การใช้ไลโปโซมในการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูเห่าไทย

นางสาวจันทนา กาญจนวิลาสกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-155-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019743 i17229688

USE OF LIPOSOMES FOR THE PRODUCTION OF *Naja naja kaouthia* ANTIVENIN

Miss Chantana kanchanawilaskul

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 974-579-155-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้ไลโปโซมในการผลิตเชื้อรุ่มแก้พิษงูเห่าไทย
โดย	นางสาวจันทนา กาญจนวิลาสกุล
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นางสาวจุฑาทิพย์ รังสีทาย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(นางสาวจุฑาทิพย์ รังสีทาย)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

..... กรรมการ

(นางนฤมล พิกมณี)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวเพียงแผ่นเดียว

จันทนา กาญจนวิลาสกุล : การใช้ไลโปโซมในการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูเห่าไทย (USE OF LIPOSOMES FOR THE PRODUCTION OF Naja naja kaouthia ANTIVENIN) อ. ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ยัยคิริ, นางสาวจุฑาทิพย์ วังซ้าย, 103 หน้า. ISBN 974-579-155-5

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เตรียมพิษงูเห่าไทยให้อยู่ภายในไลโปโซมทั้งชนิดเติม และไม่เติมออล์เมียมเทตรอกไซด์โดยวิธีรีเวิร์สเฟล์อีแวพอเรชันพบว่าได้ไลโปโซมทั้งชนิดยูนิลา เมลลาและโอลิโกลา-เมลลา และปรากฏว่ามากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ของพิษงูเห่าถูกห่อหุ้มอยู่ภายในไลโปโซมชนิดเติมออล์-เมียมเทตรอกไซด์ ส่วนไลโปโซมชนิดไม่เติมออล์เมียมเทตรอกไซด์จะห่อหุ้มพิษงูได้น้อยกว่าคือประมาณ 20 - 25 เปอร์เซ็นต์ พิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมจะแสดงความเป็นพิษลดลงอย่างชัดเจน นอกจากนั้นยังพบว่าพิษงูเห่าที่ผสมกับออล์เมียมเทตรอกไซด์จะทำให้ความเป็นพิษลดลงเช่นกัน การเตรียมพิษงูให้อยู่ในรูปไลโปโซมนี้มีผลทำให้สามารถใช้ปริมาณพิษงูเห่าในการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีได้เพิ่มขึ้น โดยที่สัตว์ทดลองไม่ได้รับอันตราย ไลโปโซมชนิดไม่เติมออล์เมียมเทตรอกไซด์ มีแนวโน้มว่าจะสร้างแอนติบอดีได้ในระดับสูงกว่าชนิดเติมออล์เมียมเทตรอกไซด์ ในขณะที่ถ้าใช้พิษงูอิสระจะได้แอนติบอดีค่อนข้างต่ำมาก พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดไลโปโซมทั้งชนิดเติมและไม่เติมออล์เมียมเทตรอกไซด์มีความจำเพาะสูงมาก เซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่เตรียมได้จากไลโปโซมชนิดไม่เติมออล์เมียมเทตรอกไซด์ จะมีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่าได้สูงกว่า (14 LD_{50}) ที่ได้จากไลโปโซมชนิดเติมออล์-เมียมเทตรอกไซด์ (14 LD_{50}) และพิษงูเห่าอิสระ (3 LD_{50})

ได้พัฒนาวิธีเอนไซม์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ขึ้นเพื่อวัดปริมาณพิษงูเห่าในเลือดกระต่าย วิธีนี้มีความไวค่อนข้างสูง คือมีความไวสูงถึง 5 นาโนกรัมพิษงูต่อมิลลิลิตรเซรุ่ม และเป็นวิธีที่มีความแม่นยำและความถูกต้องดีพอสมควร ได้ใช้วิธีนี้สำหรับติดตามวัดปริมาณพิษงูเห่าในเลือดกระต่ายที่เวลาต่าง ๆ กัน หลังจากที่ฉีดไลโปโซมเข้าทางเส้นเลือดดำกระต่ายพบว่าพิษงูเห่าจะถูกปล่อยออกจากไลโป-โซมทีละน้อย การใช้ประโยชน์จากไลโปโซมสำหรับการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองขนาดใหญ่สร้างเซรุ่มแก้พิษงูน่าจะมีความเป็นไปได้สูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

CHANTANA KANCHANAWILASKUL : USE OF LIPOSOMES FOR THE PRODUCTION OF Naja naja kaouthia ANTIVENIN. THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR, PREEDA CHAISIRI, Ph.D., JUTHATIP WANGSAI, 103 PP., ISBN 974-579-155-5

Naja naja kaouthia venom was incorporated into non-osmicated and osimcated liposomes by reverse-phase evaporation. Both unilamella and oligolamella vesicles were obtained. Over 95% of the venom had been entrapped inside the osmicated liposomes whereas only 20 - 25% of the venom was found within the non-osmicated liposomes. The toxicity of the venom could be significantly reduced either by entrapping the venom inside liposomes, or by treating it with osmium tetroxide, thus larger amount of venom could be used for immunization of the experiment animal without harmful. Non-osmicated liposomes tend to elicit higher antibody level than osmicated liposomes. Very low antibody titer was found when free venom was used for the immunization. Antiserum obtained from the injection of both non-osmicated and osmicated liposomes were highly specific. Antivenin prepared by immunizing with non-osmicated liposomes showed higher neutralizing capacity (14 LD_{50}) comparing to osmicated liposomes (7 LD_{50}) and free cobra venom (3 LD_{50}).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the measurement of the venom in the rabbit serum. The sensitivity of the method was fairly high, 5 ng of whole venom for millilitre of serum can be measured. The precision and accuracy of the method were satisfactory. Venom levels in the rabbit serum following the single injection of the liposomes were measured by ELISA. It was found that only a small amount of venom released at any one time. The considerable advantages of the use of liposomes in the immunization of bigger animals would be possible.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา ชัยศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และนางสาวจุฑาทิพย์ วังซ้าย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำช่วยเหลือการทำวิจัยเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ Dr. Roger R.C. New แห่ง Liverpool School of Tropical Medicine, U.K. ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคการเตรียมไลโปโซมโดยวิธีรีเวิร์สเฟสอีแวพอเรชัน

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นิคม ชัยศิริ ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือบางอย่างของหน่วยวิชาชีวเคมี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยและกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณบุญยงค์ คำธีระ ที่ช่วยดูแลสัตว์ทดลองสำหรับการทำวิจัยเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน และเจ้าหน้าที่ห้องสัตว์ทดลองกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่ให้ความช่วยเหลือเรื่องสัตว์ทดลองสำหรับการทำวิทยานิพนธ์นี้มาโดยตลอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ..... ฏ
บทที่
1 บทนำ
2 เคมีภัณฑ์ วัสดุภัณฑ์ และเครื่องมือ
2.1 เคมีภัณฑ์..... 16
2.2 วัสดุภัณฑ์.....17
2.3 เครื่องมือ.....17
2.4 สัตว์ทดลอง.....18
3 วิธีทดลอง
3.1 การเตรียมสารละลาย.....19
3.2 การเตรียมไลโปโซมที่ห่อพิษงูเห่าไว้ภายใน.....22
3.3 การศึกษาลักษณะและขนาดของไลโปโซม.....24
3.4 การหาปริมาณพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซม.....25
3.5 การหาความเป็นพิษของพิษงูเห่า.....26
3.6 การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า.....26
3.7 การหาปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายสร้างขึ้น.....28
3.8 การหาความจำเพาะของแอนติบอดี.....30
3.9 การพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์สำหรับ
หาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย.....31

4 ผลการทดลอง หน้า

4.1 ผลการเตรียมไลโปโซมที่หุ้มพิษงูเห่าไว้ภายใน.....37
4.2 ผลการพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์
สำหรับหาปริมาณพิษงูเห่า.....42
4.3 ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายสร้างขึ้น.....49
4.4 ผลการหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า.....56
4.5 ผลการทดสอบนิวทรัลไลเซชันของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า.....56
4.6 ผลการพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์
สำหรับหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย.....61
4.7 ผลการศึกษาความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของการหา
ปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธี
เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์.....69
4.8 ผลการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มของกระต่าย
หลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในรูปต่าง ๆ.....75
5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....80
เอกสารอ้างอิง.....88
ภาคผนวก.....96
ประวัติผู้เขียน.....103

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ความเป็นพิษของพิษงูเห่าที่อยู่ในรูปต่าง ๆ.....41
2 ค่าไตเตอร์สูงสุดของแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าที่อยู่ในรูปต่าง ๆ 55
3 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์.....59
4 ความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่าของแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ.....60
5 ความแม่นยำของการวัดปริมาณพิษงูในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์.....72
6 ความถูกต้องของการวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์.....74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะของไลโปโซม	13
2	หลักการหาแอนติบอดีโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์	14
3	หลักการหาพิษงูเห่าโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์	15
4	การแยกไลโปโซมออกจากพิษงูเห่าอิสระโดยเซฟฟาโรส 4 บี คอลัมน์	39
5	ลักษณะของไลโปโซมที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน	40
6	ผลความเข้มข้นของคอนจูเกตและของพิษงูเห่าที่ใช้เคลือบเพลท	44
7	ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการเคลือบเพลท	45
8	ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการอินคิวเบตแอนติบอดี กับพิษงูเห่า	46
9	ผลของระยะเวลาสำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกตกับแอนติบอดี	47
10	การหาไตเตอร์ของเซรุ่มกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์	48
11	ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 1 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์	51
12	ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 2 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์	52
13	ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 3 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์	53
14	ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่กระต่ายกลุ่มที่ 4 สร้างขึ้นหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์	54
15	ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน	58
16	ปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าของกระต่ายหลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าผสมกับแอดจูแวนท์	63

รูปที่ หน้า

17 การแยก IgG โดยโปรตีน เอ เซฟฟาโรสซีแอล-4บีคอลัมน์.....64
18 ผลของความเข้มข้นของ IgG ที่ใช้เคลือบเพลทและของคอนจูเกต.....65
19 ผลของระยะเวลาที่ใช้เคลือบเพลทด้วย IgG.....66
20 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการอินคิวเบตพิษงูเห่ากับ IgG....67
21 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการอินคิวเบตคอนจูเกต
กับพิษงูเห่า.....68
22 กราฟมาตรฐานของพิษงูเห่า.....70
23 การหาความไวของการหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธี
เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์.....71
24 ปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายกลุ่มที่ 1 หลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ใน
ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์.....77
25 ปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายกลุ่มที่ 2 หลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ใน
ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์.....78
26 ปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายกลุ่มที่ 3 หลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่า
ซึ่งละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์.....79
27 กราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยวิธีของ Lowry.....102

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

BSA	=	bovine serum albumin
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
LD_{50}	=	lethal dose 50
iv	=	intravenous
id	=	intradermal
IgG	=	immunoglobulin
Ag	=	antigen
Ab	=	antibody
M	=	mole/litre
µg	=	microgram
ng	=	nanogram
ul	=	microlitre
ml	=	millilitre
nm	=	nanometer
A	=	absorbance
SD	=	standard deviation
EDTA	=	Ethylenediaminetetra-acetic acid
RT	=	room temperater

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย