัม	63
5.	วิจารณ์ผลการทดลอง	65
	เอกสารอ้างอิง	72
	ภาคผนวก	77
	ประวัติผู้เขียน	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การวิเคราะห์พีคที่ได้จากการแยกนิมูเก่าโดยคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70	32
2. น้ำพัก โมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและนิวโรทอกซิน หลังผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์จี-50	35
3. น้ำพัก โมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและคาร์ดีโอทอกซิน หลังผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์จี-50	35
4. ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างทอกซินกับโปรตีนตัวนำ.	45
5. ค่า LD ₅₀ นิมูเก่าและทอกซิน	46
6. แอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ของกระต่าย ที่มีไตเตอร์สูงสุดของแต่ละกลุ่ม.	60
7. ผลการทดสอบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของแอนติซีรัม.	64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. การแยกนิวโรทอกซินและคาร์ดีโอทอกซินออกจากพิษงูเห่าไทย โดยคอลัมน์ ไฮโอเร็กซ์-70	31
2. การทำนิวโรทอกซินให้บริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ เซฟา เด็กซ์จี-50	33
3. การทำคาร์ดีโอทอกซินให้บริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ เซฟา เด็กซ์จี-50	33
4. ความสัมพันธ์ระหว่าง K_{m} และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน	34
5. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงกับค่าการดูดกลืนแสง เมื่อเกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง 100%	37
6. รูปแบบการแยกนิวโรทอกซินโดยวิธี โพลีอะครีลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส	38
7. รูปแบบการแยกคาร์ดีโอทอกซินโดยวิธี โพลีอะครีลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส	38
8. รูปแบบการแยกโปรตีนมาตรฐานโดยวิธี เอสดี โพลีอะครีลาไมด์ เจล- อิเล็กโทรโฟเรซิส	40
9. ความสัมพันธ์ระหว่าง R_f กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน	40
10. การแยกนิวโรทอกซินที่ติดฉลากด้วย ไอโอดีน-125 ออกจาก ไอโอดีน-125 อิสระด้วยคอลัมน์ เซฟา เด็กซ์จี-25	41
11. การแยกคาร์ดีโอทอกซินที่ติดฉลากด้วย ไอโอดีน-125 ออกจาก ไอโอดีน-125 อิสระด้วยคอลัมน์ เซฟา เด็กซ์จี-25	41
12. ปริมาณแอนตินิวโรทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยนิวโรทอกซิน (วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน)	49
13. ปริมาณแอนตินิวโรทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย นิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลิน คอนจูเกต (วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน)	50
14. ปริมาณแอนตินิวโรทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย คาร์ดีโอทอกซิน (วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน)	51
15. ปริมาณแอนตินิวโรทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยคาร์ดีโอทอกซิน- ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต (วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน)	52
16. การหาไตเตอร์ของซีรัมกระต่ายโดยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์.	55
17. ปริมาณแอนตินิวโรทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยนิวโรทอกซิน (วิธี ELISA)	56

18. ปริมาณแอนติบอดีไวรัสโคโรนาในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัสโคโรนา-
ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต (วิธี ELISA) 57
19. ปริมาณแอนติคาร์ดิโอทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย คาร์ดิโอทอกซิน (วิธี ELISA) 58
20. ปริมาณแอนติคาร์ดิโอทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยคาร์ดิโอทอกซิน-
ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต (วิธี ELISA) 59
21. รูปแบบการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีร่วมกับพิษชนิดต่างๆ 62



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

Ntx	=	neurotoxin
Ctx	=	cardiotoxin
BSA	=	bovine serum albumin
Tg	=	thyroglobulin
CDI	=	1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide
Ntx-BSA	=	neurotoxin-serum albumin conjugate
Ctx-BSA	=	cardiotoxin-serum albumin conjugate
Ntx-Tg	=	neurotoxin-thyroglobulin conjugate
Ctx-Tg	=	cardiotoxin-thyroglobulin conjugate
Ag	=	antigen
Ab	=	antibody
A	=	absorbance
cpm	=	count per minute
g	=	microgram
ng	=	nanogram
l	=	microlitre
ml	=	millilitre
nm	=	nanometre
ELISA	=	Enzyme-linked Immunosorbent assay