การตรวจหาชนิดของพิษงูกะปะ *Calloselasma rhodostoma* และพิษงูเห่า *Naja kaouthia* ด้วยวิธีดอต-อิไลซา

นายกิตติพันธุ์ รุ่งเรืองสาร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-171-538-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF SNAKE VENOM FROM *Calloselasma rhodostoma* AND *Naja kaouthia*

BY DOT-ELISA

Mr. Kittiphan Rungruangsarn

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-171-538-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจหาชนิดของพิษงูกะปะ *Calloselasma rhodostoma* และพิษงูเห่า *Naja kaouthia* ด้วยวิธีดอต-อิไลซา

โดย นายกิตติพันธุ์ รุ่งเรืองสาร

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คุณนฤมล พักมณี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(คุณนฤมล พักมณี)

....กรรมการ

(ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายกิตติพันธุ์ รุ่งเรืองสาร : การตรวจหาชนิดของพิษงูกะปะ *Calloselasma rhodostoma* และพิษงูเห่า *Naja kaouthia* ด้วยวิธีดอต-อิไลซา. (DETECTION OF SNAKE VENOM FROM *Calloselasma rhodostoma* AND *Naja kaouthia* BY DOT-ELISA) อ.ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง, คุณนฤมล พักมณี, 88 หน้า. ISBN 974-171-538-2

การรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดโดยการให้เซรุ่มที่จำเพาะต่อพิษงูนั้นจำเป็นจะต้องทราบชนิดของพิษงูที่แน่นอน วิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบชนิดของพิษงู คือการใช้ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) แต่เทคนิคนี้มีข้อเสียคือใช้เวลานานและต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจพิษงูโดยเทคนิคดอต-อิไลซาบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้พิษงูกะปะ *Calloselasma rhodostoma* และพิษงูเห่า *Naja kaouthia* เป็นต้นแบบ, ได้มีการปรับเปลี่ยนตัวแปรต่างๆ ได้แก่วิธีการทำแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูให้บริสุทธิ์, เวลาของการบ่มและล้าง, ปริมาตรและความเข้มข้นของรีเอเจนต์และสับสเตรตสำหรับการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ที่ใช้จนกระทั่งได้สภาวะที่เหมาะสม ผลการศึกษาด้วยวิธีดอต-อิไลซาสามารถตรวจระดับพิษงูกะปะได้ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและตรวจระดับพิษงูเห่าได้ที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) ระหว่างพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ระดับพิษ 0.2-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับวิธี ELISA ที่ทำในไมโครเพลต ซึ่งตรวจระดับพิษงูกะปะและพิษงูเห่าได้ที่ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่ามาก อย่างไรก็ตามวิธีดอต-อิไลซาที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้เวลาตรวจสอบสั้นและไม่ต้องการเครื่องมือราคาแพงจึงอาจนำไปใช้ในภาคสนามได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต ....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

4372212023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORD: DOT-ELISA / *Calloselasma rhodostoma / Naja kaouthia*

KITTIPHAN RUNGRUANGSARN : DETECTION OF SNAKE VENOM FROM *Calloselasma rhodostoma* AND *Naja kaouthia* BY DOT-ELISA. THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF. TIRAYUT VILAIVAN. Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. SUPASORN WANICHVECHARUNGRUANG. Ph.D., NARUMOL PAKMANEE, M.Sc., 88 pp. ISBN 974-171-538-2

Treatment of snake-bite using species-specific antivenoms requires identification of the snake venom. One method to achieve this is to use ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) technique. However, this method has some disadvantages including long incubation time and the requirement of expensive instruments. The objective of this study is to develop a practical method for detection of snake venom by dot-ELISA on nitrocellulose paper using *Calloselasma rhodostoma* and *Naja kaouthia* venoms as models. Several parameters including purification method of anti-venom IgG, time for incubation and washing, volume and concentration of reagents and substrate for enzymatic detection were optimized. The sensitivity of the detection was 5 μg/mL for *Calloselasma rhodostoma* and 1 μg/mL for *Naja kaouthia*. No cross-reaction between the two snake venoms was observed between 0.2-25 μg/mL. For comparison, the same ELISA were performed in microtiter plates and showed detection limit of 1 ng/mL for *Calloselasma rhodostoma* and *Naja kaout*hia venoms. In spite of poorer sensitivity, the developed dot-ELISA technique is much less time consuming and requires no special instrument which might be advantageous for field-test.

Department Biotechnology	Student's ....
Field of study Biotechnology	Advisor's ....
Academic year 2002	Co-advisor's ....
	Co-advisor's ....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากผู้เกี่ยวข้องหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ เป็นอย่างสูงที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยด้วยดีตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นและรับผู้วิจัยเข้ามาศึกษาในสถาบันแห่งนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณนฤมล พักมณี หัวหน้าฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทยที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ในงานวิจัยและให้สถานที่อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์พร้อมทั้งให้คำแนะนำและการตรวจแก้ไขให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคุณอรวรรณ แซ่โค้ว และDr.Tomotsu Omori-Satoh เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและที่ปรึกษา ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภาที่ให้ความช่วยเหลือ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์และใช้อุปกรณ์สารเคมีบางอย่างในงานวิจัย ขอขอบพระคุณ ศ.กิตติคุณ นพ.วิศิษฏ์ สิตปรีชา ผู้อำนวยการสถานเสาวภาที่อนุญาตให้ผู้วิจัยใช้ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ฝ่ายวิจัยและพัฒนาในการปฏิบัติงานวิจัยและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา ที่ให้ความช่วยเหลือความสะดวกของสถานที่ในการปฏิบัติงานการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ นสพ.สุรศักดิ์ เอกโสวรรณ หัวหน้าหน่วยสถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯสถานเสาวภาที่ให้ความเอื้อเฟื้อพลาสมาของม้าที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและขอขอบคุณฝ่ายบริการโลหิตสภากาชาดไทยที่เอื้อเฟื้อซีรั่มของคนเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่คอยสนับสนุนให้กำลังใจตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ผู้วิจัยในหลายด้าน ขอขอบคุณพี่น้องในครอบครัว ตลอดจนเพื่อนสนิทมิตรสหายทุกคนที่ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษาตลอดมา ทำให้ผู้วิจัยสำเร็จงานวิจัยได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย........ ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ........ จ

กิตติกรรมประกาศ........ ฉ

สารบัญ........ ช

สารบัญตาราง........ ญ

สารบัญรูป........ ฎ

คำย่อ........ ฑ

บทที่

1 บทนำ

สารประกอบในพิษงู........ 5

อาการผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากงูในกลุ่มต่าง ๆ 7

การตรวจวินิจฉัยและการรักษา........ 8

ขอบเขตการวิจัย........ 12

2 วิธีการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง........ 13

สารเคมี........ 13

วิธีการทดลอง........ 15

1. การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงู........ 15

1.1 การแยกแกมมาโกลบูลินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ion-exchange chromatography........ 15

1.1.1 การแยกโกลบูลินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต........ 15

1.1.2 การแยกแกมมาโกลบูลินให้บริสุทธิ์โดยวิธีIon-exchange chromatography........ 15

1.2 การแยกแกมมาโกลบูลินโดยวิธี Affinity chromatography 17

1.2.1 การเตรียม Affinity column 17

1.2.2 การแยกแกมมาโกลบูลินโดยวิธี Affinity chromatography........ 18

1.3 การตรวจสอบแกมมาโกลบูลิน 19

1.3.1 โดยวิธี Immunodiffusion test........ 19

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

1.3.2 โดยวิธี SDS-PAGE………………………………………………. 20

2. วิธีการติดฉลากและการตรวจสอบการติดฉลากแกมมาโกลบูลินด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต ……………………………………………... 21

2.1 วิธีการติดฉลากคอนจูเกต……………………………………………... 21

2.2 การตรวจสอบคอนจูเกตโดยวิธี ELISA…………………………..…. 22

3. การตรวจหาชนิดของพิษงู โดยวิธี dot-ELISA ……………………….……….… 23

3.1 การหาชนิดของพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกด้วยวิธี Ion-exchange chromatography………………………………………………….…. . 24

3.2 การหาชนิดของพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกด้วยวิธี Affinity chromatography…………………………………………………..…. 24

3.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสม…………………………..…... 24

3.2.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม…………………….……... 25

3.2.3 การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสม………………………..... 25

3.2.4 การทดสอบหาสับสเตรตที่เหมาะสม……………….……….. 26

4. การทดสอบดูปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction)……………………………... 27

5. เปรียบเทียบการตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี ELISA และวิธี dot-ELISA…….. 27

5.1 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี ELISA………………………..…. 27

5.2 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี dot-ELISA…………………….…….. 28

3 ผลการทดลอง

1. การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงู ……………..……………………….. 29

1.1 การแยกแกมมาโกลบูลินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ion-exchange chromatography……………………….……… 29

1.2 การแยกแกมมาโกลบูลินโดยวิธี Affinity chromatography………….. 29

1.3 การตรวจสอบแกมมาโกลบูลิน……………………………………… 35

1.3.1 โดยวิธี Immunodiffusion test …………………………..…..... 35

1.3.2 โดยวิธี SDS-PAGE………………………………….…....…. 38

2. การแยกคอนจูเกตโดยวิธี Gel filtration chromatography และการตรวจสอบคอนจูเกตโดยวิธี ELISA………………………………………………… 40

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาชนิดของพิษงูโดยวิธี dot-ELISA…………… 50

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3.1 การตรวจสอบพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้จาก
วิธี Ion-exchange chromatography………………………….………… 50

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาชนิดของพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลิน
ที่แยกได้จากวิธี affinity chromatography…………………………..…… 51

3.2.1 การหาความเจือจาง………………………………….…….……. 51

3.2.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม…………………………..…. 53

3.2.3 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสม…………………….………... 56

3.2.4 การทดสอบหาสับสเตรตที่เหมาะสม………………………….60

4. การทดสอบดูปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction)……………………..……… 62

5. การเปรียบเทียบการตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี ELISA และวิธี dot-ELISA.. 64

5.1 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี ELISA………………..………. 64

5.2 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี dot-ELISA ………..……….…. 66

4 สรุปผลการทดลอง……………………………………………………..………. 72

รายการอ้างอิง…………………………………………………………...…………. 73

ภาคผนวก…………………………………………………………..……………… 81

วิธีเตรียมสารเคมี……………...………………………..………………………. 82

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ……………………………………………..……………….. 88

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 เอนไซม์ต่างๆ ที่พบในพิษงู.. 6

3.1 สภาวะที่เหมาะสมของวิธี dot-ELISA ในการตรวจหาชนิดของพิษงูกะปะ....................... 61

3.2 สภาวะที่เหมาะสมของวิธี dot-ELISA ในการตรวจหาชนิดของพิษงูเห่า........................... 61

3.3 ไตเตอร์ (titer) ที่ตรวจสอบพิษงูกะปะโดยวิธี ELISA... 64

3.4 ไตเตอร์ (titer) ที่ตรวจสอบพิษงูเห่าโดยวิธี ELISA.. 65

3.5 การเปรียบเทียบการหาชนิดของพิษงูกะปะด้วยวิธี ELISA และ dot – ELISA.................. 70

3.6 การเปรียบเทียบการหาชนิดของพิษงูเห่าด้วยวิธี ELISA และ dot – ELISA...................... 70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	งูเห่าเป็นงูในวงศ์ Elapidae	3
1.2	งูแมวเซาเป็นงูในวงศ์ Viperidae	3
1.3	งูกะปะเป็นงูในวงศ์ Crotalidae	4
1.4	งูทะเลเป็นงูในวงศ์ Hydrophidae	4
1.5	ขั้นตอนการแข็งตัวของเลือด (clot) และการเกิดภาวะเลือดออก	7
2.1	กราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA	17
2.2	การเตรียม Affinity column	18
2.3	agarose gel plate สำหรับใช้ตรวจสอบแกมมาโกลบูลินโดยวิธี Immunodiffusion test	20
2.4	ชุดอุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซีส	21
2.5	ขั้นตอนการทดสอบโดยวิธี dot-ELISA	23
3.1	การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ โดยวิธี Ion-exchange chromatography	31
3.2	การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า โดยวิธี Ion-exchange chromatography	32
3.3	การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ โดยวิธี Affinity chromatography	33
3.4	การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า โดยวิธี Affinity chromatography	34
3.5	การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี Ion-exchange Chromatography	36
3.6	การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี Affinity Chromatography	37
3.7	การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินโดยวิธี SDS-PAGE	39
3.8	การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (โดยวิธี Ion- exchange chromatography) - เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี Gel filtration chromatography	42
3.9	การทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (โดยวิธี Ion - exchange chromatography) - เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี ELISA	43
3.10	การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี Ion - exchange chromatography) - เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี Gel filtration chromatography	44

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.11 การทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี Ion exchange chromatography) - เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี ELISA 45

3.12 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (โดยวิธี affinity chromatography) - เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี Gel filtration chromatography 46

3.13 การทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (โดยวิธี affinity chromatography) - เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี ELISA 47

3.14 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี affinity chromatography) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี Gel filtration chromatography 48

3.15 การทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี affinity chromatography) - เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี ELISA 49

3.16 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี Ion-exchange chromatography 51

3.17 ผลของการใช้คอนจูเกตที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่เจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ 54

3.18 ความเข้มข้นของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่ใช้เคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส 54

3.19 สภาวะอุณหภูมิต่างๆ ในการบ่มหลังขั้นตอนการเติมแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ 55

3.20 สภาวะอุณหภูมิต่างๆ ในการบ่มหลังขั้นตอนการหยดพิษงูกะปะ 55

3.21 ระยะเวลาต่างๆในการบ่มแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ 57

3.22 ระยะเวลาต่าง ๆ ในการบ่มพิษงูกะปะ 57

3.23 ระยะเวลาต่าง ๆ ในการบ่มกระดาษไนโตรเซลลูโลสในคอนจูเกต 59

3.24 ระยะเวลาต่าง ๆ ในการล้างกระดาษไนโตรเซลลูโลส 59

3.25 ขั้นตอนการตรวจสอบพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA 60

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.26 การตรวจสอบพิษงูกะปะ (MPV) และพิษงูเห่า (CV) บนกระดาษที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ 62

3.27 การตรวจสอบพิษงูเห่า (CV) และพิษงูกะปะ (MPV) บนกระดาษที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า 63

3.28 การตรวจสอบพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ละลายใน PBS 67

3.29 การตรวจสอบพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ละลายในซีรั่มคนปกติ 67

3.30 ระดับความเข้มของจุดสีมาตรฐาน 68

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

BSA	Bovine Serum Albumin
ELISA	Enzyme – Linked Immunosorbent Assay
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Gammaimmunoglobulin
M	Molar
mg	milligram
ml	millilitre
μl	microlitre
μg	microgram
^{o}C	degree Celcius
NSS	Normal Saline Solution
O.D.	Optical Density
PBS	Phosphate Buffer Saline
SAS	Saturated Ammonium Sulfate
SDS – PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	N, N, N’, N’, - tetramethyl ethylenediamine
MPV	Malayan pit viper venom
CV	Cobra venom

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

หากกล่าวถึงอันตรายที่มนุษย์ได้รับจากสัตว์ต่าง ๆ ทั้งสัตว์มีพิษและสัตว์ไม่มีพิษย่อมเป็นที่รู้กันดีว่า งูพิษเป็นสัตว์มีพิษที่อันตรายและมีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุดชนิดหนึ่ง งูพิษสามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศและทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา (Warrell, 1993) ในบริเวณป่า ทุ่งหญ้า รวมทั้งในที่ชุมชนแออัดและที่รกร้างก็มักพบได้

งูเป็นสัตว์เลื้อยคลานเลือดเย็น อยู่ใน Class reptilia, Order squamata งูมีลักษณะเฉพาะตัว คือ ลำตัวกลมยาวโค้งงอได้ ส่วนที่ห่อหุ้มภายนอกตัวงู เป็นผิวหนังที่มีเกล็ดปกคลุมโดยตลอด งูไม่มีเยื่อเปิด ปิดตา แต่มีคราบใสครอบตา ไม่มีขาหรือช่องหูรับเสียง สามารถเคลื่อนตัวได้อย่างอิสระ ฟันของงูจะโค้งเข้าในไว้สำหรับยึดจับตัวเหยื่อเป็นอาหาร ปากของงูจะมีกล้ามเนื้อที่สามารถยืดขยายปากให้กว้างกว่าปกติเวลากินอาหาร มันจึงกลืนสัตว์ขนาดใหญ่ได้ทั้งตัว โดยทั่วไปสามารถจำแนกงูออกเป็นงูพิษและงูไม่มีพิษ งูพิษจะมีลักษณะแตกต่างจากงูไม่มีพิษคือ งูพิษจะมีลักษณะหัวเป็นรูปสามเหลี่ยม จะมีเขี้ยวพิษและรูตาดำ (pupil) เป็นรูปวงรี ส่วนงูไม่มีพิษจะมีรูตาดำเป็นรูปวงกลม การตรวจสอบบาดแผลของผู้ป่วยที่ถูกงูกัดสามารถบ่งชี้ได้ว่าผู้ป่วยโดนงูพิษกัดหรือไม่ โดยบริเวณที่ถูกงูพิษกัดจะเป็นรอยเขี้ยวและอาจมีเลือดออกที่บาดแผลได้ หากเป็นงูไม่มีพิษกัด จะพบว่าบริเวณแผลจะเป็นรอยฟันของงูเท่านั้น ไม่มีรอยของเขี้ยวพิษ ในขณะที่งูพิษกัดเหยื่อ กล้ามเนื้อในบริเวณรอบต่อมพิษจะบีบตัว ทำให้พิษถูกปล่อยออกมาจากต่อมพิษ (venom gland) แล้วส่งผ่านท่อนำพิษไปยังบริเวณแผลและหากได้รับการรักษาไม่ทันเวลา อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้

งูมีถิ่นอาศัยอยู่ทั่วโลก ในปัจจุบันมีทั้งหมด 23 วงศ์ (Families) ประมาณเกือบ 3,000 ชนิด แบ่งเป็นงูพิษ, งูพิษอ่อนและงูไม่มีพิษ งูพิษอันตรายส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในประเทศเขตร้อน งูที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในประเทศไทย จำแนกได้ 162 ชนิด เป็นงูพิษ 10 ชนิด งูพิษอ่อน 23 ชนิด งูทะเลพิษ 22 ชนิด งูทะเลพิษอ่อน 2 ชนิด นอกนั้นเป็นงูที่ไม่มีพิษ (วิโรจน์, 2514) ในการจำแนกงูพิษนั้นสามารถจำแนกได้ทั้งหมด 4 วงศ์ (family) ดังนี้

1. วงศ์ Elapidae งูในกลุ่มนี้ที่สำคัญ ได้แก่

งูเห่า (Cobra) Genus: *Naja* เป็นงูที่มีพิษรุนแรงที่สุด ซึ่งสามารถจำแนกได้หลายพันธุ์ งูเห่าสามารถแผ่แม่เบี้ยได้ โดยการตั้งส่วนหัวและคอขึ้น แล้วแผ่กางส่วนคอให้ขยายออกไป (ไพบูลย์, 2539) ชอบอาศัยอยู่ตามพื้นราบชื้น มีหญ้าปกคลุมหรือตามทุ่งนา ออกหากินในเวลาพลบค่ำกินอาหารทั้งหนู นก กบ เขียด รวมทั้งงูที่มีขนาดเล็กกว่า (Viravan et al., 1992) พบได้ทุกภาคของประเทศ (รูปที่ 1.1)

งูจงอาง (King cobra) Genus: *Ophiophagus* เป็นงูพิษที่มีขนาดยาวและใหญ่ที่สุด สามารถแผ่แม่เบี้ยได้เหมือนงูเห่า แต่ส่วนหัวและแม่เบี้ยจะมีขนาดเล็กกว่างูเห่า ตามปกติงูจงอางจะอาศัยอยู่ตามพื้นดิน บริเวณป่าทึบและแถบภูเขา ออกหากินทั้งในเวลากลางวันที่แดดไม่ร้อนจัดและพลบค่ำ กินสัตว์เลื้อยคลานและงูขนาดเล็กกว่าเป็นอาหาร พบมากในภาคใต้

งูสามเหลี่ยม (Banded krait) Genus: *Bungarus* ลักษณะลำตัวเป็นรูปสามเหลี่ยมโดยมีสันอยู่กลางหลัง มีลายเป็นปล้อง ๆ สลับสี ออกหากินเวลากลางคืน กินกบ เขียด หนู และงูที่มีขนาดเล็กกว่า

2. วงศ์ Viperidae งูในกลุ่มนี้ ได้แก่

งูแมวเซา (Russell's viper) ลักษณะลำตัวค่อนข้างอ้วน ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน มีลายเป็นวงใหญ่ สีน้ำตาลเข้มทั้งตัว อาศัยอยู่ตามทุ่งหญ้า หุบเขา ชอบนอนขดตัวตามทุ่งนาและซอกหิน โดยปกติจะเคลื่อนตัวช้า ออกหากินเวลากลางคืน กินนก หนู เขียดเป็นอาหาร พบมากในภาคกลางของประเทศไทย (รูปที่ 1.2)

3. วงศ์ Crotalidae งูในกลุ่มนี้ ได้แก่

งูกะปะ (Malayan pit viper) ลักษณะลำตัวยาวไม่เกิน 1 เมตร หัวเป็นรูปสามเหลี่ยมค่อนข้างใหญ่ ลำตัวสีน้ำตาล มีลายรูปขนมเปียกปูนตลอดลำตัว ปลายหางเล็กและแหลม อาศัยตามพื้นดินในซอกหิน ชอบนอนขดตัวนิ่ง ๆ ออกหากินเวลาพลบค่ำ กินหนู นก เขียด เป็นอาหาร พบมากในภาคใต้และทางฝั่งทะเลตะวันออกของประเทศไทย (รูปที่ 1.3)

งูเขียวหางไหม้ (Green pit viper) ส่วนหัวเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดโตกว่าส่วนคอ ลำตัวเรียวยาว ส่วนใหญ่มีสีเขียวคล้ายใบไม้ อาศัยบนต้นไม้ กินนก กิ้งก่าเป็นอาหาร

4. วงศ์ Hydrophidae งูในกลุ่มนี้ ได้แก่

จำนวนกลุ่มของงูทะเล (Sea snakes) ลำตัวมีรูปร่างและขนาดต่างกันไป ไม่มีเหงือกและต้องขึ้นมาเหนือผิวน้ำเพื่อรับอากาศหายใจแต่ตัวมันสามารถสำรองอากาศไว้ใช้ได้หลายชั่วโมงส่วนหางมีลักษณะเป็นใบพาย กินปลาเป็นอาหาร อาศัยในทะเลและทะเลสาบ (Watt and Theakston, 1985) พิษของงูทะเลนี้มีความรุนแรงแต่หากได้รับการรักษาทันเวลาก็สามารถช่วยชีวิตได้ (Rawat et al., 1994) งูทะเลที่พบในทะเลไทย เช่น งูอ้ายงั่ว, งูแสมรังลายคราม, งูคออ่อน เป็นต้น (รูปที่ 1.4)

รูปที่ 1.1 งูเห่าเป็นงูในวงศ์ Elapidae (ไพบูลย์, 2539)

รูปที่ 1.2 งูแมวเซาเป็นงูในวงศ์ Viperidae (ไพบูลย์, 2539)

รูปที่ 1.3 งูกะปะเป็นงูในวงศ์ Crotalidae (ไพบูลย์, 2539)

รูปที่ 1.4 งูทะเลเป็นงูในวงศ์ Hydrophidae (ไพบูลย์, 2539)

สารประกอบในพิษงู

ในพิษงูมีสารประกอบหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีน โดยพิษงูมากกว่า 90 % ของน้ำหนักแห้งเป็นโพลีเพปไทด์ (polypeptides) ประกอบด้วย เอนไซม์, พิษ และสารประกอบอื่น ๆ (Harvey, 1991) ซึ่งจะใช้ในการฆ่าเหยื่อและช่วยย่อยอาหาร พิษของงูแต่ละตัวจะมีปริมาณและความแรงของพิษแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับอายุ เพศ และถิ่นที่อยู่อาศัย

ส่วนประกอบในพิษงูที่เป็นโปรตีนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พิษ (toxins) และเอนไซม์ (enzymes)

พิษงู (toxins) เป็นสารประกอบโปรตีนซับซ้อนมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน แต่โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 20 กิโลดาลตัน เช่น พวกเพปไทด์ (peptides), นิวคลีโอไซด์ (nucleosides), และ metal ion โดยจำนวนของสารประกอบที่มีในพิษไม่ทราบแน่ชัด เมื่อได้รับพิษงู พิษจะเข้าไปทำลายเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ก่อให้เกิดผลต่อระบบประสาทที่ควบคุมการทำงานของหัวใจและกล้ามเนื้อ (Lalloo et al., 1994) โดยอาการจะแสดงมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณของพิษงูที่ได้รับเข้าไป พิษของงูในกลุ่ม Elapidae จะมีปริมาณของพิษในส่วนนี้มากโดยเฉพาะงูเห่า (Lipps, 1998)

ส่วนประกอบของพิษที่มีผลต่อระบบประสาท (Neurotoxin) สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามตำแหน่งที่พิษเข้าไปทำปฏิกิริยา ได้แก่ postsynaptic neurotoxin และ presynaptic neurotoxin

Postsynaptic neurotoxin พิษจะจับกับ nicotinic acetylcholine receptor ที่ motor end plate ทำให้ acetylcholine ไปจับที่ motor end plate ไม่ได้ acetylcholine จึงไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ ทำให้ปลายประสาทไม่สั่งงาน ส่งผลให้กล้ามเนื้อหยุดทำงานของ พิษในกลุ่มนี้ เช่น Curaremimetic toxin

Presynaptic neurotoxin พิษจะไปจับที่ nerve terminal ทำให้ไม่สามารถปล่อย acetylcholine ออกมาได้ การไปยับยั้งการไหลของ acetylcholine นี้ทำให้ผู้ถูกงูกัดตาย เนื่องจากการเป็นอัมพาตของกล้ามเนื้อหัวใจ (paralysis) ทำให้การทำงานของหัวใจล้มเหลวนอกจากนี้ยังก่อให้เกิดพิษต่อกล้ามเนื้อ ทำให้เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อถูกทำลาย (Karlsson, 1979) ซึ่งพิษส่วนนี้จะทำให้สัตว์ที่ได้รับมีอัตราการตายสูงกว่าพิษ Postsynaptic neurotoxin พิษในกลุ่มนี้เช่น notexin จากงู Australian tiger snake, Taipoxin จากงู Australian taipan, Crotoxin จากงู South American rattle snake และ β-Bungarotoxin จากงู *Bungarus multicinctus*

เอนไซม์ (enzymes) เป็นโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าพิษ แต่สามารถทนความร้อนได้ต่ำกว่าพิษ (Rangel-Santos and Mota, 2000) เอนไซม์ที่พบในพิษงูมี 26 ชนิด (Iwanaga and Suzuki, 1979) ที่พบในงูพิษทุกกลุ่มมี 12 ชนิด ดังตารางที่ 1.1 แต่ปริมาณของเอนไซม์ในงูพิษแต่ละตัวจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะของงู เช่น อายุ ที่อยู่อาศัย ชนิดของงู เป็นต้นและเหตุผลที่งูแต่ละ

ตัวมีปริมาณเอนไซม์ต่างกันไปยังไม่สามารถอธิบายได้ง่ายนัก (Lee, 1979) โดยทั่วไปงูแต่ละกลุ่มมักมีชนิดของเอนไซม์ที่ต่างกัน เช่น acetylcholinesterase ไม่พบในงูกลุ่ม Viperid และ Crotalid (Lee, 1979)

ตารางที่ 1.1 เอนไซม์ต่างๆ ที่พบในพิษงู

Enzymes found in all snake venoms
Phospholipase A_2 (3.1.1.4), L-Amino acid oxidase (1.4.3.2), Phosphodiesterase (3.1.4.1), 5'-Nucleotidase (3.1.3.5), Phosphomonoesterase (3.1.3.2), Deoxyribonuclease (3.1.4.6), Ribonuclease (2.7.7.16), Adenosine triphosphatase (3.6.1.8), Hyaluronidase (4.2.99.1), NAD-nucleosidase (3.2.2.5), Arylamidase, Peptidase
Enzymes found in crotalid and viperid venoms
Endopeptidase, Arginine ester hydrolase, Kininogenase (3.4.4.21), Thrombinlike enzyme, Factor X activator, Prothrombin activator
Enzymes found mainly in elapid venoms
Acetylcholinesterase (3.1.1.7), Phospholipase B (3.1.1.5), Glycerophosphatase
Enzymes found in some venoms
Glutamic-pyruvic transaminase (2.6.1.2), Catalase (1.11.1.6), Amylase (3.2.1.1), β-Glucosaminidase, Lactate dehydrogenase (1.1.1.27), Heparinaselike enzyme

ที่มา: Iwanaga และ Suzuki, 1979

ผลของเอนไซม์ ก่อให้เกิดผล 3 ประการ

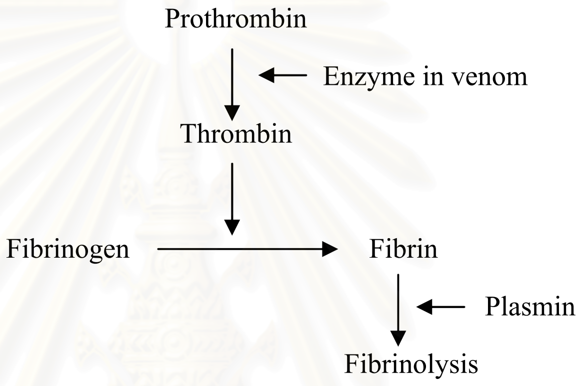
1. ทำให้เกิดเนื้อเยื่อตาย (necrosis) (Borkow, Gutierrez, and Ovadia, 1997) ได้แก่เอนไซม์ proteases, phospholipase, arginine ester hydrolases และ hyaluronidase

2. ทำให้การทำงานของระบบเลือดผิดปกติ ทำให้เลือดจับตัวเป็นลิ่ม (coagulation) และเลือดไม่แข็งตัว ได้แก่ เอนไซม์ proteases ต่าง ๆ และ phospholipase A

3. ก่อให้เกิดความดันโลหิตต่ำเฉียบพลัน (acute hypotension) และเกิดอาการปวดเนื่องจากการปล่อยสารบางชนิดได้แก่ kininogenase (kinin-releasing enzyme)

กลไกการทำงานของเอนไซม์ในพิษงูที่ทำให้เกิดภาวะเลือดออก โดยเอนไซม์ในพิษงูจะรวมกับ Prothrombin ทำให้เกิดเป็น Thrombin ส่วน Thrombin จะไปเปลี่ยน Fibrinogen ในพลาสมาไปเป็น Fibrin แล้วทำให้เลือดเกิดการแข็งตัว (clot) ขึ้น เมื่อเลือดแข็งตัวมากขึ้นทำให้จำนวนของ Fibrinogen ในพลาสมาลดลง Plasmin จะไปย่อย Fibrin ทำให้เกิด Fibrinolysis ดังรูปที่ 1.5 ทำให้เกิดภาวะเลือดออกมากขึ้นเนื่องจากใช้ปัจจัยต่างๆที่ทำให้มีการแข็งตัวของเลือดหมดไป

เอนไซม์ในพิษงูมีความคงทน (stability) สูงเมื่อเก็บในสภาพแห้ง (lyophilized) และสามารถเก็บได้ 17–39 ปี ในอุณหภูมิห้อง โดยแอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์ยังคงเดิม (Iwanaga and Suzuki, 1979)



รูปที่ 1.5 ขั้นตอนการแข็งตัวของเลือด (clot) และการเกิดภาวะเลือดออก

อาการผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากงูในกลุ่มต่างๆ

พิษงูแต่ละชนิดจะมีผลต่อระบบการทำงานของร่างกายที่เด่นชัดแตกต่างกันไป ดังนั้นผู้ป่วยที่ถูกงูกัดจะแสดงอาการที่แตกต่างกัน แล้วแต่ชนิดของงูที่กัด ซึ่งสามารถจำแนกอาการของผู้ป่วยได้ดังนี้

อาการทางระบบประสาท ส่วนใหญ่จะเกิดกับผู้ป่วยที่ถูกงูในกลุ่ม Elapidae กัด ฤทธิ์ของพิษงูในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์รุนแรงต่อระบบประสาท โดยผู้ป่วยจะแสดงอาการเริ่มจาก ตาพร่า หนังตาตก ลืมตาไม่ขึ้น พูดจาไม่ชัด กลืนน้ำและอาหารลำบาก กล้ามเนื้อหลอดอาหารเป็นอัมพาต คลื่นไส้อาเจียน หายใจไม่สะดวก และเสียชีวิต เนื่องจากการหายใจล้มเหลว

อาการทางระบบโลหิต ฤทธิ์ของพิษงูในกลุ่ม Viperlidae และ Crotalidae นี้จะออกฤทธิ์รุนแรงต่อระบบโลหิต ในพิษงูของงูกลุ่มนี้จะมีปริมาณเอนไซม์อยู่มาก โดยผู้ป่วยที่ถูกงูกัดจะแสดงอาการปวดบริเวณแผลที่ถูกกัด มีเลือดออกที่แผล เหงือก ทางเดินอาหารและปัสสาวะเป็นเลือดไอ

หรืออาเจียนเป็นเลือด เลือดไม่แข็งตัว และมักเสียชีวิตเนื่องจากเลือดออกในสมอง (Warrell, 1992) และไตวายเฉียบพลัน (Burdmann et al., 1993)

อาการทางระบบกล้ามเนื้อ ฤทธิ์ของพิษงูในกลุ่ม Hydrophidae จะออกฤทธิ์รุนแรงต่อระบบกล้ามเนื้อ (myotoxic) ทำให้ผู้ป่วยที่ถูกงูในกลุ่มนี้กัด จะแสดงอาการปวดกล้ามเนื้อทั่วไป (muscular pain) หรืออาจถึงกับเป็นอัมพาตบางส่วน ปริมาณปัสสาวะลดน้อยลงและมีสีเข้มขึ้น หายใจลำบาก ผู้ป่วยมักเสียชีวิตจากการหายใจล้มเหลวและภาวะไตวาย

การตรวจวินิจฉัยและการรักษา

การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดนั้น แพทย์จะดูจากแผลที่ถูกกัด หากมีจุดลึก 2 จุดที่แผลก็แสดงว่าเป็นงูพิษกัด กรณีที่ผู้ป่วยมีสติ สามารถซักถามได้ถึงชนิดหรือลักษณะของงูที่กัดและสถานที่ที่ถูกงูกัด ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวินิจฉัย สำหรับอาการของผู้ป่วยที่แสดงออกจะแตกต่างกัน (ดังที่กล่าวข้างต้น) เช่นอาการทางระบบประสาท มักเกิดจากงูในกลุ่ม Elapidae หากผู้ป่วยมีอาการทางระบบโลหิต มักเกิดจากงูในกลุ่ม Viperidae และ Crotalidae และเมื่อถูกงูกัดแล้ว ระยะเวลาที่เอนไซม์ในพิษงูเข้าไปทำลายเซลล์ จะมีผลกระทบมากกว่าปริมาณของเอนไซม์ที่เข้าไป ดังนั้นจึงควรรีบรักษาเมื่อถูกงูกัด (Warrell et al., 1986) สำหรับการปฐมพยาบาลเบื้องต้นทำได้โดยการใช้ผ้าพันเหนือบาดแผลที่ถูกงูกัด เพื่อชะลอการไหลของพิษไปสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกายหรืออาจใช้สมุนไพรช่วยรักษา (Mebs, 2000 ; Borges et al., 2001) จากนั้นรีบนำส่งโรงพยาบาลทันที

ในปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัด แพทย์จะให้เซรุ่มที่มีฤทธิ์จำเพาะต่อพิษงูนั้น โดยดูจากอาการของผู้ป่วย แต่อาการของผู้ป่วยที่แสดงออกหากเกิดจากงูพิษในกลุ่มเดียวกันอาการจะคล้ายกันแพทย์ที่รักษาอาจวินิจฉัยผิด ว่าเป็นงูพิษชนิดไหนกัดก็ได้ ทำให้ผู้ป่วยได้รับเซรุ่มที่ไม่จำเพาะต่อพิษงู ก่อให้เกิดผลเสียต่อผู้ป่วย อีกทั้งยังเป็นการใช้เซรุ่มที่สิ้นเปลือง

เซรุ่มที่ใช้แก้พิษงูต่างๆ ผลิตได้จากสัตว์ เช่น ม้า โดยการฉีดกระตุ้นด้วยพิษงูเพื่อให้ม้าสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพิษงูนั้นๆมา จากนั้นจึงนำซีรั่มที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพิษงูไปผลิตเป็นเซรุ่มใช้ต่อไป เซรุ่มที่ได้นี้เป็นสิ่งจำเป็นที่ใช้ในการแพทย์ เพื่อรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัด สำหรับการรักษาผู้ที่ถูกงูพิษกัดในประเทศไทยนั้น แพทย์จะให้เซรุ่มที่จำเพาะต่อพิษงู ซึ่งปัจจุบันเซรุ่มเหล่านี้ผลิตจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย (Queen Saovabha Memorial Institute) และผลิตเซรุ่มทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เซรุ่มแก้พิษงูเห่า (*Naja kaouthia*), เซรุ่มแก้พิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*), เซรุ่มแก้พิษงูสามเหลี่ยม (*Bungarus fasciatus*), เซรุ่มแก้พิษงูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma*), เซรุ่มแก้พิษงูแมวเซา (*Daboia russelii siamensis*) และเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ (*Trimeresurus albolabris*)

การที่ทราบถึงชนิดของงูที่กัดนั้นจะทำให้การรักษาโดยการให้เซรุ่มรวดเร็วขึ้น ซึ่งผู้ป่วยอาจบอกถึงลักษณะงูที่กัดหรือนำงูที่กัดนั้นมาที่โรงพยาบาล เพื่อสะดวกในการวินิจฉัยและรักษาแต่ทั้งนี้เมื่อผู้ที่ถูกกัดไม่สามารถบอกลักษณะต่างๆของงูที่กัดได้ ก็ย่อมเป็นหน้าที่ของแพทย์ที่จะวินิจฉัยจากอาการผู้ป่วย ซึ่งหากแพทย์ที่รักษาขาดความชำนาญอาจรักษาโดยให้เซรุ่มที่ไม่จำเพาะกับพิษงูได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยการตรวจชนิดพิษงูในห้องปฏิบัติการเพื่อความถูกต้องและทราบชนิดพิษงูที่แน่นอน ดังนั้นในการรักษาจะต้องวินิจฉัยจำแนกงูพิษที่กัดให้ถูกต้องและเลือกให้เซรุ่มที่จำเพาะกับพิษงูนั้น (Camey, Velerde and Sanchez, 2002) เพื่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดแต่ละคนจะได้รับจำนวนเซรุ่มต่างกันขึ้นกับปริมาณของพิษ (Shemesh et al., 1998) อีกทั้งต้องเป็นเซรุ่มที่จำเพาะต่อพิษงูนั้นและได้รับการรักษาอย่างเร็วที่สุด จะสามารถช่วยการรักษาได้รวดเร็วขึ้น (Borkow, Gutierrez and Ovadia, 1997 ; Gutierruz et al., 1998) และยับยั้งการเกิดการตกเลือด (hemorrhage) (Estevao-Costa et al., 2000 ; Sanchez et al., 1998)

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของพิษงูในห้องปฏิบัติการได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอิมมูโนวิทยามาใช้ เช่น RIA (radio immunoassay) (Pukrittayakamee et al., 1987), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) แต่ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค ELISA เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำมีความจำเพาะสูง (Barral-Netto and Sohsten, 1991) ไม่ยุ่งยากเหมือนวิธี RIA และโดยทั่วไปสามารถตรวจระดับพิษงูได้ค่าต่ำถึงระดับนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Ho et al., 1986 ; Bhatti et al., 1993)

เทคนิค ELISA เป็นวิธีการตรวจหาระดับของแอนติบอดี (Antibody, Ab) หรือแอนติเจน (Antigen, Ag) โดยการติดฉลากแอนติบอดีหรือแอนติเจนกับเอนไซม์ โดยแอนติบอดีหรือแอนติเจนส่วนหนึ่งจะถูกตรึงกับผิวของวัสดุของแข็ง เช่น ผิวพลาสติก จากนั้นแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ติดฉลากกับเอนไซม์จะไปจับกับแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ถูกตรึงกับผิวของวัสดุ โดยการจับกันจะเกิดความจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน เมื่อเติมสารละลายสับสเตรตลงไปส่วนของเอนไซม์ที่ใช้ในการติดฉลากจะทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรต เกิดเป็นสีขึ้นมา แล้วนำไปอ่านผลด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต (microplate reader) หรือมองดูด้วยตาเปล่า เทคนิค ELISA นี้ยังนำไปใช้ในการตรวจพิษอื่นๆ ด้วย เช่น พิษจากแมงป่อง (Krifi et al., 1998) พิษจากเชื้อ *Clostridium botulinum* ที่มีผลต่อระบบประสาท (Doellgast et al., 1993) และใช้ตรวจระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจน (Doellgast et al., 1994) เป็นต้น

วิธี ELISA แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.Competitive ELISA หลักการทดสอบคือ เคลือบผิววัสดุของแข็งด้วยแอนติบอดีหรือแอนติเจน เติมแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่จำเพาะต่อสิ่งที่ต้องการตรวจและได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์แล้วเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน เติมสารละลายสับสเตรตลงไปเพื่อวัดปริมาณเอนไซม์ที่ติดอยู่บนผิวก็จะทราบถึงปริมาณแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ

2.Non-competitive ELISA อาจแบ่งได้เป็น Direct ELISA และ Indirect ELISA

Direct ELISA หลักการทดสอบคือ เคลือบผิววัสดุด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับสิ่งที่ต้องการตรวจ เติมแอนติเจนที่ต้องการตรวจลงไป จากนั้นเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่มีความจำเพาะและได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์แล้วเติมสารละลายสับสเตรตลงไป เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตเพื่อวัดปริมาณของสิ่งที่ต้องการตรวจ วิธีการนี้อาจเรียกว่า sandwich assay ก็ได้

Indirect ELISA เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงจากวิธี direct ELISA โดยใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์และจะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินติดฉลากด้วยเอนไซม์เพื่อวัดปริมาณของแอนติบอดีตัวที่สองที่จับอยู่กับแอนติเจนที่ต้องการตรวจ ซึ่งแอนติบอดีตัวแรกที่ติดบนพื้นผิววัสดุกับแอนติบอดีตัวที่สองจะต้องเป็นอิมมูโนโกลบูลินของสัตว์ต่างชนิดกัน

เทคนิค ELISA เริ่มนำมาใช้ศึกษาตรวจหาพิษงูในปี ค.ศ.1977 โดย Theakston และคณะ ได้ทดลองนำแกมมาโกลบูลิน (IgG) ที่แยกได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือ มาเคลือบบนไมโครเพลต ในการศึกษาได้ใช้ซีรั่มจากหนูทดลองมาวิเคราะห์และสามารถตรวจระดับพิษได้ต่ำถึง 1-5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นก็มีการศึกษาพัฒนาการตรวจพิษงูด้วยวิธีนี้เรื่อยมา (Dong et al., 2002 ; Amuy et al., 1997 ; Lalloo et al.,1994 ; Barral-Netto et al., 1990) และนำมาตรวจพิษงูทั้งในซีรั่มของผู้ป่วยและในปัสสาวะด้วย (Audebert et al., 1993)

การตรวจระดับพิษงูอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reactivity) ได้ทำให้ค่าที่ได้เป็นผลบวกเท็จ (false-positive) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการตรวจระดับพิษงูให้มีความจำเพาะและมีความไวมากขึ้น โดยใช้หลักการของ affinity chromatography ในการแยกแกมมาโกลบูลิน ให้จำเพาะกับพิษงูมากขึ้น และเป็นการกำจัดกลุ่มที่ไม่จำเพาะ (non-specific) ออกไป เพื่อเพิ่มระดับการตรวจให้ดีขึ้นและป้องกันการเกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่ม (cross-reactivity)(Heneine and Catty, 1993) ดังเช่น การนำแอนติบอดีจากกระต่ายที่จำเพาะต่อพิษที่มีผลต่อกล้ามเนื้อ (myotoxin) จากพิษงู *Agkistrodon sp.* มาวิเคราะห์ระดับพิษโดยวิธี ELISA ในไมโครเพลต จากการทดลองสามารถวัดระดับพิษได้ต่ำถึงระดับ 2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Li and Ownby, 1994) และในการศึกษาแยกแอนติบอดีเพื่อตรวจพิษงู *Bothop* sp. และ*Crotalus durissus* ด้วย วิธี ELISA สามารถวัดได้ถึงระดับ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Chavez-Olortegui et al., 1997)

ในปี ค.ศ.2002 Dong และคณะศึกษาตรวจระดับ β-Bungarotoxin ของพิษงูในเลือด, พลาสมา โดยการใช้สาร avidin-biotin ด้วยวิธี ELISA โดยใช้แอนติบอดีเคลือบบนไมโครเพลต จากนั้นใส่พิษงูลงไป เติมโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody, mAb)-biotin และเติมคอนจูเกต Horseradish peroxidase (HRP)-avidin เพื่อไปจับกับ mAb-biotin แล้วเติมสารละลายสับสเตรต O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) และเติมกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่า สามารถตรวจพิษ

ในสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) ได้ต่ำถึง 16 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจพิษในเลือดและพลาสมาได้ถึงระดับ 100 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร

แต่เนื่องจากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ในไมโครเพลตจะต้องใช้เครื่องอ่านไมโครเพลต (microplate reader) และใช้เครื่องล้างไมโครเพลต (microtiterplate washer) จึงเป็นการยุ่งยากในการจัดการ ซึ่งในการตรวจสอบพิษหรือเชื้อต่าง ๆ นั้น ไม่เพียงแต่ผลที่ได้จะต้องจำเพาะ (specific) และมีความไว (sensitivity) เท่านั้น แต่ต้องมีการจัดการที่ง่ายและรวดเร็วด้วย

ดังนั้น จึงมีการประยุกต์ใช้วิธี ELISA ที่ทดสอบในไมโครเพลตมาทดสอบในกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยใช้ขั้นตอนของวิธี ELISA เช่นกัน และเรียกวิธีนี้ว่า dot-ELISA วิธีนี้นำมาทดสอบหาแอนติบอดี (Londner et al., 1987 ; Kumar et al., 1985) และหาแอนติเจน (Tellez-Giron et al., 1987 ; Bosompem, Assoku and Nantulya, 1996 ; Requejo et al., 1997) อีกทั้งผลการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวนี้ สามารถดูผลที่เกิดเป็นจุดสีบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสได้ด้วยตาเปล่าและง่าย (Boctor et al., 1987 ; Vinayak, Dutt and Puri, 1991) รวดเร็ว (Pappas, Hajkowski and Hockmeyer, 1983) มีความจำเพาะสามารถตรวจได้ถึงระดับพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (นันทิกา ปานจันทร์, 2542) และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง (Vercammen et al., 1998) จึงน่าจะมีประโยชน์มากในการนำไปใช้ในภาคสนาม (Pappas, Hajkowski and Hockmeyer, 1984 ; Pappas, 1988) และในที่ชนบทห่างไกลที่ยังขาดแคลนเครื่องมือต่าง ๆ ที่มีราคาแพง ดังนั้นจึงมีการศึกษานำวิธี dot-ELISA มาใช้ในงานวิจัยต่างๆ เช่น

ในปี 1983 Pappas, Hajkowski และ Hockmeyer ทำการศึกษาใช้เทคนิค dot-ELISA โดยการตัดกระดาษไนโตรเซลลูโลสเป็นแผ่นเล็ก ๆ วางลงในไมโครเพลต เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค Visceral Leishmaniasis ซึ่งผลการทดสอบจะเกิดเป็นจุดสีฟ้าบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสสามารถดูด้วยตาเปล่าได้ จากการทดลองพบว่าสามารถตรวจเชื้อในแอนติบอดีของคนได้ต่ำในระดับ 1 ng ถึง 0.1 ng ซึ่งเห็นเป็นจุดสีฟ้าบนกระดาษ ส่วนของหลุมที่ไม่มีเชื้อ (แอนติเจน) ก็จะไม่เกิดสี

ในปี 1995 Draelants และคณะทำการศึกษาเชื้อ *Taenia saginata* ในวัวด้วยเทคนิค dot-ELISA โดยทำการตรวจเชื้อนี้หลังจากการฉีดเชื้อเข้าไป 5 สัปดาห์ พบว่าหากมีเชื้อน้อยกว่า 100 ตัวอาจจะเชื่อถือการตรวจสอบไม่ได้นัก แต่หากมีเชื้อมากกว่า 100 ตัวจะสามารถตรวจสอบได้ 87.5% สำหรับการทดลองนี้มีความจำเพาะอยู่ระดับ 93.5%

ในปี 1998 Vercammen และคณะได้ศึกษาการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leishmania infantum* ในสุนัขด้วยวิธี dot-ELISA โดยการหยดแอนติเจนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสและทำการเคลือบส่วนที่เหลือด้วยนมพร่องมันเนย (skim milk) แล้วตัดกระดาษที่เตรียมใส่ลงในไมโครเพลต จากนั้นใส่ซีรั่มที่มีแอนติบอดีลงไป แล้วล้างไมโครเพลต เติมซีรั่ม goat anti-dog คอนจูเกตกับเอนไซม์ alkaline phosphatase ใส่สารละลายสับสเตรตแล้วดูจุดสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนกระดาษไนโตร

เซลลูโลส ผลการศึกษาพบว่า สามารถตรวจสอบแยกแอนติบอดีที่ให้ผลบวกเกิดเป็นจุดสีฟ้าและที่ให้ผลลบไม่เกิดจุดสีได้และการตรวจสอบใช้เวลาเพียง 30 นาทีก็สามารถดูผลได้ง่ายและรวดเร็วด้วยตาเปล่า

ในปี 2541 นันทิกา ปานจันทร์ได้ทำการศึกษาโดยเทคนิค dot-ELISA ทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน CHH (Crustacean Hyperglycemic Hormone) จากก้านตากุ้งก้ามกราม พบว่า แอนติบอดีต่อ CHH ที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวสามารถจับกับ CHH ได้และมีสภาพไว (sensitivity) ของการตรวจวัดต่ำถึง 15 พิโคกรัมต่อจุดและเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับเพปไทด์ที่คล้ายคลึงกันต่ำมาก

จากการค้นคว้าข้อมูล ยังไม่พบการใช้วิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ในการตรวจวิเคราะห์หาชนิดของพิษงูต่างๆ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงทำการทดลองใช้แกมมาโกลบูลิน (แอนติบอดี) ที่จำเพาะต่อพิษงูมาเคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส เพื่อวิเคราะห์หาชนิดของพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA โดยเลือกพิษงูกะปะ ซึ่งเป็นพิษงูที่อยู่ในกลุ่มงูที่พิษออกฤทธิ์ต่อระบบโลหิตและพิษงูเห่า ซึ่งเป็นพิษงูที่อยู่ในกลุ่มงูที่พิษมีผลต่อระบบประสาท เป็นพิษงูตัวอย่าง

ขอบเขตการวิจัย

พัฒนาเทคนิค dot-ELISA เพื่อตรวจวัดพิษงูกะปะที่พิษออกฤทธิ์ต่อระบบโลหิตและพิษงูเห่าที่พิษออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ซึ่งจะเปรียบเทียบการใช้แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูที่แยกได้ด้วยวิธี Ion-exchange chromatography กับวิธี Affinity chromatography และหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนของ dot-ELISA และศึกษาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) ระหว่างพิษงูทั้งสองและเปรียบเทียบกับการตรวจวัดพิษงูกับวิธี ELISA บนไมโครเพลต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectophotometer)	Beckman Coulter รุ่น DU 650
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Hettich รุ่น Universal 30 RF
3. เครื่องอ่านไมโครเพลต ELISA (Microplate Reader)	Diagnostics Pasteur, LP 200
4. เครื่องเก็บแฟรคชั่น (Fraction Collector)	Bio-RAD, model 2110
5. เครื่องล้างไมโครเพลต (Microtiter Plate Washer)	Sanofi, PW 40
6. เครื่องชั่งละเอียด	Sartorius รุ่น 1620 MPB-1
7. เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer)	Lab-line instrument, G-560E
8. ตู้บ่ม (Incubator)	Memmert
9. ถุงไดอะไลซิส (Dialysis Tube): M.W. cut off 3,000	Spectrapor
10. ไมโครเพลต ELISA 96 หลุม (Microtiter plate 96 well)	Costar
11. กระดาษไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose Membrane)	Mecherey-nagel
12. เครื่องอิเลคโตรโฟรีซิส	
13. เครื่องวัด pH	Cyberscan
14. เครื่องกวนผสมสาร (Magnetic Stirrer)	Framo- Geratetechnik, M 20/1
15. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power Supply)	Hoefer, PS 50 XT D

สารเคมี

1. พลาสมาที่มีแอนติบอดีต่อพิษงูกะปะ	สถานเสาวภา
2. พลาสมาที่มีแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า	สถานเสาวภา
3. พิษงูกะปะและพิษงูเห่า	สถานเสาวภา
4. Cyanogen bromide activated Sepharose 4B	Sigma – Aldrich
5. Horse IgG	Sigma
6. Sephadex G-200	Phamacia
7. Diethylaminoethyl cellulose	Whatman

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. Bovine Serum Albumin (BSA) — Sigma
9. Peroxidase Type VI-A from Horseradish 987 units/mg solid — Sigma, P-6782
10. Hydrochloric acid (HCl) — Merck
11. Glacial acetic acid — Merck
12. 4-Chloro-1-Naphthol — Sigma
13. 1,2-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) — Dako
14. Kaleidoscope Prestained Standards Marker Protein — Biorad
15. Polyethylene glycol, M.W. 8,000 — Sigma
16. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) — Merck
17. Glycine — Merck
18. Sodium acetate (CH_3COONa) — Merck
19. Boric acid (H_3BO_3) — Merck
20. Agar noble — Difco
21. Acrylamide — Sigma
22. Sodium dodecyl sulfate (SDS) — Sigma
23. Ammonium persulfate — Merck
24. N, N, N', N', -Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) — Sigma
25. Bromophenol blue — Merck
26. Coomassie Brilliant blue R — Sigma
27. Tween 20 — Sigma
28. Folin-ciocaltens phenol reagent — Merck
29. 2,4 – Dinitro-fluorobenzene (DNFB) — Sigma
30. Sodium metaperiodate ($NaIO_4$) — Sigma
31. Sodium borohydride ($NaBH_4$) — Sigma
32. Ethylene glycol ($C_2H_6O_2$) — Sigma
33. Skim milk — Difco
34. Triton X-100 — Sigma
35. Thimerosal ($C_2H_5HgSC_6H_4COONa$) — Fluka
36. Sodium azide (NaN_3) — Sigma
37. Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) — Merck
38. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) — Merck
39. Tris (hydroxymethyl) aminomethane — Sigma

วิธีการทดลอง

1. การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงู

1.1 การแยกโกลบูลินโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการแยกแกมมาโกลบูลินให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ion-exchange chromatography

1.1.1 การแยกโกลบูลินโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Kawamura, 1982)

นำพลาสมาของม้าที่มีแอนติบอดีจำเพาะต่อพิษงู (ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเสาวภา) มาผสมกับน้ำเกลือในปริมาตรเท่ากัน แล้วค่อยๆเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว (Saturated Ammonium Sulphate, SAS) ลงไปพร้อมกวนเบาๆ เพื่อให้ได้ปริมาณสารละลายอิ่มตัวทั้งหมด 20 % ตั้งทิ้งไว้ 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 9,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาเติมด้วย SAS ให้ได้ปริมาณสารละลายอิ่มตัวทั้งหมด 50 % ตั้งทิ้งไว้ 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 9,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสออกและเก็บส่วนตะกอนที่ได้นำไปละลายในน้ำเกลือ (ใช้ปริมาณเท่ากับที่ใช้ในขั้นตอนแรก) และเติม SAS ลงไปให้ได้ปริมาณสารอิ่มตัว 50% นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 9,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนตะกอนที่ได้นำไปละลายในน้ำเกลือ (ใช้ปริมาตรเท่ากับที่ใช้ในตอนแรก) จากนั้นเติม SAS ลงไปเพื่อให้ได้ปริมาณสารอิ่มตัว 50 % นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 9,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) แล้วนำไปไดอะไลซ์ (dialyse) ใน PBS pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกไป

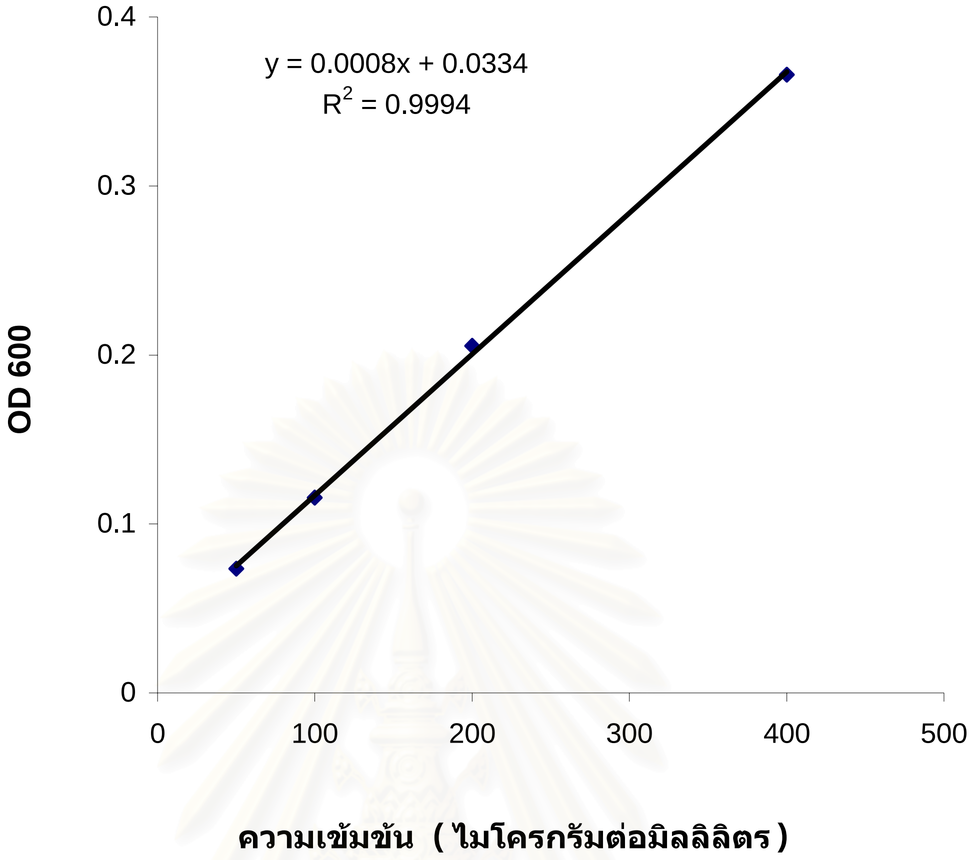
1.1.2 การแยกแกมมาโกลบูลินให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ion-exchange chromatography (Levy, 1960)

นำโกลบูลินที่แยกได้โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ดังข้อ 1.1.1 มาแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ion-exchange chromatography โดยใช้ DEAE-cellulose ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.0175 M pH 6.3 ที่บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1.8 × 25 เซนติเมตร นำโกลบูลินที่ได้ (จากข้อ 1.1.1) ไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส

มาผ่านลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ จากนั้นชะสารด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.0175 M pH 6.3 (บัฟเฟอร์ตัวที่ 1) อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงและเก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาแฟรกชั่น (fraction) ละ 2 มิลลิลิตร นำแฟรกชั่นที่แยกได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ baseline จึงเปลี่ยนเป็นบัฟเฟอร์ตัวที่ 2 คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.4 M pH 5.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 M เพื่อชะโปรตีนที่เหลืออยู่ในคอลัมน์ออกมา จนวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ baseline จึงกลับไปชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวแรกดังเดิม นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรของแต่ละแฟรกชั่นมาเขียนกราฟ โดยแกน X เป็นลำดับที่ของแฟรกชั่นและแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง

นำแต่ละแฟรกชั่นของ peak 1 ที่เป็นแกมมาโกลบูลินมารวมกันแล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ PEG (polyethylene glycol) โดยใส่แกมมาโกลบูลินลงใน dialysis tubing ที่มี MW cut off 3,500 ดาลตัน ปิดหัวและท้ายของถุง นำมาวางบนจานแก้ว เทผง PEG (MW 8,000) ลงบนถุง ซึ่ง PEG จะดูดน้ำในถุงออก ทำให้ปริมาณของสารละลายในถุงลดลงและมีความเข้มข้นสูงขึ้น ทำจนสารละลายในถุงเหลือปริมาณเล็กน้อย วัดปริมาตรของสารละลาย จากนั้นเก็บสารละลายที่เหลือในถุงไว้ที่อุณหภูมิ $-20\ ^{\circ}C$ วัดปริมาณโปรตีนของสารละลายแกมมาโกลบูลิน ด้วยวิธี Lowry โดยใช้สารละลายที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย A (ภาคผนวก) 3.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย B (ภาคผนวก) 0.3 มิลลิลิตร วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงจากกราฟมาตรฐาน (standard curve) ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0- 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแกมมาโกลบูลินที่แยกได้ด้วยวิธี Immunodiffusion test (อ้างถึงหัวข้อ 1.3.1) และ SDS-PAGE (อ้างถึงหัวข้อ 1.3.2) จากนั้นทำการแบ่งแกมมาโกลบูลินออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำมาใช้สำหรับเคลือบบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสและส่วนที่ 2 นำมาติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อให้ได้แกมมาโกลบูลิน- เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน BSA

1.2 การแยกแกมมาโกลบูลินโดยวิธี Affinity chromatography

1.2.1 การเตรียม Affinity column ที่ใช้ทำการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงู (Pharmacia)

ชั่ง CNBr-Sepharose 4B มา 1 กรัม ละลายในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 10^{-3} M ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้อยู่ในรูปสารแขวนลอย นำมากรองและล้างบนตัวกรอง ชั่งพิษงู 20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1 M pH 8.3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาผสมกับ CNBr-Sepharose 4B ที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำมากรองและล้างด้วยสารละลาย Glycine ความเข้มข้น 0.2 M ตั้งทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาล้างด้วย (1) สารละลาย $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 0.1 M pH 8.3 (coupling buffer) และล้างต่อด้วย (2) สารละลาย CH_3COONa ความเข้มข้น 0.1 M pH 4 จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ (1) และ

(2) สลับกัน 3 รอบ แช่เจลให้พองและอิ่มตัวใน PBS, pH 7.4 เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C นำเจลที่เตรียมได้มาบรรจุในคอลัมน์ขนาด 1 × 5 เซนติเมตร และชะคอลัมน์ด้วย PBS pH 7.4 ในปริมาตร 4- 5 เท่าของปริมาตรทั้งหมดในคอลัมน์ ดังรูปที่ 2.2

1 g. ของ CNBr-Sepharose 4B ในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 10^{-3} M ปริมาตร200 ml

กรองและล้างบนตัวกรอง

ชั่งพิษงู 20 mg ละลายใน 10 ml ของ 0.1 M $NaHCO_3$ pH 8.3 →

↓

นำพิษงูมาผสมกับ Sepharose 4B

↓ อุณหภูมิห้อง , 2-3 ชั่วโมง

กรองและล้างด้วยสารละลาย Glycine ความเข้มข้น 0.2 M

↓ อุณหภูมิห้อง , 2-3 ชั่วโมง

ล้างด้วยสารละลาย $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 0.1 M pH 8.3 [coupling buffer, (บัฟเฟอร์ที่ 1)]

↓

ล้างด้วยสารละลาย CH_3COONa ความเข้มข้น 0.1 M pH 4 (บัฟเฟอร์ที่ 2)

↓

ล้างกับสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ 1 และ 2 สลับกัน 3 รอบ

↓

บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1 × 5 cm และชะด้วย PBS (phosphate buffer saline) pH 7.4

รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการเตรียม Affinity column ที่ใช้ทำการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงู

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.2 การแยกแกมมาโกลบูลินโดยวิธี Affinity chromatography

นำพลาสมาของม้าที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพิษงูมาแยกแกมมาโกลบูลิน ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยผ่านพลาสมาลงในคอลัมน์ที่บรรจุ CNBr-Sepharose 4B ที่จับกับพิษงู (ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1) ชะคอลัมน์ด้วย PBS pH 7.4 (บัฟเฟอร์ ตัวที่ 1) อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาแฟรกชั่นละ 1 มิลลิลิตร เพื่อชะโปรตีนที่ไม่ได้จับกับคอลัมน์ออกมา จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ได้เท่ากับ baseline แล้วจึงเปลี่ยนไปชะด้วยสารละลาย Glycine/HCl ความเข้มข้น 0.1 M pH 2.5 (บัฟเฟอร์ ตัวที่ 2) เก็บแฟรกชั่นจากการชะบัฟเฟอร์ตัวที่ 2 ซึ่งในหลอดเก็บแฟรกชั่นจะมี Tris pH 9.0 เพื่อปรับ pH ของ

แกมมาโกลบูลินที่แยกได้ให้เป็นกลาง ทำการชะแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูซึ่งจับอยู่ในคอลัมน์ออก จนไม่มีโปรตีนออกมาแล้วจึงเปลี่ยนกลับไปชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวที่ 1 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ได้เท่ากับ baseline นำแกมมาโกลบูลินที่ได้แต่ละแฟรกชั่นใน peak 2 มารวมกันแล้วไป dialyse (โดยใช้ dialysis tubing ที่มี MW. cut off 3,500) กับน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 °C และไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ PEG (อ้างถึงหัวข้อ 1.1.2) จากนั้นเก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C ทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และตรวจสอบแกมมาโกลบูลินที่แยกได้ด้วยวิธี Immunodiffusion test (อ้างถึงหัวข้อ 1.3.1) และ SDS-PAGE (อ้างถึงหัวข้อ 1.3.2) จากนั้นทำการแบ่งแกมมาโกลบูลิน ออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ใช้สำหรับเคลือบแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส และส่วนที่ 2 นำมาติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อให้ได้แกมมาโกลบูลิน-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต

1.3 การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี Ion - exchange chromatography และวิธี Affinity chromatography

1.3.1 การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินโดยวิธี Immunodiffusion test (Ouchterlony, 1953)

นำ 1% agarose gel ใน verosal buffer (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) มาต้มให้ agarose gel ละลายจนหมดแล้วเทเจลปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร รอให้เจลแข็งตัวเจาะหลุมตรงกลางจานแก้วและรอบๆหลุมกลาง (ขนาดหลุมเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร) ดังรูปที่ 2.3 นำพิษงูความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมกลาง (หลุม c) และแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากข้อ 1.1.2 และ 1.2.2 หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเจือจางเป็นลำดับใน PBS ที่ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 ใส่ในหลุมที่ 1 - 6 ตามลำดับ หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำจานแก้วไปวางในกล่องที่มีสำลีชุบน้ำเพื่อให้เกิดความชื้นภายในกล่อง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างพิษงู (แอนติเจน) กับแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะกับพิษงู (แอนติบอดี) ถ้าสารที่แยกได้จากข้อ 1.1.2 และ1.2.2 เป็นแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูจะปรากฏเส้นตะกอนให้เห็น

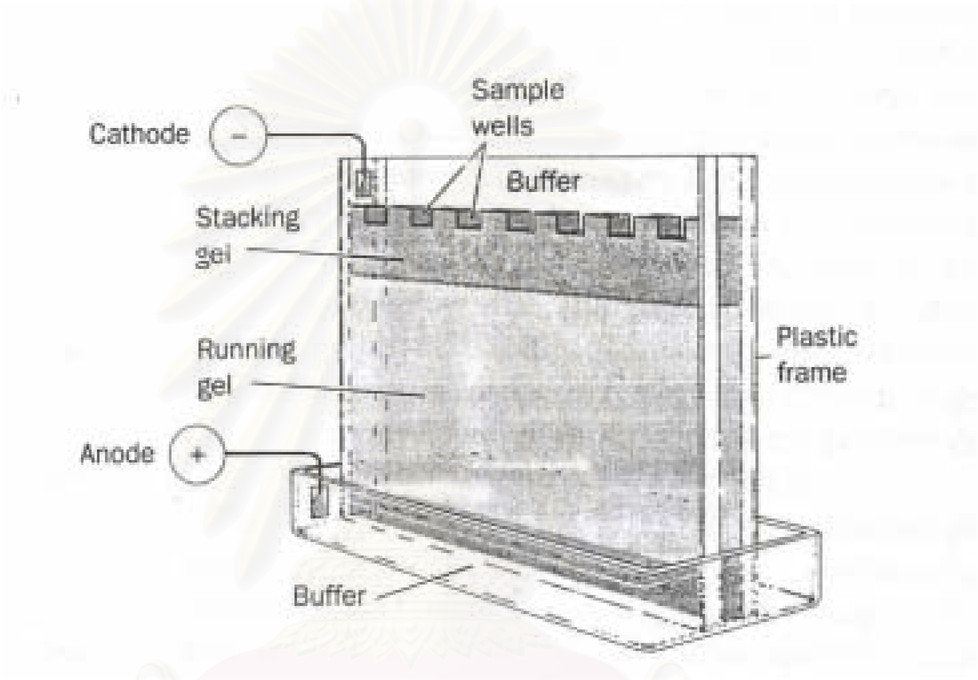
รูปที่ 2.3 agarose gel plate สำหรับใช้ตรวจสอบแกมมาโกลบูลินด้วยวิธี Immunodiffusion test.

1.3.2 การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินโดยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

นำแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากข้อ 1.1.2 และ 1.2.2 มาตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 8% acrylamide ในสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.75 M pH 8.8 เป็น separating gel และ 3.75 % acrylamide ในสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.125 M pH 6.8 เป็น stacking gel ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียมเจล ดังนี้

นำส่วนของ separating gel ซึ่งประกอบด้วย 30 % acrylamide ปริมาตร 1.85 มิลลิลิตร, Tris-HCl 3 M pH 8.8 ปริมาตร 1.75 มิลลิลิตร, 1 % SDS ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร, แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ปริมาตร 0.35 มิลลิลิตร, TEMED ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น ปริมาตร 2.35 มิลลิลิตร มาใส่ในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ดังรูปที่ 2.4 รอให้เจลแข็งตัวจึงใส่ส่วนของ stacking gel ซึ่งประกอบด้วย 30 % acrylamide ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร, Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร, 1 % SDS ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร, แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร, TEMED 0.005 มิลลิลิตร, น้ำกลั่นปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร แล้วใส่หวีเข้าไปทันที โดยปลายหวีห่างจากผิวของชั้น stacking gel ประมาณ 1 เซนติเมตร เมื่อเจลในส่วนนี้แข็งตัวจึงนำไปต่อเข้ากับชุดอุปกรณ์อิเลคโตรโฟริซีสที่ใส่ Tris running buffer (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) เรียบร้อยแล้ว ดึงหวีออกแล้วล้างแต่ละหลุมด้วย Tris running buffer เพื่อไล่ฟองอากาศในหลุมออก เตรียมสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับบรอมฟีนอลบลู (0.5% bromophenol blue) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อดูการเคลื่อนที่ของสารในแผ่นเจล จากนั้นใส่

สารตัวอย่างในแต่ละหลุม ต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซิสเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ใช้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ในขั้นตอนการแยกสาร ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสังเกตเห็นแถบสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงไปห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร นำเจลไปย้อมสีด้วย Coomassie blue R 250 staining solution เป็นเวลา 1 ชม. แล้วล้างสีออกจากพื้นเจล (Background) ด้วย destain solution (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) เขย่าเบาๆเปลี่ยน destain solution หลายๆครั้ง จนพื้นเจลใสและเห็นสีของแถบโปรตีน



รูปที่ 2.4 ชุดอุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซีส (Voet and Voet, 1995)

2. วิธีการติดฉลากและการตรวจสอบการติดฉลากแกมมาโกลบูลินด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต

2.1 วิธีการติดฉลากแกมมาโกลบูลินด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (Nakane, 1974)

การติดฉลากแกมมาโกลบูลินด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ทำได้โดยละลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (HRP type VI-A; Sigma) ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.3 M pH 8.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (โดยโซเดียมไบคาร์บอเนตจะเตรียมทันทีก่อนที่จะใช้) และนำ 1 % DNFB (2,4-Dinitrofluorobenzene) ในเอธานอล ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ค่อยๆเติม

ลงในสารละลายที่เตรียมไว้และกวนเบาๆ วางตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นค่อยๆเติมสารละลาย sodium metaperiodate 0.06 M ในน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในสารละลายข้างต้น กวนเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง.ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งสีของสารละลายผสมเปลี่ยนเป็นสีเขียวเหลือง แล้วจึงค่อยๆเติมสารละลาย ethylene glycol 0.16 M ในน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในสารละลาย กวนเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลาย (1) ที่ได้มา dialyse 3 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 9.5 ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C

นำแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากข้อ 1.1.2 หรือ ข้อ 1.2.2 ปริมาณ 10 มิลลิกรัมละลายในสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 9.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรค่อยๆเติมลงในสารละลาย (1) ที่เตรียมไว้ข้างต้น กวนเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 2-3.ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม sodium borohydride ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C และนำสารละลายมา dialyse ใน PBS, pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C

นำสารละลายที่ได้มาแยกโดยวิธี Gel filtration chromatography ด้วย Sephadex G-200 ในคอลัมน์ขนาด 0.8 × 70 เซนติเมตร แล้วชะสารด้วยสารละลาย PBS pH 7.2 อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาแฟรกชั่นละ 1.5 มิลลิลิตร นำแต่ละแฟรกชั่นที่แยกได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 403 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาเขียนกราฟ

2.2 การตรวจสอบการติดฉลากแกมมาโกลบูลินด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต

นำแต่ละแฟรกชั่นที่แยกได้จากข้อ 2.1 มาตรวจสอบโดยวิธี ELISA ซึ่งมีขั้นตอนตามลำดับ คือ นำพิษงูที่จำเพาะกับแกมมาโกลบูลินมาละลายในสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 9.6 ให้ได้ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในไมโครเพลต (ELISA plate) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆละ 1 นาที เติม 1% BSA ใน PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆละ 1 นาที เติมคอนจูเกตที่ได้จากแต่ละแฟรกชั่นจากข้อ 2.1 ลงในแต่ละหลุมปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆละ 1 นาที เติมสารละลายสับสเตรต OPD ลงในแต่ละหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 M ในแต่ละหลุมๆละ

100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

3. การตรวจหาชนิดของพิษงู โดยวิธี dot-ELISA

นำแกมมาโกลบูลินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำไปแช่ใน 5 % blotto (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้งเป็นเวลาครั้งละ 5 นาที แล้วปล่อยไว้ให้แห้ง หยดพิษงูหรือตัวอย่างที่ต้องการหาพิษงูที่มีความเข้มข้นต่าง ๆกันปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้งเป็นเวลาครั้งละ 5 นาที และแช่ในแกมมาโกลบูลิน-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้งเป็นเวลาครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายสับสเตรต OPD เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง (ดังรูปที่ 2.5) ดูสีที่เกิดขึ้นแต่ละจุดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

(1) Antibody (IgG)

↓ wash

(2) Blocking

↓ wash

(3) Sample or antigen

↓ wash

(4) IgG-horseradish peroxidase conjugate

↓ wash

(5) Substrate

รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการทดสอบโดยวิธี dot-ELISA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 การหาชนิดของพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกด้วยวิธี Ion-exchange chromatography

นำแกมมาโกลบูลินที่แยกโดยวิธี Ion-exchange chromatography ที่ใช้สำหรับหยดเคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสและทำแกมมาโกลบูลิน- เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต มาทำการทดสอบหาชนิดของพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA ตามขั้นตอนที่กล่าวไว้ดังข้อ 3 ข้างต้น

3.2 การหาชนิดของพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกด้วยวิธี Affinity chromatography

3.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนต่าง ๆ

3.2.1.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูที่ใช้เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (รูปที่ 2.5 ขั้นตอนที่ 1)

โดยการเจือจางแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูที่จะนำมาใช้ เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสให้มีความเข้มข้นเป็น 1, 10, 50, 100, 200, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยทำแบบ duplicate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปตรวจสอบตามขั้นตอนดังกล่าวขั้นต้น ดังรูปที่ 2.5 เลือกความเข้มข้นต่ำสุดของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูที่ใช้เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสแล้วให้สีที่เกิดชัดเจนที่สุด

3.2.1.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแกมมาโกลบูลิน-เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (รูปที่ 2.5 ขั้นตอนที่ 4)

ทำตามขั้นตอน dot-ELISA ดังรูปที่ 2.5 จนถึงขั้นตอนที่ 4 ใช้คอนจูเกตที่เจือจางใน 5% blotto ในอัตราส่วน undilute, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:50 และ 1:100 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปตรวจสอบตามขั้นตอนดังกล่าวขั้นต้น ดังรูปที่ 2.5 ดูสีที่เกิดขึ้นแต่ละจุดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด โดยดูจากความชัดเจนของจุดสีบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสแล้วจึงนำความเข้มข้นนั้นไปใช้ในการทดสอบต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

3.2.2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูที่ใช้เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (รูปที่ 2.5 ขั้นตอนที่ 1)

หยดแกมมาโกลบูลินที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่ต้องการ (จากข้อ 3.2.1.1) ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 56 ^{o}C และอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทดสอบหาอุณหภูมิในการบ่มแกมมาโกลบูลินที่เหมาะสม จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปตรวจสอบตามขั้นตอนดังกล่าวขั้นต้น ดังรูปที่ 2.5

3.2.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มพิษงูหรือตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (รูปที่ 2.5 ขั้นตอนที่ 3)

หยดพิษงูที่มีความเข้มข้น 1, 5, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 56 ^{o}C และอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทดสอบหาอุณหภูมิในการบ่มพิษงูที่เหมาะสม จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปตรวจสอบตามขั้นตอนดังกล่าวขั้นต้น ดังรูปที่ 2.5

3.2.3 การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสม

3.2.3.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการเคลือบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

หยดแกมมาโกลบูลินที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่ต้องการ (จากข้อ 3.2.1.1) ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากข้อ 3.2.2.1) เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที เพื่อทดสอบหาเวลาในการบ่มแกมมาโกลบูลินที่เหมาะสม จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปตรวจสอบตามขั้นตอนดังกล่าวขั้นต้น ดังรูปที่ 2.5

3.2.3.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มพิษงูหรือตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ

นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 3.2.1.1) และทำตามขั้นตอนทดสอบโดยวิธี dot-ELISA ตามลำดับ จนถึงขั้นตอนที่ 3 หยดพิษงูที่มีความเข้มข้น 1, 5, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสตรงตำแหน่งที่เคลือบไว้ด้วยแกมมาโกลบูลิน นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากข้อ 3.2.2.2) เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที โดยในแต่ละขั้นตอนทำตามขั้นตอนดังกล่าวขั้นต้น ดังรูปที่ 2.5

3.2.3.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการแช่คอนจูเกต

นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 3.2.1.1) และทำตามขั้นตอนทดสอบโดยวิธี dot-ELISA ตามลำดับ จนถึงขั้นตอนในการแช่คอนจูเกต แช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสในคอนจูเกตที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 3.2.1.2) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการแช่คอนจูเกต จากนั้นทำตามขั้นตอนอื่น ดังแสดงในรูปที่ 2.5

3.2.3.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการล้าง

กระดาษไนโตรเซลลูโลสที่ทำตามขั้นตอนในรูปที่ 2.5 จำนวน 3 ชุด ซึ่งในขั้นตอนการล้างด้วย 0.5% blotto นั้นแต่ละชุดล้างเป็นเวลาต่างๆกัน ชุดที่ 1 ล้าง 3×1 นาที, ชุดที่ 2 ล้าง 3×2 นาที, ชุดที่ 3 ล้าง 3×5 นาที

3.2.4 การทดสอบหาสับสเตรตที่เหมาะสมในการทดสอบ

ในขั้นตอนสุดท้าย (ขั้นตอนที่ 5) แช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสในสารละลายสับสเตรตโดยใช้ OPD (*0*-phenylenediamine dihydrochloride) ละลายในน้ำกลั่น (0.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ naphthol (4-chloro-1-naphthol) ละลายใน PBS (0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นสับสเตรตแล้วเปรียบเทียบความชัดเจนของสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยในแต่ละขั้นตอนทำตามขั้นตอนดังกล่าวขั้นต้น ดังรูปที่ 2.5

เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนในการทำ dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสแล้ว จึงนำมาตรวจสอบเพื่อหาปริมาณพิษงูที่สามารถตรวจสอบได้ทั้งของพิษงูกะปะและพิษงูเห่า ตามขั้นตอนของวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ดังรูปที่ 2.5 โดยการเจือจางพิษงูกะปะใน PBS ให้มีความเข้มข้น 0.2, 1, 5 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบหาปริมาณพิษงู โดยจะใช้ PBS เป็นชุดควบคุม (control) สำหรับการตรวจสอบปริมาณพิษงูเห่านั้นใช้วิธีการเช่นเดียวกัน (ดังรูปที่ 2.5) และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่หาได้ในแต่ละขั้นตอนจากข้อ 3 ในการตรวจสอบพิษงูทั้งสองชนิด

4. การทดสอบดูปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

นำแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะมาทดสอบดูปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับพิษงูเห่า โดยทำการทดสอบตามขั้นตอนของวิธี dot-ELISA ซึ่งในขั้นตอนการตรวจสอบพิษงูจะใช้พิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ละลายในซีรั่ม (serum) ของคนปกติความเข้มข้น 0.2, 1, 5 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ และเช่นเดียวกัน นำแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่ามาทดสอบดูปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับพิษงูกะปะ โดยทำการทดสอบตามขั้นตอนของวิธี dot-ELISA ซึ่งในขั้นตอนการตรวจสอบพิษงูจะทำการหยดพิษงูเห่าและพิษงูกะปะที่ละลายในซีรั่มของคนปกติความเข้มข้น 0.2, 1, 5 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า จากนั้นทำตามขั้นตอนการหาชนิดของพิษงูโดยวิธี dot-ELISA ตามลำดับและดูจุดสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเพื่อดูปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของงูแต่ละชนิด

5. เปรียบเทียบการตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต และวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

5.1 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต

นำแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ มาละลายในสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 9.6 ให้มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 นาที เติม 1 % BSA ใน PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 นาที เติมพิษงูกะปะความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลาย diluent (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยหลุมที่ใช้เป็น control จะเติมเฉพาะสารละลาย diluent เท่านั้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 นาที เติมแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต ที่ความเจือจางต่างๆ (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) ในสารละลาย diluent ลงในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 นาที เติมสารละลายสับสเตรต OPD ลงในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 M ลงในแต่ละหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader สำหรับการตรวจสอบปริมาณพิษงูเห่านั้นใช้วิธีการเช่นเดียวกัน

5.2 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส และการทดสอบความแม่นยำ

5.2.1 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

ใช้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ในการทำ dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่หาได้จากข้อ 3 นำมาตรวจสอบชนิดของพิษงู โดยการเจือจางพิษงูกะปะในซีรั่มของคนปกติให้มีความเข้มข้น 0.2, 1, 5 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วใช้ทดสอบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยจะใช้ซีรั่มของคนปกติเป็นชุดควบคุม สำหรับการตรวจสอบปริมาณพิษงูเห่านั้นใช้วิธีการเช่นเดียวกัน (ดังรูปที่ 2.5) โดยการเจือจางพิษงูเห่าในซีรั่มของคนปกติให้มีความเข้มข้น 0.2, 1, 5, และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้สภาวะที่เหมาะสมที่หาได้ในแต่ละขั้นตอนขั้นต้นในการตรวจสอบ

5.2.2 การทดสอบความแม่นยำ

การทดสอบหาค่าความแม่นยำ (precision) ของการตรวจหาชนิดของพิษงูโดยการคำนวณจากการทดสอบซ้ำสิบครั้ง ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficiency of variation), % CV

จากสูตร $\% CV = \frac{SD}{MEAN} \times 100$

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงู

1.1 การแยกโกลบูลินโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการแยกแกมมาโกลบูลินให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ion-exchange chromatography

นำพลาสมาม้าที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพิษงูมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อแยกโกลบูลินออกมา จากนั้นทำการแยกโกลบูลินให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ion-exchange chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสารโดยใช้หลักการแลกเปลี่ยนไอออนในสารละลาย ทำการแยกตามวิธีของ Levy and Sober, 1960 โดยการนำโกลบูลินที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย DEAE-cellulose แล้วทำการชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.0175 M pH 6.3 ซึ่งเป็นตัวชะตัวที่ 1 ซึ่งแกมมาโกลบูลินจะถูกชะและตามด้วยตัวชะตัวที่ 2 คือสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.4 M pH 5.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 M เพื่อชะเอาโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกมาได้ โดยมี Chromatogram เป็นดังกราฟรูปที่ 3.1 ซึ่งเป็นการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (แฟรกชั่น 10-35) มีปริมาณโปรตีน 257.5 มิลลิกรัมและกราฟรูปที่ 3.2 ซึ่งเป็นการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (แฟรกชั่น 9-62) มีปริมาณโปรตีน 206.8 มิลลิกรัม เก็บแกมมาโกลบูลินที่แยกได้และนำไปทดสอบแอนติบอดีต่อพิษงูกะปะและพิษงูเห่า ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วนส่วนหนึ่งจะเก็บไว้เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสและ ELISA plate อีกส่วนหนึ่งจะนำไปติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนตรวจสอบพิษงูของวิธี dot-ELISA ต่อไป

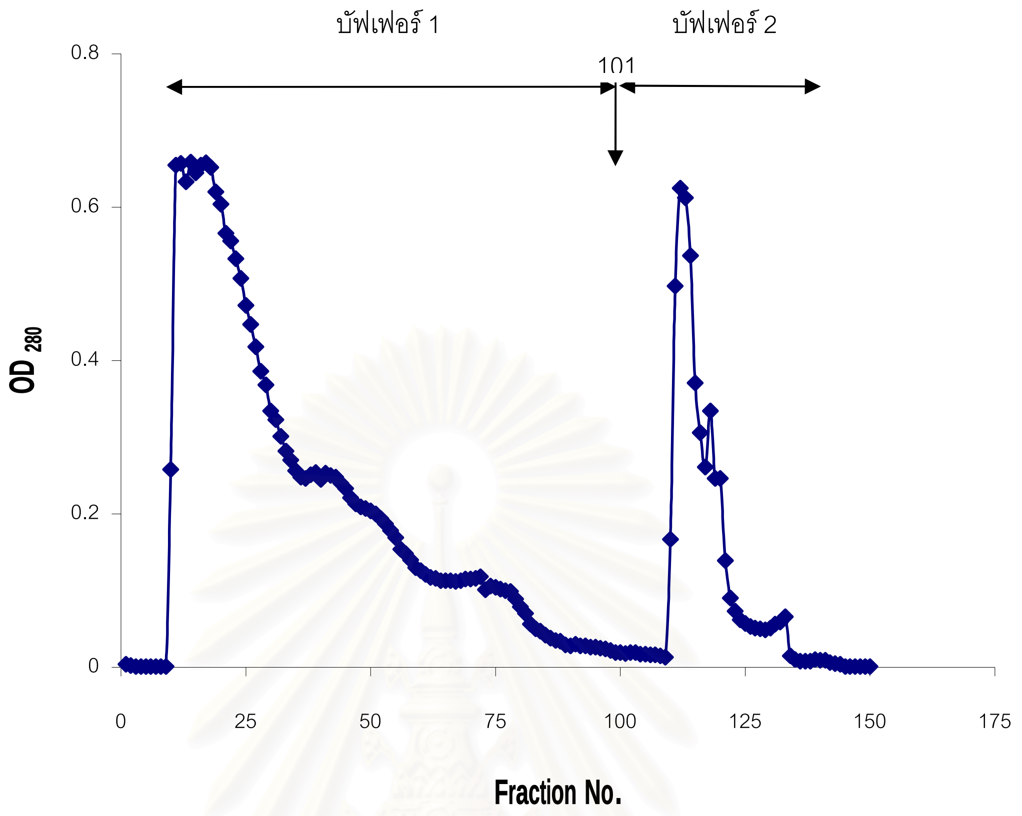
1.2 การแยกแกมมาโกลบูลินโดยวิธี Affinity chromatography

ในการแยกแกมมาโกลบูลินให้บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity chromatography โดยการใช้พลาสมาที่จำเพาะต่อพิษงูมาผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย CNBr-Sepharose 4B ที่จับกับพิษงูชะด้วยบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 เป็นบัฟเฟอร์ตัวแรกซึ่งจะชะโปรตีนอื่นๆ และโกลบูลินที่ไม่จำเพาะต่อพิษงูในคอลัมน์ออกมา ส่วนโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูจะจับอยู่กับพิษงูในคอลัมน์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรของแฟรกชั่นที่เก็บจนกระทั่งได้เท่ากับ baseline จึงเปลี่ยนตัวชะเป็นสารละลาย

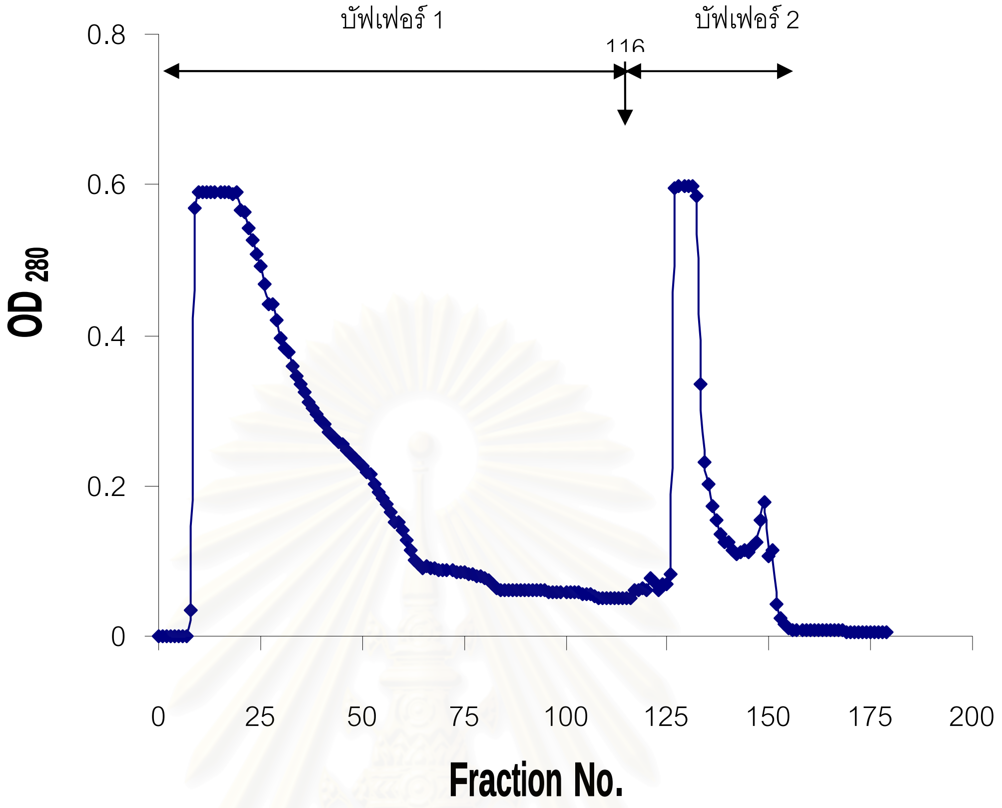
Glycine/HCl ความเข้มข้น 0.1 M pH 2.5 เป็นบัฟเฟอร์ตัวที่ 2 เพื่อชะส่วนของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะกับพิษงูที่จับอยู่ในคอลัมน์ออกมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรได้เท่ากับ baseline จึงกลับไปชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวแรก จากกราฟรูปที่ 3.3 ซึ่งแสดง Chromatogram ของการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะเก็บรวบรวมแฟรกชั่นที่ 33-42 ภายใต้ peak ที่ 2 ซึ่งเป็นส่วนของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะและวัดปริมาณโปรตีนได้ 4.86 มิลลิกรัม (2.31% yield) ในทำนองเดียวกันผลการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3.4 เก็บรวบรวมแฟรกชั่นที่ 48-55 ภายใต้ peak ที่ 2 และนำไปวัดปริมาณโปรตีนได้ 3.51 มิลลิกรัม (2.48% yield) นำแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูที่แยกได้ไปทดสอบแอนติบอดีต่อพิษงู, ความบริสุทธิ์ และแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งสำหรับไว้เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสและ ELISA plate อีกส่วนหนึ่งจะนำไปติดฉลากกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนตรวจสอบพิษงูของวิธี dot-ELISA ต่อไป

เมื่อทำการแยกส่วนของแกมมาโกลบูลินที่ต้องการในหลาย ๆ ครั้งโดยใช้คอลัมน์อันเดิมที่เตรียมไว้จะพบว่า ประสิทธิภาพการจับระหว่างแกมมาโกลบูลินกับพิษงูในแต่ละครั้งจะน้อยลงทำให้ปริมาณแกมมาโกลบูลินที่ต้องการมีปริมาณลดลง อาจเนื่องจากมีการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดสูง ทำให้ประสิทธิภาพการจับกันลดลงและแม้ว่าแกมมาโกลบูลินที่เตรียมได้ในแต่ละครั้งมีปริมาณน้อย เนื่องจากคอลัมน์มีขนาดเล็กแต่ก็ช่วยลดขั้นตอนการแยกส่วนของอัลบูมินออกด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Russell, et al., 1985)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

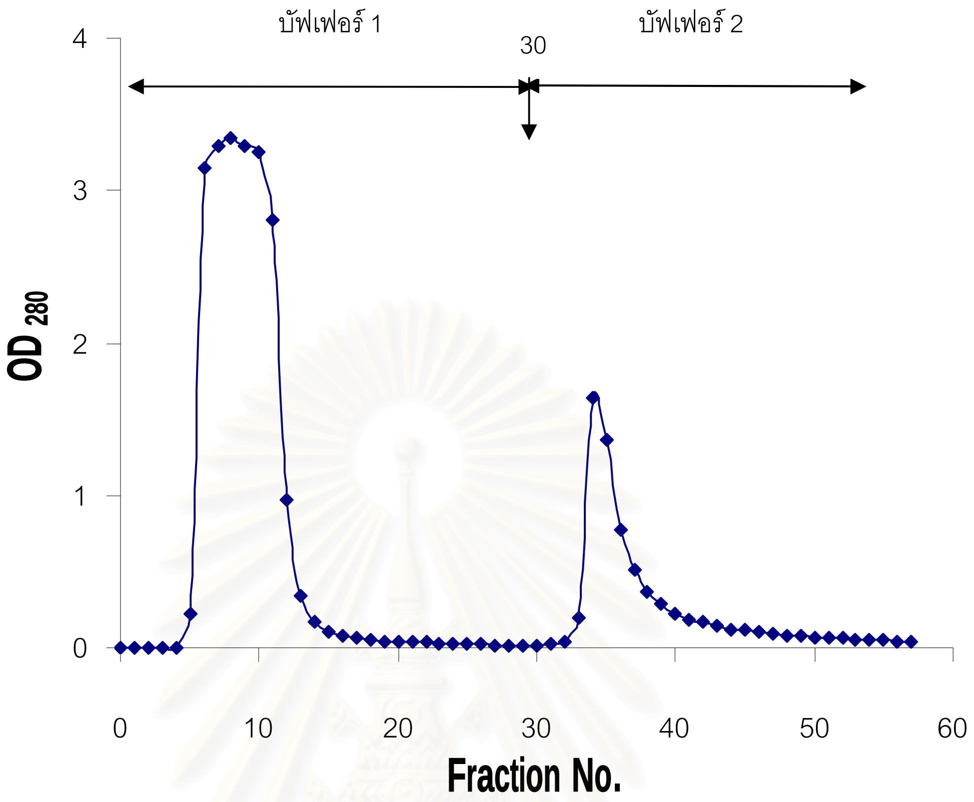


รูปที่ 3.1 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ โดยวิธี Ion-exchange chromatography ทำการแยกด้วย DEAE-cellulose ซึ่งชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวแรกคือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.0175 M pH 6.3 และเปลี่ยนมาชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวที่ 2 ในแฟรกชั่นที่ 101 คือสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.4 M pH 5.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 M อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ปริมาตรแฟรกชั่น 2 มิลลิลิตร



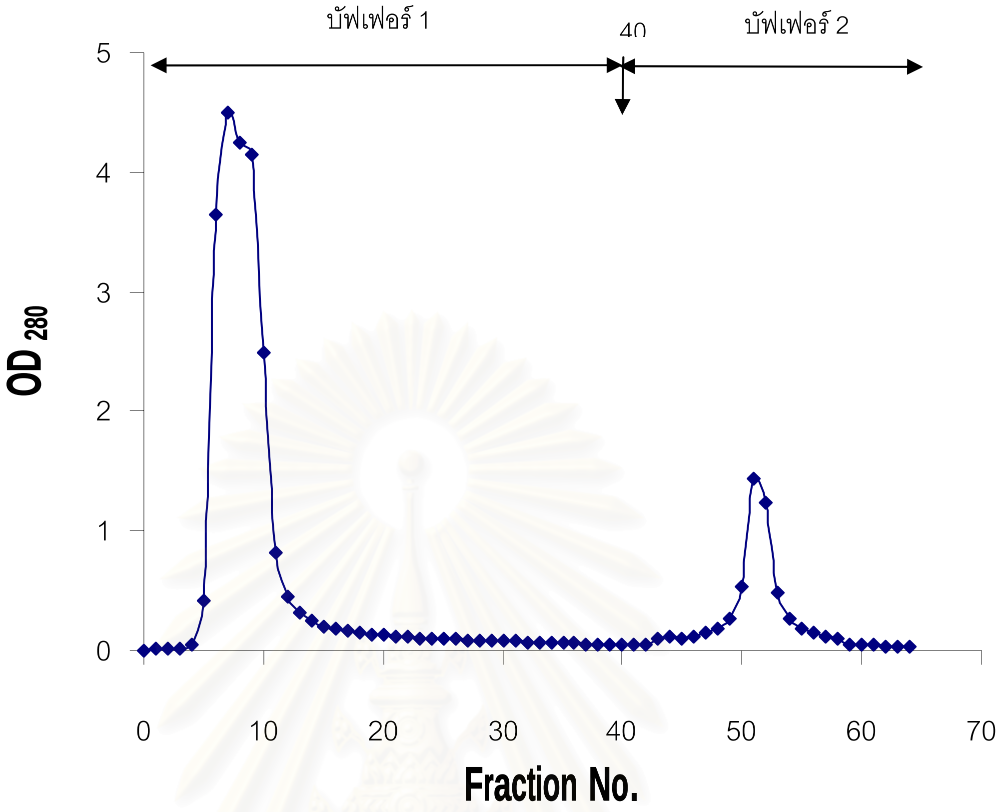
รูปที่3.2 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า โดยวิธี Ion-exchange chromatography ทำการแยกด้วย DEAE-cellulose ซึ่งชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวแรกคือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.0175 M pH 6.3 และเปลี่ยนมาชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวที่ 2 ในแฟรกชั่นที่ 116 คือสารละลายโซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.4 M pH 5.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 M อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ปริมาตรแฟรกชั่น 2 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะโดยวิธี Affinity chromatography ทำการแยกด้วย MPV-Sepharose 4B affinity column ซึ่งชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวแรกคือสารละลาย PBS pH 7.4 และจึงชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวที่ 2 ในแฟรกชั่นที่ 30 คือสารละลาย Gly/HCl ความเข้มข้น 0.1 M pH 2.5 อัตราเร็วในการชะ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ปริมาตรแฟรกชั่น 1 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



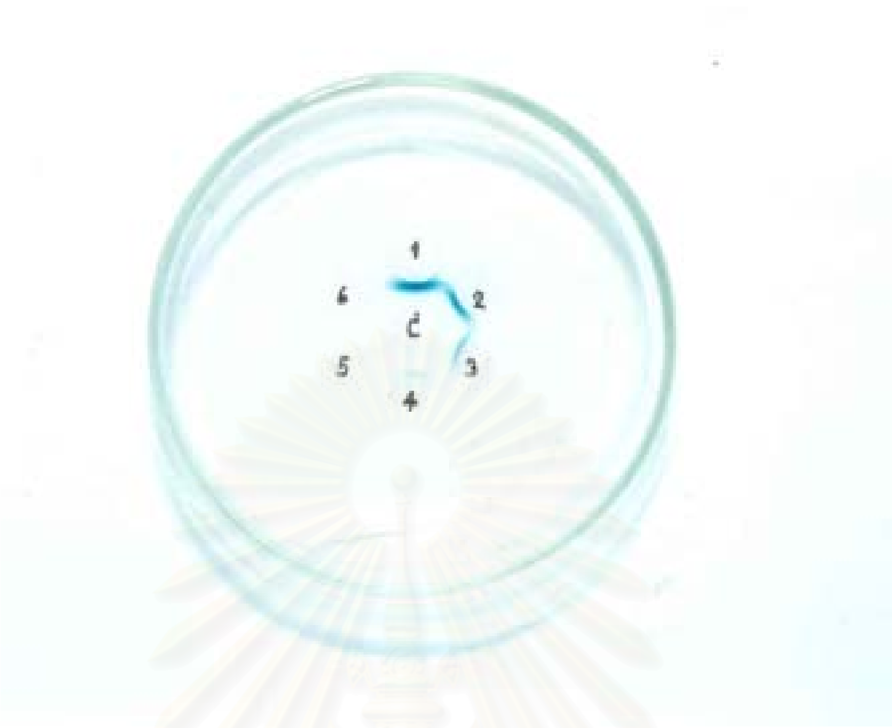
รูปที่ 3.4 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าโดยวิธี Affinity chromatography ทำการแยกด้วย CV-Sepharose 4B affinity column ซึ่งชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวแรกคือสารละลาย PBS pH 7.4 และจึงชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวที่ 2 ในแฟรกชั่นที่ 40 คือสารละลาย Gly/HCl ความเข้มข้น 0.1 M pH 2.5 อัตราเร็วในการชะ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ปริมาตรแฟรกชั่น 1 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี Ion-exchange chromatography และวิธี Affinity chromatography

1.3.1 การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินโดยวิธี Immunodiffusion test

เมื่อนำแกมมาโกลบูลินที่แยกได้โดยวิธี Ion-exchange chromatography (จากข้อ 1.1) และโดยวิธี Affinity chromatography (จากข้อ 1.2) มาตรวจสอบโดยวิธี Immunodiffusion test ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน โดยใช้ 1% agarose gel ในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ซึ่งหลุมกลางจะใส่พิษงูกะปะความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลุมรอบๆหลุมกลางจะใส่แกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากข้อ 1.1 และข้อ 1.2 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเจือจางแบบ 2-fold serial dilution 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 ในหลุมที่ 1- 6 ตามลำดับ ทิ้งไว้ข้ามคืนในกล่องที่มีความชื้น จากนั้นเมื่อนำจานแก้วมาส่องดูกับหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ พบว่า แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูที่ได้จากการแยกโดยวิธี Ion-exchange chromatography ทำปฏิกิริยากับพิษงูกะปะที่หลุมกลางเห็นเส้นตะกอนขาวขุ่นเกิดขึ้นอยู่กึ่งกลางระหว่างหลุม c กับหลุม 1 และเส้นตะกอนจะเกิดน้อยลงในหลุม 2, 3 และไม่เกิดเส้นตะกอนในหลุมที่ 4-6 ดังรูปที่ 3.5 สำหรับแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่ได้จากการแยกโดยวิธี Affinity chromatography ทำปฏิกิริยากับพิษงูกะปะที่หลุมกลางเห็นเส้นตะกอนขาวขุ่นเกิดขึ้นเช่นกันซึ่งอยู่กึ่งกลางระหว่างหลุม c กับหลุม 1 ดังรูปที่ 3.6 และเส้นตะกอนจะเกิดน้อยลงในหลุม 2, 3 และ 4 และไม่เกิดเส้นตะกอนในหลุมที่ 5- 6 ดังนั้นแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากทั้งสองวิธีจะทำปฏิกิริยากับพิษงูที่หลุมกลางเกิดเส้นตะกอนขึ้น นั่นคือส่วนของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูนั้น ในการทดสอบความเข้มข้นของหลุมเริ่มต้นควรจะเท่ากับหลุมกลางเพราะจะทำให้เส้นตะกอนเกิดขึ้นที่กึ่งกลาง หากความเข้มข้นของหลุมไม่เท่ากันจะทำให้เส้นตะกอนที่เกิดขึ้นอยู่ใกล้กับหลุมที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของแกมมาโกลบูลินที่มีความแรง (potency) ต่อพิษงูที่ได้จากการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ion-exchange chromatography (จากรูปที่ 3.5) และโดยวิธี Affinity chromatography (จากรูปที่ 3.6) จะเห็นว่าแกมมาโกลบูลินที่แยกได้โดยวิธี Ion-exchange chromatography มีระดับแอนติบอดีที่มีความแรงต่อพิษงูถึงอัตราส่วน 1:4 และแกมมาโกลบูลินที่แยกได้โดยวิธี Affinity chromatography จะมีความแรงต่อพิษงูถึงอัตราส่วน 1:8 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น (undilute) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าแกมมาโกลบูลินที่แยกได้โดยวิธี Affinity chromatography จะมีแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูมากกว่าแกมมาโกลบูลินที่แยกโดยวิธี Ion-exchange chromatography



รูปที่ 3.5 ผล Immunodiffusion ของแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี Ion-exchange Chromatography, หลุม c = พิษงูกะปะ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, หลุม 1- 6 คือ แกมมาโกลบูลิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เจือจางในอัตราส่วน = undilute, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

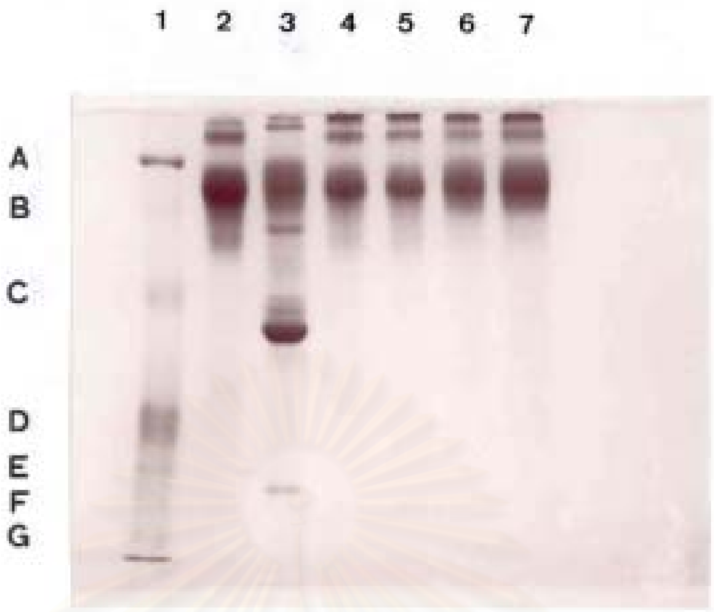
รูปที่3.6 ผล Immunodiffusion ของแกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี Affinity Chromatography, หลุม c = พิษงูกะปะ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, หลุม 1-6 คือ แกมมาโกลบูลิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เจือจางในอัตราส่วน = undilute, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.2 การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินโดยวิธี SDS-PAGE

แกมมาโกลบูลินที่แยกให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Ion exchange chromatography (จากข้อ 1.1) และโดยวิธี Affinity chromatography (จากข้อ 1.2) นำมาตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสารโดยใช้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า ในการทดลองใช้ 8 % acrylamide ใน 0.75 M Tris-HCl pH 8.8 เป็น separating gel และจะใช้ 3.75 % acrylamide ใน 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 เป็น stacking gel แล้วนำมาเทียบกับแถบโปรตีน Horse IgG มาตรฐาน และแถบโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 7 ชนิดได้แก่ Aprotinin (7.1 kDa), Lysozyme (18.1 kDa), Soybean trypsin inhibitor (31.8 kDa), Carbonic anhydrase (41.3 kDa), Bovine serum albumin (89.0 kDa), β-Galactosidase (131.0 kDa) และ Myosin (210.0 kDa) ดังรูปที่ 3.7 พบว่า แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (แถวที่ 4) และแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (แถวที่ 5) ซึ่งแยกโดยวิธี Ion - exchange chromatography รวมถึงแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (แถวที่ 6) และแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (แถวที่ 7) ซึ่งแยกโดยวิธี Affinity chromatography ปรากฏแถบโปรตีนแถบเดียวมีขนาดโมเลกุล 140 กิโลดาลตันและตรงกับแถบของโปรตีน Horse IgG มาตรฐาน ไม่พบแถบโปรตีนของอัลบูมินดังเช่นในแถวที่ 3 ที่แสดงแถบโปรตีนของพลาสมาที่ประกอบด้วยโกลบูลิน, อัลบูมินและโปรตีนอื่นๆ ดังนั้นการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะและจำเพาะต่อพิษงูเห่าทั้งโดยวิธี Ion - exchange chromatography และโดยวิธี Affinity chromatography สามารถแยกโปรตีนส่วนอื่นในพลาสมาออกจากแกมมาโกลบูลินที่ต้องการได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.7 การตรวจสอบแกมมาโกลบูลินโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ separating gel เป็น 8% acrylamideใน 0.75 M Tris-HCl pH 8.8 และใช้ stacking gel เป็น 3.75% acrylamideใน 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 เปิดกระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ และใช้ Tris running buffer ในขั้นตอนการแยกสารแล้วนำเจลไปย้อมสีกับ Coomassie blue R 250 staining solution ล้างกับ destain solution

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (kDa) A=210, B=131, C=89, D=41.3, E=31.8, F=18.1, G= 7.1

แถวที่ 2 โปรตีน Horse IgG มาตรฐาน

แถวที่ 3 พลาสมาตั้งต้น (Horse Plasma)

แถวที่ 4 แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่แยกโดยวิธี Ion-exchange chromatography

แถวที่ 5 แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าที่แยกโดยวิธี Ion-exchange chromatography

แถวที่ 6 แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่แยกโดยวิธี Affinity chromatography

แถวที่ 7 แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าที่แยกโดยวิธี Affinity chromatography

2. การแยกแกมมาโกลบูลิน-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกตโดยวิธี Gel filtration chromatography และการตรวจสอบการติดฉลากแกมมาโกลบูลินด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกตโดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต

เมื่อเตรียมแกมมาโกลบูลิน-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกตตามวิธีของ Nakane (1974) แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วย Sephadex G-200 เพื่อแยกคอนจูเกตออกจากแกมมาโกลบูลินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ไม่ได้จับกันเป็นคอนจูเกต ด้วยหลักการของ Gel filtration chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสารโดยใช้ขนาดโมเลกุล โดยตัวดูดซับซึ่งเป็นเจลที่มีรูพรุนจะมีสมบัติยอมให้โมเลกุลขนาดเล็กผ่านเข้าไปข้างในรูพรุนได้ แต่โมเลกุลขนาดใหญ่กว่ารูจะไม่สามารถเข้าไปได้ทำให้ถูกชะออกมาก่อน และสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราช้ากว่า การแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสาร ในกรณีนี้คอนจูเกตมีโมเลกุลใหญ่ที่สุดจะผ่านออกมาก่อน ส่วนแกมมาโกลบูลินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเข้าไปผ่านช่องของ Sephadex G-200 จะเคลื่อนออกมาทีหลังตามลำดับ

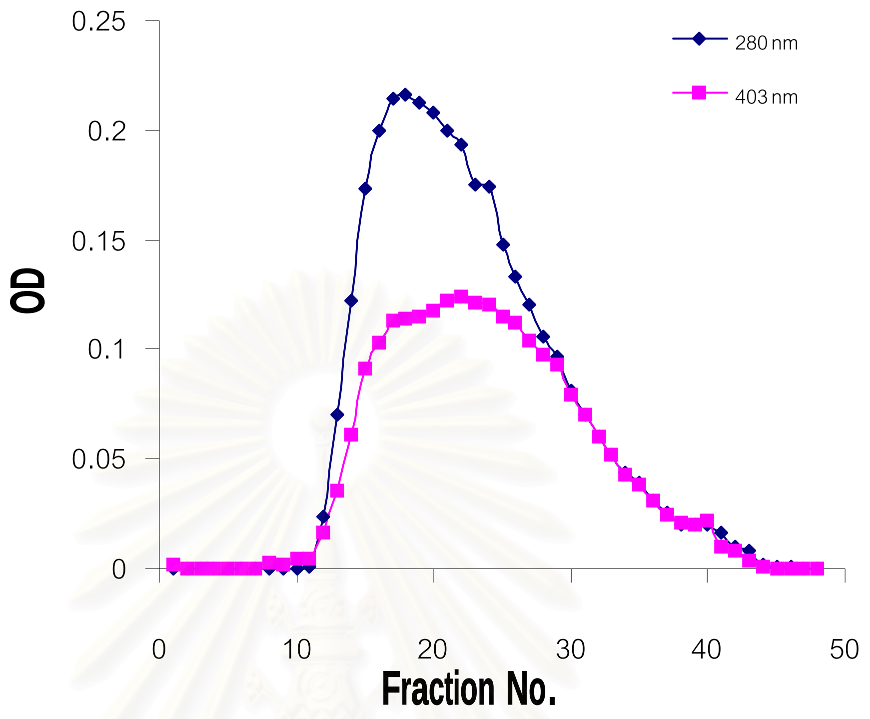
จากผลที่แสดงในกราฟรูปที่ 3.8 ซึ่งเป็นการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (โดยวิธี Ion-exchange chromatography) – เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต พบว่า แยกได้ peak ขนาดใหญ่ที่มี shoulder และ tail (แฟรกชั่นที่ 14-28) มีปริมาณโปรตีน 2.35 มิลลิกรัม (77.5% yield) และกราฟรูปที่ 3.10 ซึ่งเป็นการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี Ion-exchange chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต ได้ peak (แฟรกชั่นที่ 12-27) เดียวเช่นกันโดยมีปริมาณโปรตีน 2.48 มิลลิกรัม (91.3% yield) จะเห็นว่าการแยกคอนจูเกตของทั้งสองครั้งไม่สามารถแยกแกมมาอิมมูโนโกลบูลินอิสระและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอิสระออกจากคอนจูเกตได้ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการตรวจสอบแต่ละแฟรกชั่นด้วยวิธี ELISA โดยเคลือบพิษงูที่จำเพาะไว้บนไมโครเพลตจะพบว่า แฟรกชั่นเหล่านี้ทำให้เกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับ OPD ซึ่งเป็นสับสเตรตของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แสดงว่าเป็นแฟรกชั่นที่มีคอนจูเกตที่ต้องการอยู่ กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรเป็นดังรูปที่ 3.9 และรูปที่ 3.11

ผลของวิธี ELISA และการแยกคอนจูเกตโดยวิธี Gel filtration chromatography แสดงว่าในแต่ละแฟรกชั่นที่นำมารวมกันนั้นมีคอนจูเกตเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงนำส่วนของแฟรกชั่นที่ 14-28 ตามกราฟรูปที่ 3.8 มารวมกันและแฟรกชั่นที่ 12-27 ตามกราฟรูปที่ 3.10 มารวมกันแล้วนำสารละลายที่ได้มาแบ่งเป็นส่วน (aliquot) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 ^{o}C เพื่อใช้ในขั้นตอนของ dot-ELISA ต่อไป

ในทำนองเดียวกันผลการแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (โดยวิธี affinity chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต ดังกราฟรูปที่ 3.12 สามารถแยกได้เป็น peak ขนาดใหญ่ peak เดียว (แฟรกชั่นที่ 10-18) มีปริมาณโปรตีน 1.86 มิลลิกรัม (70.9% yield) และการ

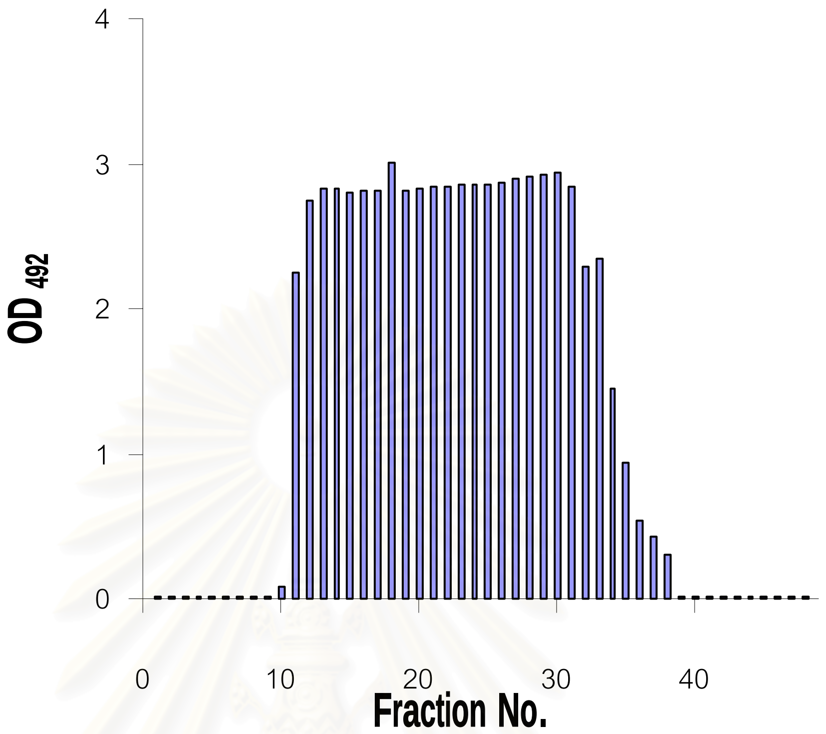
แยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี affinity chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต ดังกราฟรูปที่ 3.14 สามารถแยกได้เป็น peak ขนาดใหญ่ peak เดียวเช่นกัน (แฟรกชั่นที่ 13-18) มีปริมาณโปรตีน 2.25 มิลลิกรัม (80% yield) เมื่อทำการตรวจสอบแต่ละแฟรกชั่นของการแยกคอนจูเกตทั้งสองครั้งโดยวิธี ELISA บนไมโครเพลตที่เคลือบด้วยพิษงู (กราฟรูปที่ 3.13 และกราฟรูปที่ 3.15) พบว่าในแฟรกชั่นที่เลือกไว้ของทั้งสองคอนจูเกตที่แยกได้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรมีค่าสูง นั่นคือมีคอนจูเกตที่ต้องการ จึงนำส่วนของแฟรกชั่นที่ 10-18 ตามกราฟรูปที่ 3.12 มารวมกันและนำแฟรกชั่นที่ 13-18 ตามกราฟรูปที่ 3.14 มารวมกันแล้วนำสารละลายที่ได้มาแบ่งเป็นส่วนและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 ^{o}C เพื่อใช้ในขั้นตอนของ dot-ELISA ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



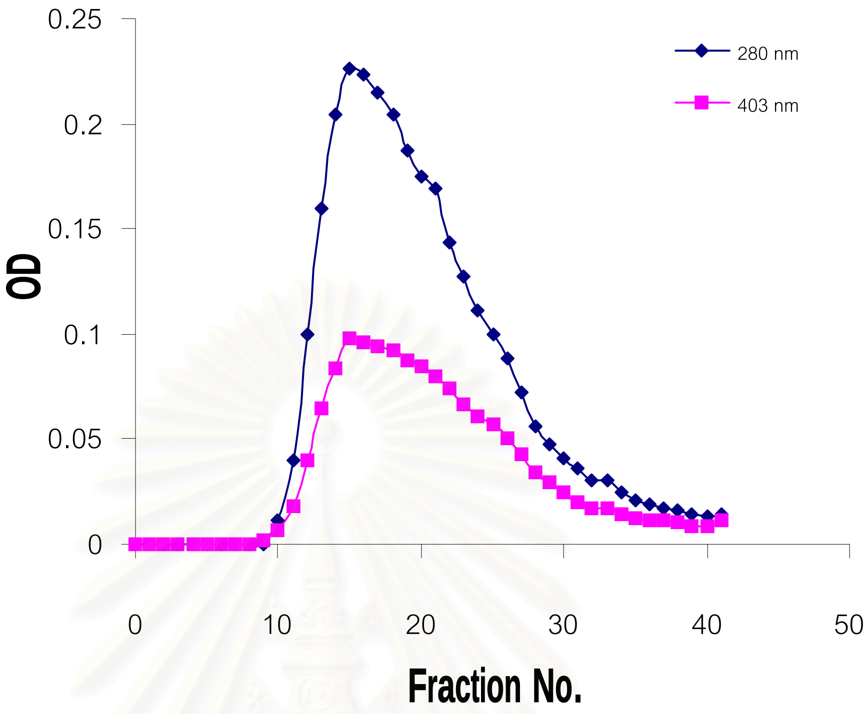
รูปที่ 3.8 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (โดยวิธี Ion - exchange chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex G-200 ชะด้วยบัฟเฟอร์ PBS pH 7.2, อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ปริมาตรแฟรกชั่น 1.5 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



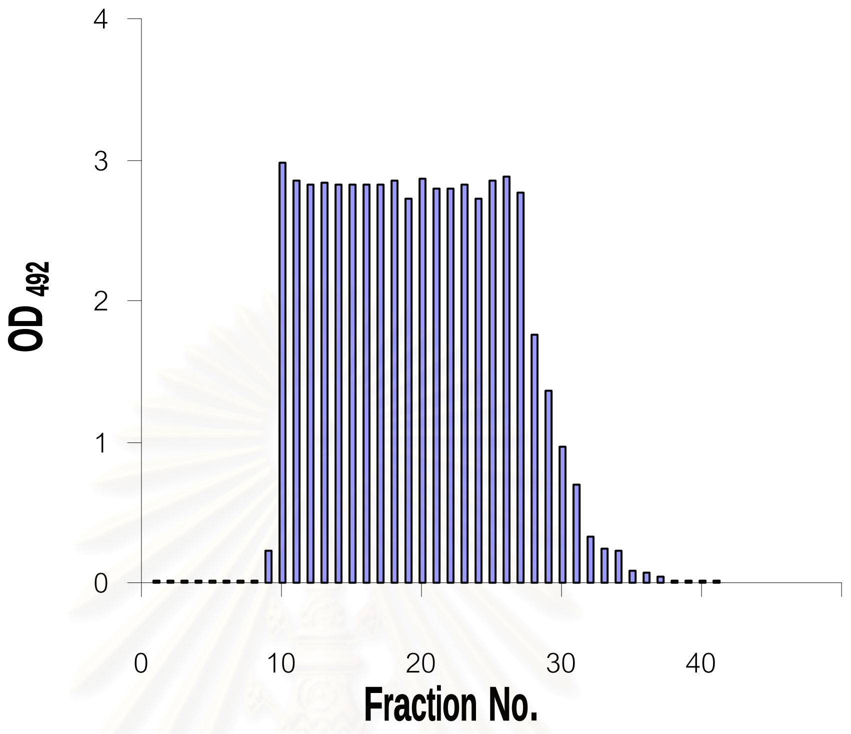
รูปที่ 3.9 การทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ(โดยวิธี Ion - exchange chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



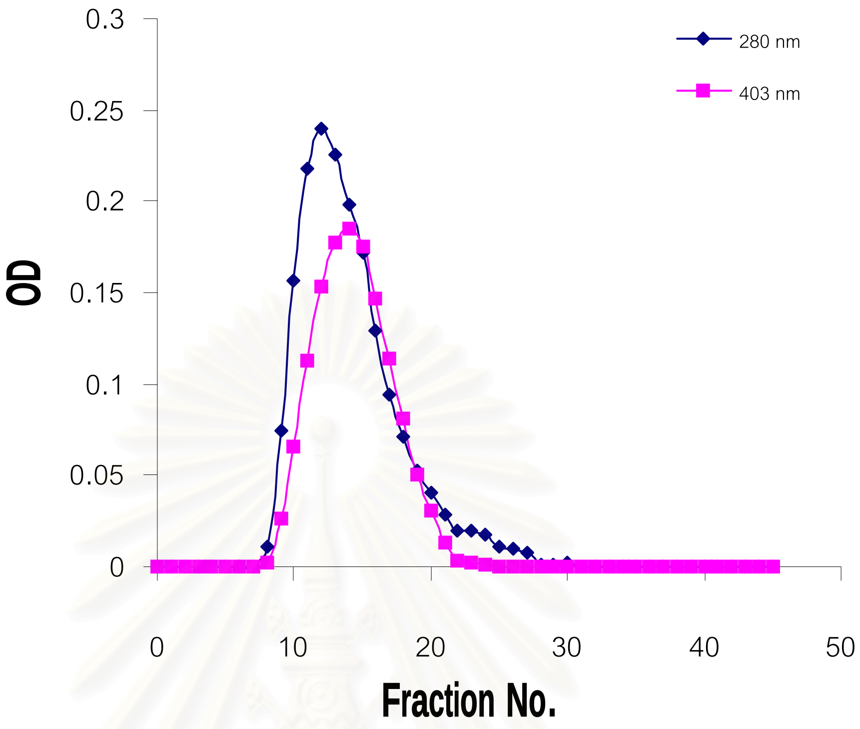
รูปที่ 3.10 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี Ion – exchange chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex G-200 ชะด้วยบัฟเฟอร์ PBS pH 7.2, อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ปริมาตรแฟรกชั่น 1.5 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



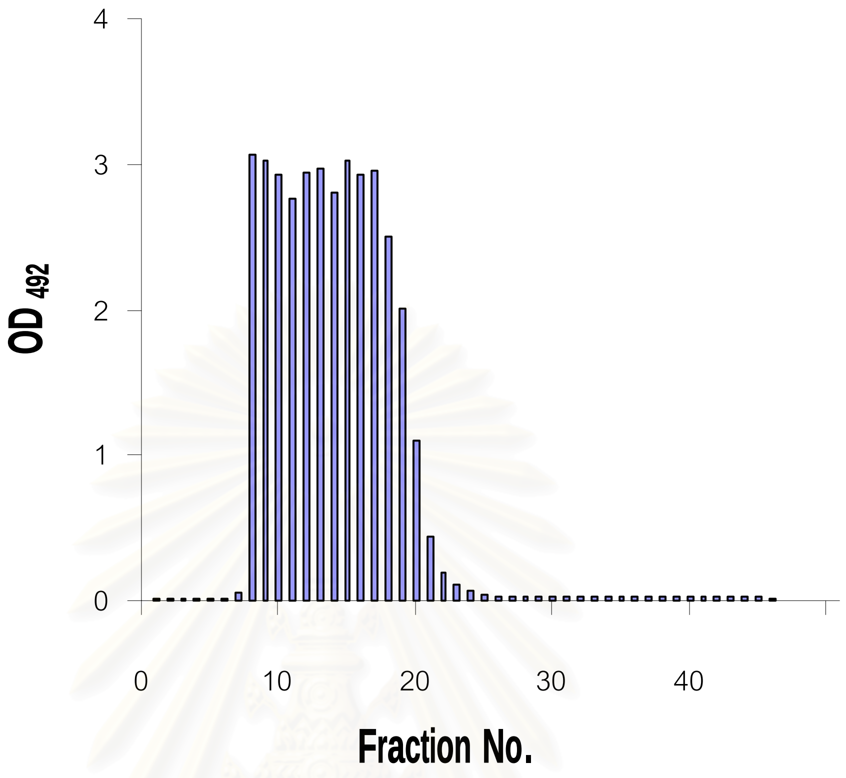
รูปที่ 3.11 การทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี Ion-exchange chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



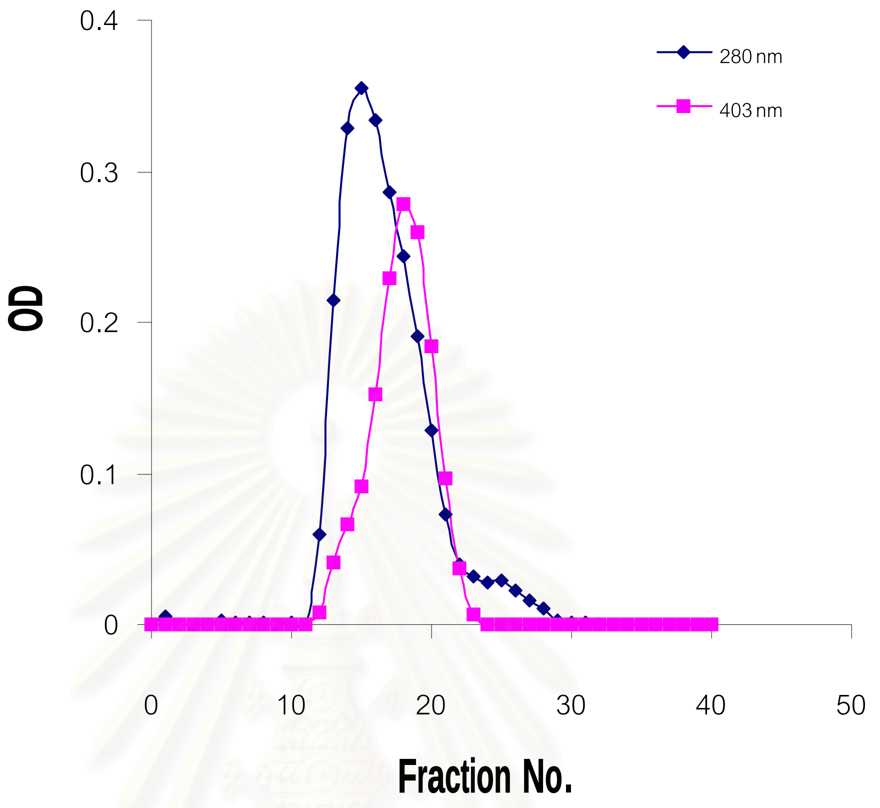
รูปที่ 3.12 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (โดยวิธี affinity chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex G-200 ชะด้วยบัฟเฟอร์ PBS pH 7.2, อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ปริมาตรแฟรกชั่น 1.5 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



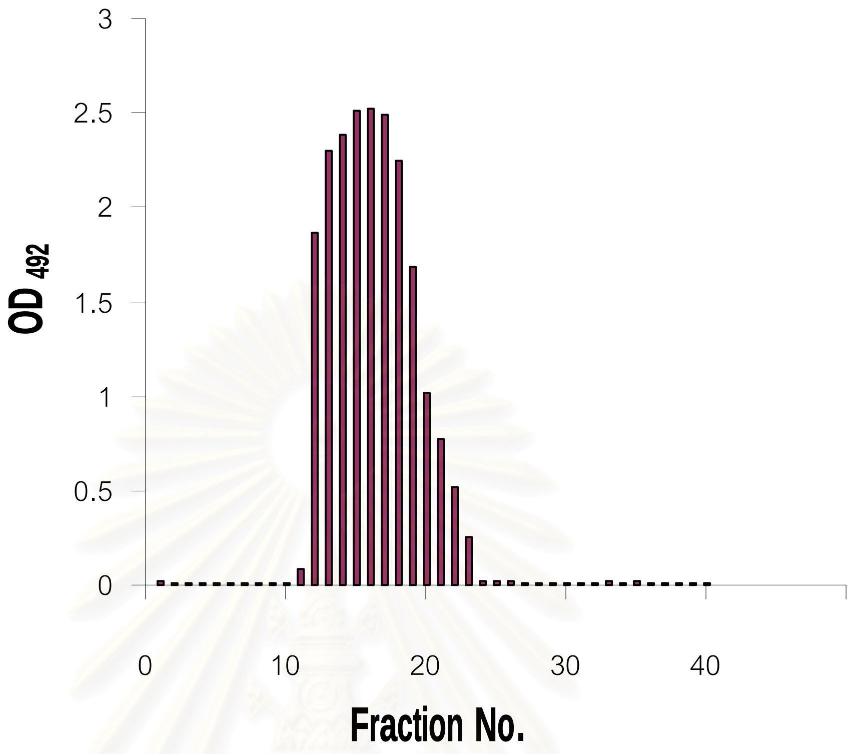
รูปที่ 3.13 การทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (โดยวิธี affinity chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.14 การแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี affinity chromatography) -เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต โดยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex G-200 ชะด้วยบัฟเฟอร์ PBS pH 7.2, อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ปริมาตรแฟรกชั่น 1.5 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



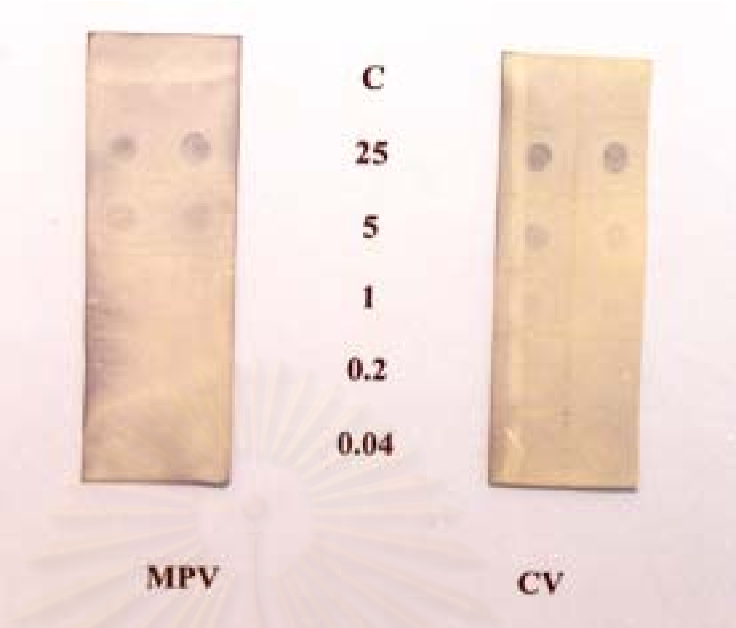
รูปที่ 3.15 การทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (โดยวิธี affinity chromatography)-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกตโดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาชนิดของพิษงูโดยวิธี dot-ELISA

นำแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูหยดเคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตรปล่อยให้แห้งและล้าง จากนั้นนำไปแช่ใน 5% blotto แล้วล้าง ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง หยดพิษงูที่มีความเข้มข้นต่างๆกันปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วล้างและแช่ในแกมมาโกลบูลิน-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต แล้วล้าง นำไปแช่ในสารละลายสับสเตรตแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง ตามขั้นตอนดังรูปที่ 2.5 ดูสีที่เกิดขึ้นแต่ละจุดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส และเพื่อให้การตรวจสอบพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA ได้ผลที่เห็นสีชัดเจนที่สุด จึงทำการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบชนิดของพิษงู ได้ผลดังนี้

3.1 การตรวจสอบพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี Ion-exchange chromatography

จากการทดสอบ (ตามขั้นตอนในข้อ 3 ข้างต้น)ใช้แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูที่แยกได้จากวิธี Ion-exchange chromatography หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสปริมาตร 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและแช่ใน 5% blotto จากนั้นเจือจางพิษงูที่ความเข้มข้นต่างๆกันหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วแช่ในแกมมาโกลบูลิน-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต ตามขั้นตอนของวิธี dot-ELISA พบว่า สามารถตรวจสอบระดับพิษงูกะปะได้ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสามารถตรวจสอบระดับพิษงูเห่าได้ที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ PBS เป็นชุดควบคุม(control) ในการตรวจสอบระดับพิษงูทั้งสองชนิดพบว่าไม่เกิดจุดสีขึ้นที่จุดของ PBS ดังรูปที่ 3.16 แต่หลังการตรวจสอบระดับพิษงูกะปะจะพบว่า พื้นผิวบางส่วนของกระดาษไนโตรเซลลูโลสจะเปื้อนสีของสับสเตรต ทำให้มองเห็นจุดสีบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสได้ไม่ชัดเจน ซึ่งอาจเกิดจาก non-specific ในแกมมาโกลบูลินมาจับบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ทำให้พื้นของกระดาษเปื้อน ส่วนการตรวจสอบระดับพิษงูเห่าพบว่าพื้นของกระดาษไนโตรเซลลูโลสจะสะอาดขาวกว่า ทำให้มองเห็นจุดสีของพิษงูได้ชัดเจน ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองแยกแกมมาโกลบูลินโดยวิธี affinity chromatography เพื่อให้ได้แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะและแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าที่บริสุทธิ์มากขึ้น ปราศจากแกมมาโกลบูลินชนิดไม่จำเพาะอื่นๆ เมื่อทดสอบซ้ำภายใต้ภาวะเดียวกัน พบว่าแม้จะตรวจสอบพิษได้ในระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกับเดิม แต่จะสังเกตสีของจุดได้ชัดเจนกว่ามาก



รูปที่ 3.16 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี Ion-exchange chromatography, MPV= การตรวจสอบพิษงูกะปะ, CV= การตรวจสอบพิษงูเห่า ที่ระดับความเข้มข้นของพิษงูต่างๆ [C=ชุดควบคุม, ตัวเลขเป็นความเข้มข้นในหน่วย µg/mL]

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาชนิดของพิษงูโดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี affinity chromatography

3.2.1 การหาความเจือจางของการใช้คอนจูเกตและความเจือจางของแกมมาโกลบูลินที่ใช้เคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เหมาะสม

นำแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูที่แยกได้ด้วยวิธี affinity chromatography หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสปริมาตร 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแช่ใน blotto 5% จากนั้นหยดพิษงูที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรตามขั้นตอนของวิธี dot-ELISA แล้วเจือจางคอนจูเกตด้วย 5 % blotto ในอัตราส่วน undilute, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:50 และ 1:100 เพื่อหาความเจือจางที่เหมาะสมของคอนจูเกต โดยการทดลองทำแบบ duplicate พบว่า ใช้แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ- เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)ในอัตราส่วน 1:4 เหมาะสมที่สุด ซึ่งสามารถมองเห็นจุดสีของระดับพิษงูกะปะที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและที่จุดของระดับพิษงูกะปะที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็น

สีจางและที่ระดับพิษ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี ดังรูปที่ 3.17 สำหรับแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ให้ผลเช่นเดียวกัน คือใช้คอนจูเกตในอัตราส่วน 1: 4 เหมาะสมที่สุด ซึ่งสามารถมองเห็นจุดสีของระดับพิษงูเห่าที่ 25, 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและที่จุดของระดับพิษงูเห่าที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นสีจาง (ไม่ได้แสดงรูป) สำหรับคอนจูเกตของทั้งงูกะปะและงูเห่าเมื่อเจือจางที่อัตราส่วน 1:8, 1:16, 1:32, 1:50, 1:100 ไม่สามารถมองเห็นจุดสีของระดับพิษงูที่ 25, 5, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากการเจือจางของคอนจูเกตมากเกินไป ทำให้ปริมาณของคอนจูเกตที่จะจับกับพิษงูมีน้อย ดังนั้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ทำต่อสับสเตรตเพื่อให้เกิดสีจึงเกิดน้อย ทำให้เห็นสีจางมากกระทั่งมองจนไม่เห็นสี

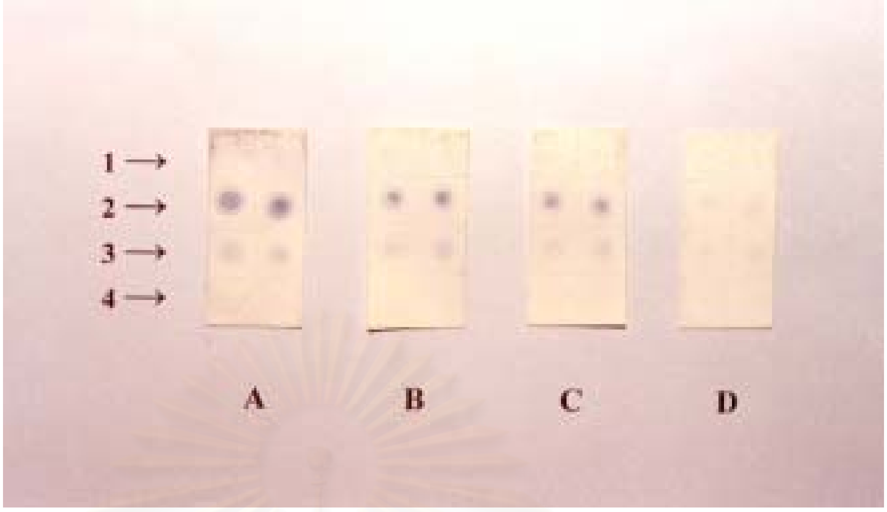
ความเข้มข้นของแกมมาโกลบูลินที่ใช้เคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสในขั้นแรกสุดเป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่ได้ทำการศึกษา โดยการเจือจางแกมมาโกลบูลินกับ PBS ให้มีความเข้มข้น 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยทำแบบ duplicate และทำตามขั้นตอนของวิธี dot-ELISA พบว่า ความเข้มข้นของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะเท่ากับ 50, 100, 200, 500, 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรให้ผลเช่นเดียวกันซึ่งสามารถมองเห็นจุดสีของระดับพิษงูกะปะที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่จุดของระดับพิษงูกะปะที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นสีจางและที่ระดับพิษ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี ดังรูปที่ 3.18 ส่วนแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ใช้เคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสสามารถมองเห็นจุดสีจางที่ระดับพิษงูกะปะ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ระดับพิษงูกะปะที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นจุดสีจางมากและระดับพิษงูกะปะที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี และสำหรับแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ใช้เคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสไม่สามารถมองเห็นจุดสีของระดับพิษงูกะปะที่ 25, 5, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสตามวิธี dot-ELISA และเช่นเดียวกันได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าที่ใช้เคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยการเจือจางแกมมาโกลบูลินด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100, 200, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าที่เหมาะสมในการเคลือบลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสคือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ใช้เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส หากมีปริมาณสูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 1 ไมโครลิตร จะเป็นส่วนเกินที่จะสามารถจับบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสได้ ทำให้ถูกล้างออกไปและหากมีความเข้มข้นต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปริมาตร 1 ไมโครลิตร ก็ทำให้มีพื้นที่บางส่วนว่าง ดังนั้นแกมมาโกลบูลินที่จับบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสจึงมีน้อย ส่งผลให้ปริมาณที่ตรวจสอบได้มีน้อย สีที่เกิดขึ้นมีสีจางจนถึงมองไม่เห็น

3.2.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มแกมมาโกลบูลิน

ในการทดลองนี้ใช้แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อ้างจากข้อ 3.2.1) ในการเคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25, 37, 56 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามวิธี dot-ELISA เพื่อการตรวจหาชนิดของพิษงูที่ความเข้มข้น 1, 5, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำแบบ duplicate พบว่า อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งใช้ในการบ่มแกมมาโกลบูลินที่เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้ผลในการตรวจสอบพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 1, 5, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ ระดับพิษงูกะปะที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถมองเห็นจุดสีบนกระดาษและที่จุดของระดับพิษงูกะปะที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นสีจางและที่ระดับพิษ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี ซึ่งจะใช้ PBS เป็นชุดควบคุม(control) ก็พบว่าไม่เกิดจุดสีขึ้น ดังรูปที่ 3.19 ดังนั้นในการทดสอบจึงสามารถใช้ได้ทุกอุณหภูมิในการบ่มแกมมาโกลบูลินบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แต่การทดลองครั้งนี้จะเลือกที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C ในการบ่มเพราะช่วยให้กระดาษแห้งเร็วขึ้น ซึ่งอาจช่วยลดเวลาในการบ่มกระดาษโดยจะทำการทดลองในขั้นต่อไป และในทำนองเดียวกัน เมื่อทำการทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อ้างจากข้อ 3.2.1) ที่อุณหภูมิต่างๆ และขั้นตอนที่ทดสอบเหมือนกับการทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ ก็พบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน (ไม่ได้แสดงรูป) ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C ในการบ่มแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

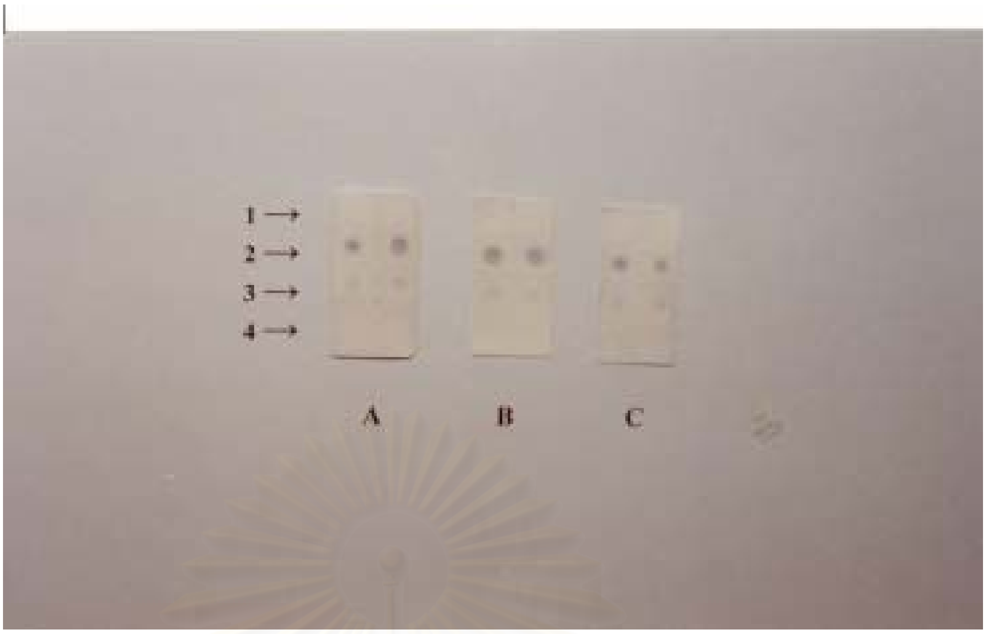
ในอีกขั้นตอนหนึ่งที่ต้องมีการบ่มคือ ขั้นตอนที่หยดพิษงูลงไปให้จับกับแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงู จากการทดสอบหยดพิษงูกะปะที่ระดับพิษ 1, 5, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 25, 37, 56 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามวิธี dot-ELISA พบว่า ที่อุณหภูมิต่างๆ ในการบ่มพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่างๆ ให้ผลในการตรวจสอบไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ ระดับพิษงูกะปะที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถมองเห็นจุดสีบนกระดาษและที่จุดของระดับพิษงูกะปะที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นสีจางและที่ระดับพิษ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี ดังรูปที่ 3.20 ส่วนการตรวจระดับพิษงูเห่าให้ผลเช่นเดียวกัน (ไม่ได้แสดงรูป) ดังนั้นในการบ่มพิษงูกะปะและพิษงูเห่าในการทดลองจะบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C



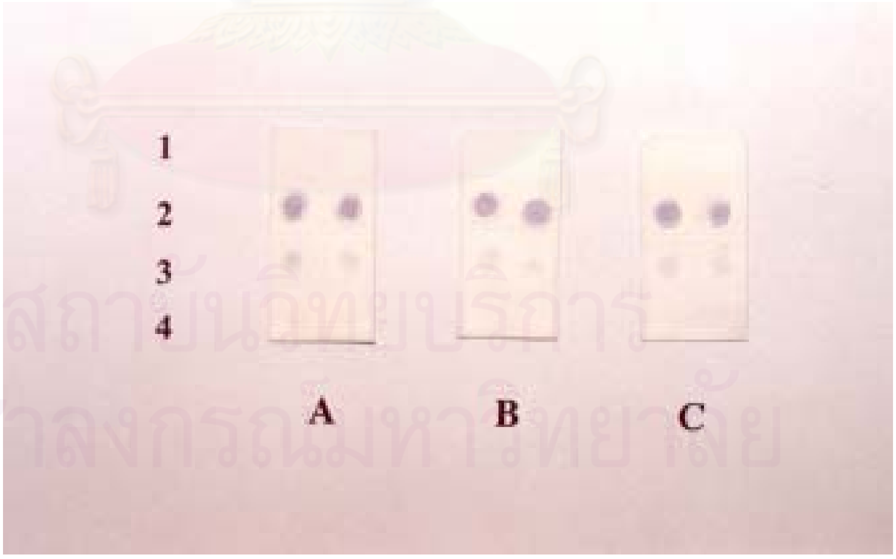
รูปที่3.17 ผลของการใช้คอนจูเกตที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ (A= undilute, B= 1:2, C= 1:4, D= 1:8) ในการตรวจพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่าง ๆ [1=ชุดควบคุม (PBS), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่3.18 ความเข้มข้นของแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่ใช้เคลือบลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (μg/mL) A=1,000, B=500, C=200, D=100, E=50, F=10, G=1 ในการตรวจพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่างๆ [1=ชุดควบคุม(PBS), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL]



รูปที่3.19 สภาวะอุณหภูมิต่างๆ ในการบ่มหลังขั้นตอนการเติมแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ A=25 °C, B=37 °C, C=56 °C ในการตรวจพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่างๆ [1=ชุดควบคุม(PBS), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL]



รูปที่ 3.20 สภาวะอุณหภูมิต่างๆ ในการบ่มหลังขั้นตอนการหยดพิษงูกะปะ A=25 °C, B=37 °C, C=56 °C ในการตรวจพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่างๆ [1=ชุดควบคุม (PBS), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL]

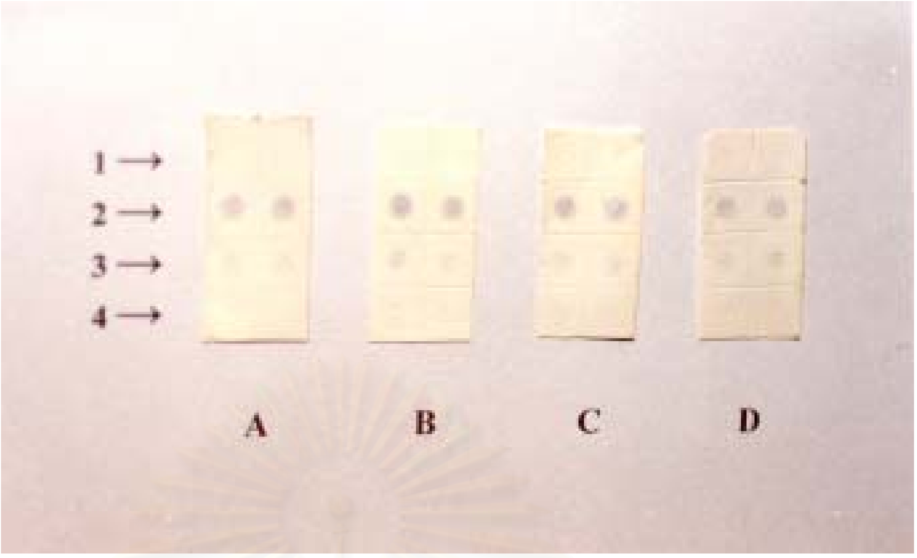
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนต่างๆ

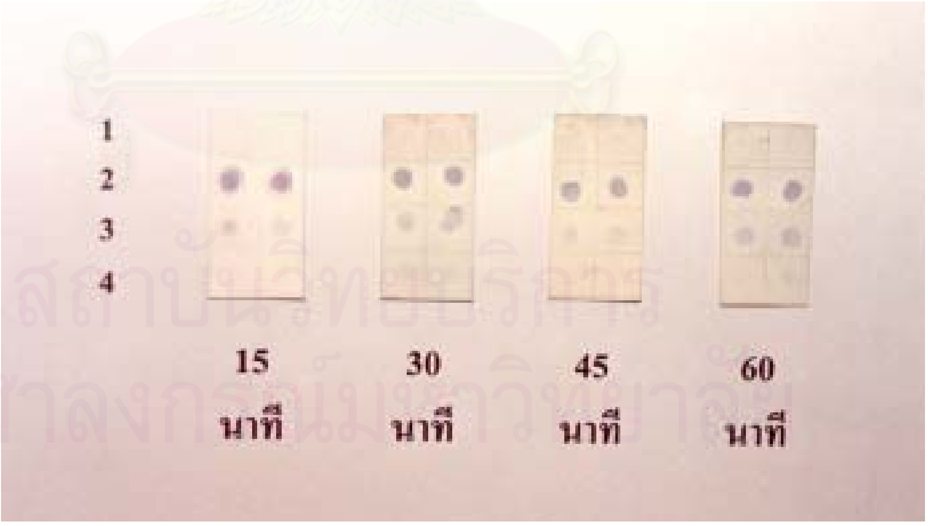
จากการทดสอบใช้แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อ้างจากข้อ 3.2.1) ในการเคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$ (อ้างจากข้อ 3.2.2) เป็นเวลาต่างๆได้แก่ 15, 30, 45, 60 นาที ตามวิธี dot-ELISA เพื่อการตรวจหาชนิดของพิษงูที่ความเข้มข้น 1, 5, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำแบบ duplicate พบว่า การบ่มแกมมาโกลบูลินที่เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ที่ระยะเวลาต่างๆ ให้ผลในการตรวจสอบพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 1, 5, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ ระดับพิษงูกะปะที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถมองเห็นจุดสีบนกระดาษและที่จุดของระดับพิษงูกะปะที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นสีจางและที่ระดับพิษ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี ซึ่งเมื่อใช้ PBS เป็นชุดควบคุม (control) ก็พบว่าไม่เกิดจุดสีขึ้น (ดังรูปที่ 3.21) ดังนั้นการบ่มแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะในการทดลองจึงเลือกใช้เวลา 15 นาที และในทำนองเดียวกัน เมื่อทดสอบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าจะให้ผลเหมือนกัน (ไม่ได้แสดงรูป) ดังนั้นในการบ่มแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าในการทดลองจึงเลือกใช้เวลา 15 นาที เช่นกัน

จากการทดสอบหยดพิษงูกะปะที่ระดับพิษ 1, 5, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 15, 30, 45, 60 นาที ตามวิธี dot-ELISA พบว่า ในเวลาต่างๆ ในการบ่มพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่างๆ ให้ผลในการตรวจสอบไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ ระดับพิษงูกะปะที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถมองเห็นจุดสีบนกระดาษและที่จุดของระดับพิษงูกะปะที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นสีจางและที่ระดับพิษ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี (ดังรูปที่ 3.22) ส่วนการตรวจระดับพิษงูเห่าให้ผลเช่นเดียวกัน (ไม่ได้แสดงรูป) ดังนั้นในการบ่มพิษงูกะปะและพิษงูเห่าในการทดลองจะบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



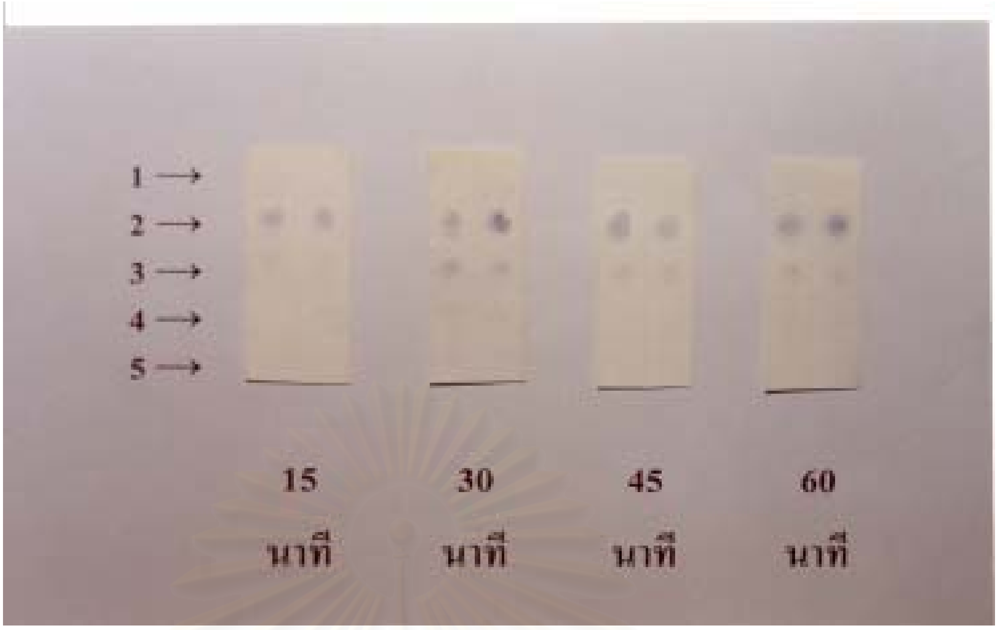
รูปที่ 3.21 ระยะเวลาต่างๆในการบ่มแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ A=15 นาที, B=30 นาที, C=45 นาที, D=60 นาที เพื่อตรวจพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่างๆ [1=ชุดควบคุม(PBS), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL]



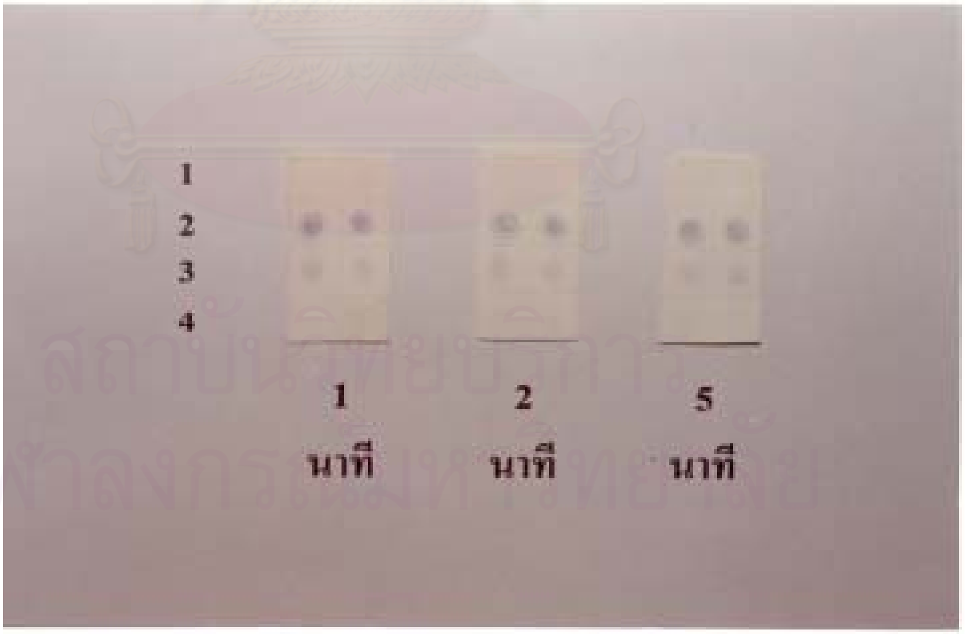
รูปที่ 3.22 ระยะเวลาต่าง ๆ (15, 30, 45, 60 นาที) ในการบ่มพิษงูกะปะ เพื่อตรวจพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่างๆ [1=ชุดควบคุม(PBS), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL]

จากการทดสอบในขั้นตอนการบ่มกระดาษไนโตรเซลลูโลสในคอนจูเกต อัตราส่วน 1:4 (อ้างจากข้อ 3.2.1) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15, 30, 45, 60 นาที ตามวิธี dot-ELISA พบว่า การบ่มกระดาษไนโตรเซลลูโลสในคอนจูเกต เป็นเวลา 30, 45, 60 นาที ให้ผลในการตรวจสอบไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ ระดับพิษงูกะปะที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถมองเห็นจุดสีบนกระดาษและที่จุดของระดับพิษงูกะปะที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นสีจางและที่ระดับพิษงู 1, 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสีและการบ่มกระดาษไนโตรเซลลูโลสในคอนจูเกตเป็นเวลา 15 นาที พบว่า ระดับพิษงูกะปะที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถมองเห็นจุดสีจางและที่ระดับพิษงูกะปะที่ 5, 1, 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี (ดังรูปที่ 3.23) ส่วนการตรวจระดับพิษงูเห่าให้ผลเช่นเดียวกัน (ไม่ได้แสดงรูป) ดังนั้นในการแช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสในแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ - เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกตและในแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกตจะใช้เวลา 30 นาทีในการทดสอบ หากการทดลองใช้เวลาน้อยกว่า 30 นาที ในการทำปฏิกิริยาระหว่างพิษงูกับคอนจูเกต ก็จะให้ผลที่ได้ไม่ดีพอ ปริมาณของคอนจูเกตที่จับกับพิษงูน้อยส่งผลให้จุดสีที่เกิดขึ้นมีสีจาง จากการทดสอบการล้างกระดาษไนโตรเซลลูโลสในขั้นตอนต่าง ๆ ด้วย 0.5 % blotto เป็นเวลา 1, 2, 5 นาที ในการล้างแต่ละครั้งและล้าง 3 ครั้งในแต่ละขั้นตอน พบว่า การล้างกระดาษไนโตรเซลลูโลสเป็นเวลา 1, 2, 5 นาที ให้ผลในการตรวจระดับพิษไม่แตกต่างกัน (ดังรูปที่ 3.24) ทั้งการตรวจระดับพิษของงูกะปะและของงูเห่า ดังนั้น การทดสอบจะทำการล้างกระดาษไนโตรเซลลูโลสในแต่ละครั้งเป็นเวลา 1 นาที และล้าง 3 ครั้งในแต่ละขั้นตอนของการทดสอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.23 ระยะเวลาต่าง ๆ (15, 30, 45, 60 นาที) ในการบ่มกระดาษไนโตรเซลลูโลสในคอนจูเกต เพื่อตรวจพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่างๆ [1=ชุดควบคุม (PBS), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL, 5= 0.2 μg/mL]



รูปที่ 3.24 ระยะเวลาต่าง ๆ (1, 2, 5 นาที) ในการล้างกระดาษไนโตรเซลลูโลสในขั้นตอนต่างๆ ด้วย 0.5% blotto เพื่อตรวจพิษงูกะปะที่ระดับพิษต่างๆ [1=ชุดควบคุม (PBS), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.4 การทดสอบหาสับสเตรตที่เหมาะสม

ในขั้นตอนการบ่มกระดาษไนโตรเซลลูโลสในสารละลายสับสเตรต ได้แก่ สารละลาย OPD (*0*-phenylenediamine dihydrochloride) และ Naphthol (4-chloro-1-Naphthol) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเปรียบเทียบความชัดเจนของสีที่เกิดขึ้น พบว่า จุดสีที่เกิดบนกระดาษจากการบ่มในสารละลาย naphthol เป็นจุดสีม่วง ซึ่งจะเห็นชัดเจนกว่าจุดสีที่เกิดจากการบ่มในสารละลาย OPD ที่ให้จุดเป็นสีส้ม ในการตรวจระดับพิษเดียวกัน (ไม่ได้แสดงรูป) ดังนั้นในการทดสอบจึงใช้ naphthol เป็นสับสเตรต

เมื่อทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของวิธี dot-ELISA แล้ว ดังนั้นจึงสามารถสรุปสภาวะในการทดสอบแต่ละขั้นตอน (รูปที่ 3.25) ในการตรวจหาชนิดของพิษงูกะปะและพิษงูเห่าจะใช้เวลาในแต่ละขั้นตอนรวมถึงการล้างทั้งสิ้นประมาณ 2 ชั่วโมง 45 นาที (จากตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2 ใช้เวลา 2 ชั่วโมง รวมกับการล้างในแต่ละขั้นตอนอีกประมาณ 15 นาที และขั้นตอนหลังจากแช่ใน blotto 5% (ก่อนจะหยดพิษงู) จะนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที หรือปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25-30 นาที)

(1) แกมมาโกลบูลิน (Antibody)

↓ 15 นาที, 37 $^{\circ}$C, ล้าง

(2) Blotto 5% (Blocking)

↓ 30 นาที, 25 $^{\circ}$C, ล้าง

(3) พิษงูหรือตัวอย่าง (Antigen)

↓ 15 นาที, 37 $^{\circ}$C, ล้าง

(4) แกมมาโกลบูลิน-เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต

↓ 30 นาที, 25 $^{\circ}$C, ล้าง

(5) สารละลายสับสเตรต

↓ 30 นาที, 25 $^{\circ}$C, ล้าง

(6) อ่านผลด้วยตาเปล่า

รูปที่ 3.25 ขั้นตอนการตรวจสอบพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของวิธี dot-ELISA ในการตรวจหาชนิดของพิษงูกะปะ

ขั้นตอน	ความเข้มข้น	อุณหภูมิ ($^{\circ}$C)	เวลา (นาที)
1. แกมมาโกลบูลิน	50 μg/ml	37	15
2. blotto	5%	25	30
3. พิษงู	-	37	15
4. คอนจูเกต (0.20 mg/mL)	1 : 4	25	30
5. สับสเตรต (naphthol)		25	30

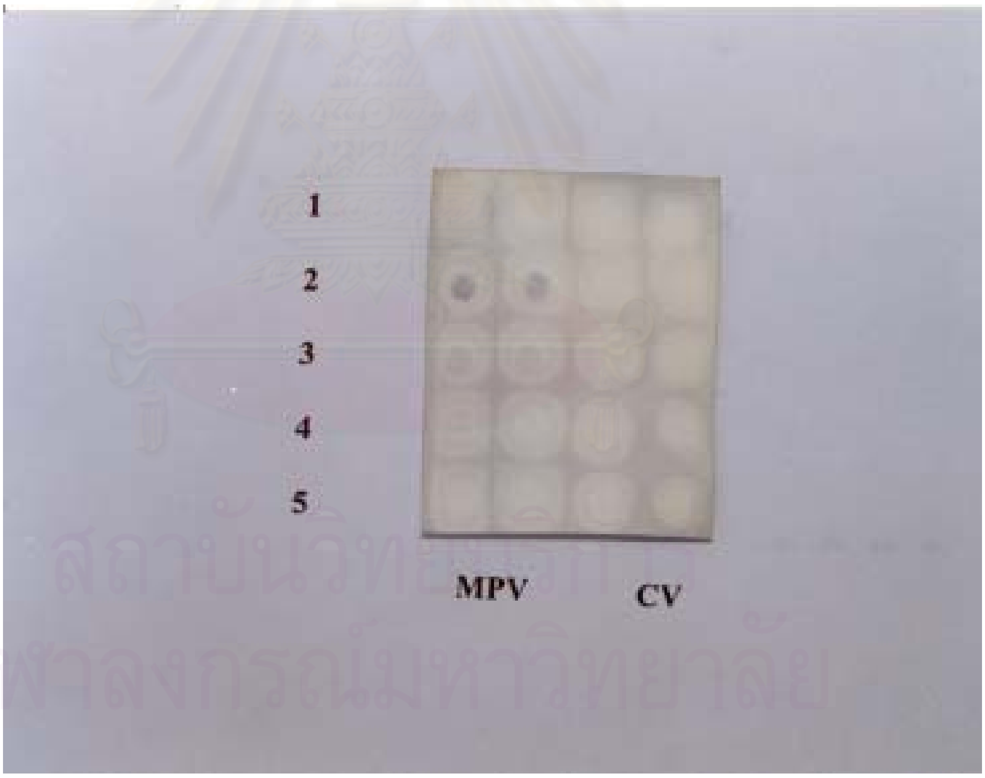
ตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของวิธี dot-ELISA ในการตรวจหาชนิดของพิษงูเห่า

ขั้นตอน	ความเข้มข้น	อุณหภูมิ ($^{\circ}$C)	เวลา (นาที)
1. แกมมาโกลบูลิน	50 μg/ml	37	15
2. blotto	5%	25	30
3. พิษงู	-	37	15
4. คอนจูเกต (0.28 mg/mL)	1 : 4	25	30
5. สับสเตรต (naphthol)		25	30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

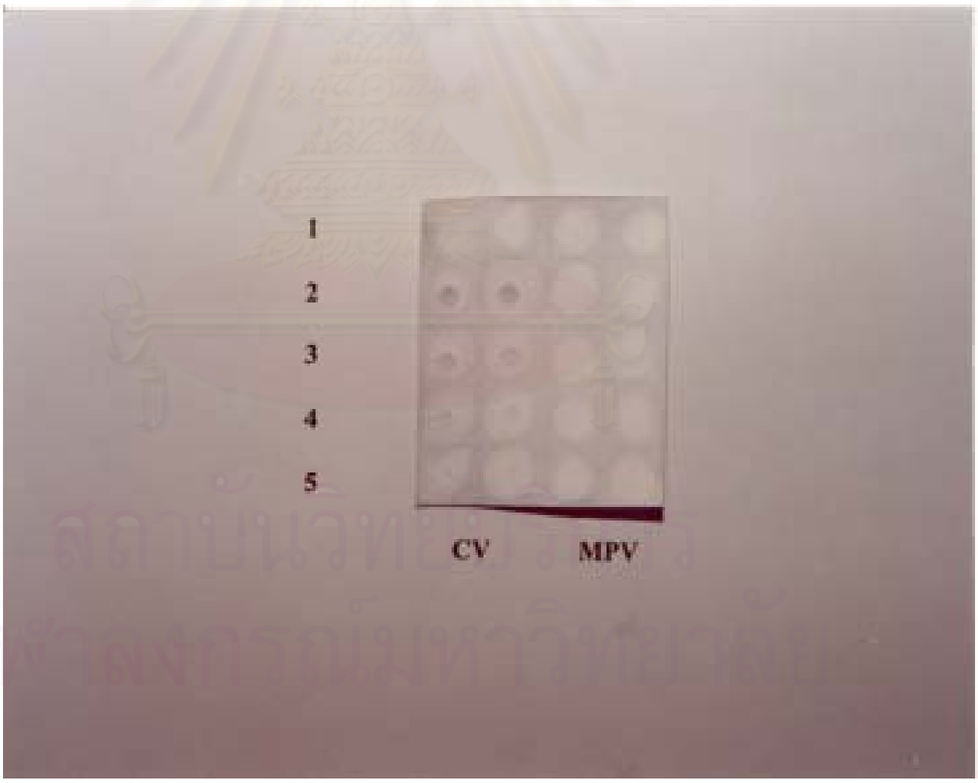
4. การทดสอบดูปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

จากการตรวจสอบพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ละลายในซีรั่มของคนปกติ ในระดับพิษเท่ากับ 25, 5, 1, 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ (ทำ duplicate) เพื่อทดสอบดูปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) พบว่า เห็นจุดสีระดับพิษงูกะปะที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและที่ระดับพิษงูกะปะที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นจุดสีจาง ส่วนที่ระดับพิษงูกะปะที่ 1, 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี สำหรับพิษงูเห่าในระดับพิษที่ 25, 5, 1, 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่หยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส พบว่า ไม่เกิดจุดสีขึ้นและในการทดลองใช้ซีรั่มของคนปกติเป็นชุดควบคุม (control) ก็ไม่เกิดจุดสีเช่นกัน รูปที่ 3.26 แสดงว่า พิษงูเห่าไม่จับกับแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ดังนั้นในการตรวจสอบพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA จึงทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป



รูปที่ 3.26 การตรวจสอบพิษงูกะปะ(MPV) และพิษงูเห่า(CV) ที่ระดับพิษต่างๆ [1=ชุดควบคุม (ซีรั่มคนปกติ), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL, 5= 0.2 μg/mL] บนกระดาษที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะ

การตรวจสอบพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ละลายในซีรั่มของคนปกติในระดับพิษเท่ากับ 25, 5, 1, 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า (ทำ duplicate) เพื่อทดสอบดูปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม(cross-reaction) พบว่า เห็นจุดสีของระดับพิษงูเห่าที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและระดับพิษงูเห่าที่ 5, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นจุดสีจาง ส่วนที่ระดับพิษงูเห่าที่ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสี สำหรับพิษงูกะปะในระดับพิษที่ 25, 5, 1, 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่หยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส พบว่า ไม่เกิดจุดสีขึ้นและในการทดลองใช้ซีรั่มของคนปกติเป็นชุดควบคุม (control) ก็ไม่เกิดจุดสีเช่นกัน ดังรูปที่ 3.27 แสดงว่า พิษงูกะปะไม่จับกับแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าที่เคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันผลการทดลองข้างต้นในการตรวจสอบพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA ซึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม อย่างไรก็ตามนี่เป็นเพียงผลการทดลองเบื้องต้นเท่านั้น ในการนำไปใช้งานจริงต้องศึกษาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของงูที่หลากหลายกว่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งงูในกลุ่มที่พิษออกฤทธิ์คล้ายๆกัน



รูปที่ 3.27 การตรวจสอบพิษงูเห่า(CV) และพิษงูกะปะ(MPV) ที่ระดับพิษต่างๆ [1=ชุดควบคุม (ซีรั่มคนปกติ), 2= 25 μg/mL, 3= 5 μg/mL, 4= 1 μg/mL, 5= 0.2 μg/mL] บนกระดาษที่เคลือบด้วยแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่า

5. เปรียบเทียบการตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี ELISA บนไมโครเพลตและวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

5.1 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต

แกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะที่แยกได้ด้วยวิธี affinity chromatography นำมาเคลือบบนไมโครเพลตและใช้คอนจูเกตที่เตรียมได้มาเจือจางในสารละลาย diluent ตามขั้นตอนของวิธี ELISA เพื่อทดสอบหาปริมาณพิษงูกะปะในระดับพิษต่างๆ พบว่า สามารถทดสอบหาระดับพิษงูกะปะได้ต่ำถึง 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้คอนจูเกตที่อัตราส่วน 1:4 (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 ไตเตอร์ (titer) ที่ตรวจสอบพิษงูกะปะโดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต โดยใช้คอนจูเกตที่อัตราส่วน 1: 4

ความเข้มข้นพิษงูกะปะ (ng/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (492 nm)
400	1.703
200	1.138
100	0.794
50	0.494
25	0.271
1	0.014
negative control	0.006

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าที่แยกได้ด้วยวิธี affinity chromatography มาเคลือบบนไมโครเพลตและใช้คอนจูเกตที่เตรียมได้มาเจือจางในสารละลาย diluent ตามขั้นตอนของวิธี ELISA เพื่อทดสอบหาปริมาณพิษงูเห่าในระดับพิษต่างๆ พบว่า สามารถทดสอบหาระดับพิษงูเห่าได้ต่ำถึง 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้คอนจูเกตที่อัตราส่วน 1: 4 (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่3.4 ไตเตอร์ (titer) ที่ตรวจสอบพิษงูเห่าโดยวิธี ELISA บนไมโครเพลต โดยใช้คอนจูเกตที่อัตราส่วน 1: 4

ความเข้มข้นพิษงูเห่า (ng/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (492 nm)
400	1.371
200	1.190
100	0.935
50	0.755
25	0.446
1	0.026
negative control	0.005

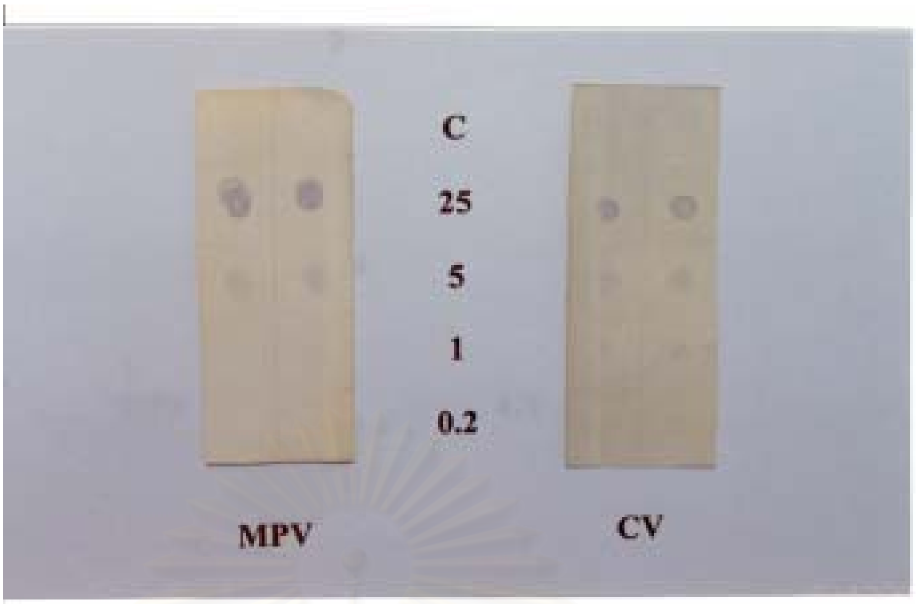
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 การตรวจสอบชนิดของพิษงูโดยวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสและการทดสอบความแม่นยำ

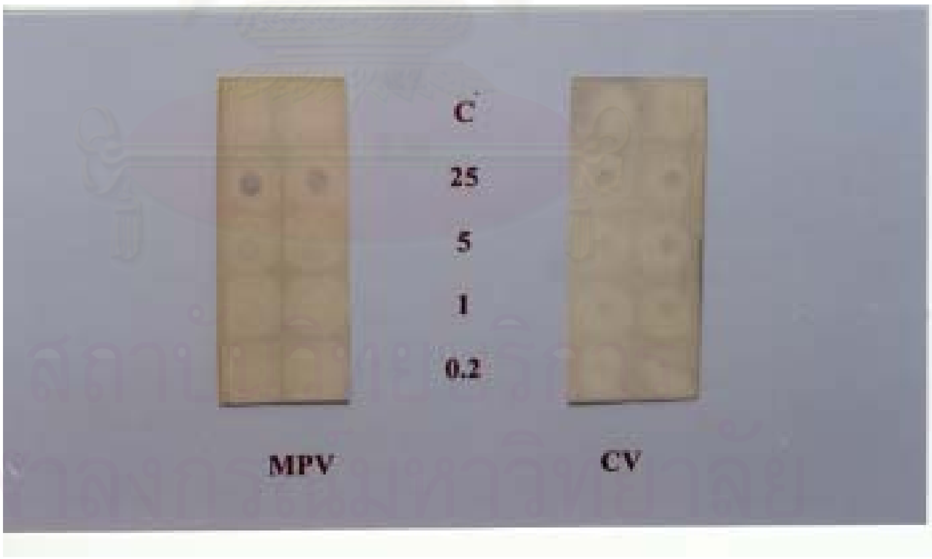
จากการทดสอบใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้โดยวิธี affinity chromatography ในการเคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส และส่วนหนึ่งนำไปคอนจูเกตกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แล้วนำมาใช้ในขั้นตอนของวิธี dot-ELISA เพื่อตรวจสอบพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ละลายใน PBS ที่ระดับพิษต่างๆ โดยทำ duplicate พบว่า ระดับพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเห็นจุดสีได้และระดับพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นจุดสีจางและระดับพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 1, 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสีและใช้ PBS เป็นชุดควบคุม ก็ไม่เกิดจุดสี ส่วนระดับพิษงูเห่าที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเห็นจุดสีได้และระดับพิษงูเห่าที่ความเข้มข้น 5, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นจุดสีจางและระดับพิษงูเห่าที่ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสีและใช้ PBS เป็นชุดควบคุม ดังนั้นเมื่อเทียบกับการตรวจสอบพิษงูที่ใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้โดยวิธี Ion-exchange chromatography จะพบว่าหลังการแช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสในสารละลายสับสเตรต naphthol แล้ว พื้นของกระดาษไนโตรเซลลูโลสจะขาวสะอาดขึ้นทำให้เห็นจุดสีชัดกว่า ดังรูปที่ 3.28

เมื่อทำการตรวจสอบพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่นำมาละลายในซีรั่มของคนปกติแล้วตรวจที่ระดับพิษต่างๆ โดยทำ duplicate พบว่า ระดับพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเห็นจุดสีได้และระดับพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นจุดสีจางเละระดับพิษงูกะปะที่ความเข้มข้น 1, 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสีและใช้ซีรั่มของคนปกติเป็นชุดควบคุม ก็ไม่เกิดจุดสี ส่วนระดับพิษงูเห่าที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเห็นจุดสีได้และระดับพิษงูเห่าที่ความเข้มข้น 5, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นจุดสีจางและระดับพิษงูเห่าที่ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เห็นจุดสีและใช้ซีรั่มของคนปกติเป็นชุดควบคุม ก็ไม่เกิดจุดสีเช่นกัน ดังรูปที่ 3.29 และเมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบระดับพิษที่ละลายใน PBS จะพบว่าสามารถตรวจวัดระดับพิษได้เท่ากับการตรวจระดับพิษที่ละลายในซีรั่มของคนปกติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.28 การตรวจสอบพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ละลายใน PBS โดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี affinity chromatography, MPV = พิษงูกะปะ, CV =พิษงูเห่า ที่ระดับความเข้มข้นของพิษงูต่างๆ [C=ชุดควบคุม (ซีรั่มคนปกติ), ตัวเลขเป็นความเข้มข้นในหน่วย μg/mL]



รูปที่ 3.29 การตรวจสอบพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ละลายในซีรั่มคนปกติ โดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้จากวิธี affinity chromatography, MPV=พิษงูกะปะ, CV=พิษงูเห่า ที่ระดับความเข้มข้นของพิษงูต่างๆ[C=ชุดควบคุม (ซีรั่มคนปกติ, ตัวเลขเป็นความเข้มข้นในหน่วย μg/mL]

การทดสอบความแม่นยำ (precision) ในการตรวจสอบพิษงูที่ระดับพิษต่างๆจะเปรียบเทียบระดับความเข้มของจุดสีต่างๆกับจุดสีมาตรฐาน โดยหยดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ละลายในสารละลาย PBS ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนแถบกระดาษไนโตรเซลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเจือจางแบบ 2-fold serial dilution ในจุดที่ 2-12 ตามลำดับ ปล่อยให้แห้งและล้าง นำไปแช่ใน 5 % blotto แล้วล้าง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายสับสเตรต naphthol ดังรูปที่ 3.30 และให้แต้มความเข้มของจุดสีในระดับต่างๆ ดังนี้ จุดสีที่ 1-7 = 4 แต้ม, จุดสีที่ 8 = 3 แต้ม, จุดสีที่ 9 = 2 แต้ม, จุดสีที่ 10 = 1 แต้มและจุดสีที่ 11 และ12 ไม่มีแต้ม จากการทดสอบ 10 ซ้ำพบว่าการตรวจพิษงูกะปะที่ระดับพิษ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 3.98 ± 0.14, CV = 3.5% และระดับพิษงูกะปะ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ค่าเฉลี่ย 1.92± 0.27, CV = 14% สำหรับการตรวจพิษงูเห่าที่ระดับพิษ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 3.98 ± 0.14, CV = 3.5% ระดับพิษงูเห่าที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 2.84 ± 0.37, CV = 13% และระดับพิษงูเห่าที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 1.18 ± 0.43, CV = 36% จากการตรวจสอบพิษงูทั้งสองชนิดจะพบว่า ในการตรวจระดับพิษงูที่น้อยลงค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนจะเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะการตรวจในระดับพิษที่น้อยจุดสีที่เกิดขึ้นจะเห็นไม่ชัดเจน ทำให้ค่าความแปรปรวนมาก

รูปที่ 3.30 ระดับความเข้มของจุดสีมาตรฐาน จุดสีที่ 1-7 = 4 แต้ม, จุดสีที่ 8 = 3 แต้ม, จุดสีที่ 9 = 2 แต้ม, จุดสีที่ 10 = 1 แต้มและจุดสีที่ 11 และ12 ไม่มีแต้ม

ปริมาณแกมมาโกลบูลินที่ใช้ในการตรวจสอบพิษงูด้วยวิธี ELISA บนไมโครเพลต ใช้ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม หรือ 1 ตัวอย่าง โดยคิดเป็นแกมมาโกลบูลิน 0.2 ไมโครกรัมหรือ 200 นาโนกรัมต่อ 1 หลุม เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแกมมาโกลบูลินที่ใช้ในการตรวจพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ใช้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ต่อ 1 หยด หรือ 1 ตัวอย่าง โดยคิดเป็นแกมมาโกลบูลิน 0.05 ไมโครกรัมหรือ 50 นาโนกรัม ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธี dot-ELISA จะใช้ปริมาณแกมมาโกลบูลินน้อยกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA บนไมโครเพลต ทำให้ไม่ต้องใช้แกมมาโกลบูลินมากลดการสิ้นเปลือง

การตรวจพิษงูกะปะด้วยวิธี ELISA บนไมโครเพลตและด้วยวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสจะใช้คอนจูเกต (0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:4 คิดเป็นความเข้มข้นส่วนคอนจูเกต 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน สำหรับการตรวจพิษงูเห่าด้วยวิธี ELISA บนไมโครเพลต จะใช้คอนจูเกต (0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:4 คิดเป็นความเข้มข้นคอนจูเกต 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี dot-ELISA จะใช้คอนจูเกต (0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:4 คิดเป็นความเข้มข้นคอนจูเกต 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นกัน

เมื่อทำการตรวจสอบพิษงูกะปะด้วยวิธี ELISA บนไมโครเพลตจะใช้ปริมาณพิษในการตรวจสอบ 50 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุมและนำมาทดสอบด้วยคอนจูเกตที่เตรียมได้สามารถตรวจสอบได้ถึงระดับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ซึ่งต้องใช้พิษ 0.05 นาโนกรัม) ส่วนการตรวจพิษงูกะปะด้วยวิธี dot-ELISA จะใช้ปริมาณพิษ 1 ไมโครลิตร และสามารถตรวจวัดได้ถึงระดับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ดังนั้นต้องใช้พิษ 5 นาโนกรัมต่อจุดจึงจะตรวจสอบได้ สำหรับการตรวจสอบพิษงูเห่าด้วยวิธี ELISA จะใช้ปริมาณพิษ 50 ไมโครลิตร และสามารถตรวจได้ถึงระดับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต้องใช้จำนวนพิษ 0.05 นาโนกรัมต่อหลุม ส่วนการตรวจสอบพิษงูเห่าด้วยวิธี dot-ELISAจะใช้ปริมาณพิษ 1 ไมโครลิตร สามารถตรวจได้ถึงระดับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (จำนวนพิษ 1 นาโนกรัมต่อจุด) เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบทั้งสองวิธี (ตารางที่ 3.5 และตารางที่ 3.6) จะพบว่าในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ของพิษงูทั้ง 2 ชนิดจะใช้เนื้อพิษน้อยกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี dot-ELISA และวิธี ELISA สามารถตรวจระดับพิษได้ต่ำถึงระดับนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของพิษงูหรือตัวอย่างที่จะทดสอบวิธี dot-ELISA ไม่จำเป็นต้องใช้ปริมาณตัวอย่างมากใช้ปริมาณเพียง 1 ไมโครลิตร ก็ทำการทดสอบได้

ในการตรวจสอบพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสยังมีข้อจำกัดคือสามารถตรวจระดับพิษงูกะปะได้ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจระดับพิษงูเห่าได้ที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังรูปที่ 3.29) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจวัดระดับพิษงูได้เพียงระดับไมโครกรัมแต่เคยมีรายงานในการตรวจสอบเชื้อโรคด้วยวิธี dot-ELISA นี้สามารถได้ถึงระดับนาโนกรัม (Pappas, Hajkowski and Hochmeyer, 1983 ; Tellez-giron et al., 1987) อาจ

เนื่องจากการแยกคอนจูเกตออกจากแกมมาโกลบูลินอิสระและเอนไซม์อิสระไม่ดี จึงทำให้ความจำเพาะในการตรวจสอบลดลง ผลของการศึกษาครั้งนี้จึงยังไม่ดีเท่าผลงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งได้ศึกษาตรวจหาเชื้อโรค(แอนติเจน) และแอนติบอดี (Silva et al., 1990) ด้วยวิธี dot-ELISA และสามารถวัดระดับแอนติเจนและแอนติบอดีได้ต่ำถึงระดับนาโนกรัม ซึ่งใกล้เคียงกับการตรวจหาพิษงูด้วยวิธี ELISA บนถาดหลุมพลาสติกที่โดยทั่วไปสามารถตรวจวัดได้ถึงระดับนาโนกรัม (Sjostrom et al., 1996 ; Li and Ownby, 1994) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่สามารถวัดระดับพิษงูได้ต่ำถึงระดับพิโคกรัม (Dong et al., 2002)

ตารางที่ 3.5 การเปรียบเทียบการหาชนิดของพิษงูกะปะด้วยวิธี ELISA และ dot – ELISA

	ELISA	dot – ELISA
ปริมาณ IgG (ng) ที่ใช้เคลือบ	200	50
ความเข้มข้นคอนจูเกต (μg/mL) ที่ใช้	50	50
ระดับพิษต่ำสุดที่ตรวจได้	0.05 ng	5 ng

ตารางที่ 3.6 การเปรียบเทียบการหาชนิดของพิษงูเห่าด้วยวิธี ELISA และ dot – ELISA

	ELISA	dot – ELISA
ปริมาณ IgG (ng) ที่ใช้เคลือบ	200	50
ความเข้มข้นคอนจูเกต (μg/mL) ที่ใช้	70	70
ระดับพิษต่ำสุดที่ตรวจได้	0.05 ng	1 ng

อย่างไรก็ตามข้อดีของการตรวจสอบพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA ที่ได้ศึกษาวิจัยนี้คือเป็นวิธีที่ง่ายและไม่ยุ่งยาก สามารถมองผลได้ด้วยตาเปล่า ปริมาณของสารตัวอย่างที่ตรวจสอบใช้น้อย ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องล้างไมโครเพลต, เครื่องอ่านไมโครเพลต (microplate reader) และเครื่องมือราคาแพง เหมือนวิธี ELISA บนไมโครเพลตและยังนำไปใช้ในภาคสนามได้ อีกทั้งสามารถตรวจสอบพิษงูในเวลาเพียง 2 ชั่วโมง (ดังตารางที่ 3.1 และ 3.2) และอาจลดระยะเวลาเหลือเพียง 30 นาที ดังเช่นงานวิจัยของ Vercamen และคณะ ในปี ค.ศ.1998 ที่ใช้วิธี dot-ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leishmania infantum* ในสุนัข สำหรับการทดสอบครั้งนี้สามารถเก็บรักษากระดาษไนโตรเซลลูโลสที่เคลือบแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูไว้แล้ว เพื่อใช้ในการตรวจสอบสามารถเก็บไว้ได้นานอย่างน้อย 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง ในที่ทึบแสงและไม่โดนลม

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส และสามารถวัดระดับพิษงูกะปะได้ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและวัดระดับพิษงูเห่าได้ที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในการทดสอบระหว่างพิษงูกะปะและพิษงูเห่าที่ระดับพิษ 25, 5, 1,0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 3.26 และรูปที่ 3.27 แต่การทดสอบด้วยวิธี dot-ELISA ในงานวิจัยนี้ อาจจะยังไม่สามารถนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้จริง เนื่องจากปริมาณพิษงูในผู้ป่วยที่ถูกงูกัดจะตรวจพบอยู่ในระดับนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นในการศึกษา (Selvanayagam, 1999) ปริมาณพิษงูในอวัยวะของซากศพผู้ที่ถูกงูกัดพบว่าในบริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกงูกัดจะมีระดับพิษสูงสุดและตรวจพบที่ระดับ 1.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนอวัยวะภายในส่วนอื่นเช่น ตับ, สมองและไตจะมีระดับพิษประมาณ 0.5-0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และระดับพิษงูที่ตรวจพบจากตัวอย่างของผู้ป่วยที่ถูกงูกัดโดยวิธี ELISA ซึ่งทางสถานเสาวภาพัฒนาขึ้นสามารถตรวจพิษได้ถึงระดับนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และการศึกษาตรวจเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค Visceral Leishmaniasis (Pappas, Hajkowski and Hockmeyer, 1983) ด้วยวิธี dot-ELISA สามารถตรวจเชื้อได้ต่ำถึงระดับ 1 นาโนกรัม ดังนั้นในการศึกษาตรวจหาชนิดของพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA จึงยังต้องมีการปรับปรุงเทคนิคในบางขั้นตอนหรือปรับปรุงวิธีการต่างๆเช่น การใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) ซึ่งอาจจะทำให้การจับแอนติเจนดีขึ้น (Saengjaruk et al., 2002 ; Sithigorngul, Stretton and Cowden, 1991) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบให้มีความไว (sensitivity) มากขึ้น เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1. การแยกแกมมาโกลบูลินให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วนำมาผ่านคอลัมน์ Ion-exchange chromatography สามารถแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะและแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าได้

2. การแยกแกมมาโกลบูลินให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ affinity chromatography สามารถแยกแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกะปะและแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูเห่าได้

3. แกมมาโกลบูลินที่แยกได้ด้วยวิธี affinity chromatography จะมีแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูมากกว่าแกมมาโกลบูลินที่แยกได้ด้วยวิธี Ion-exchange chromatography

4. ในการเตรียมคอนจูเกตระหว่างแกมมาโกลบูลินที่จำเพาะต่อพิษงูกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่าในทุกกรณีไม่สามารถแยกคอนจูเกตที่ได้จากแกมมาโกลบูลินอิสระและเอนไซม์อิสระออกจากคอนจูเกตโดยใช้เทคนิค gel filtration chromatography ได้

5. การตรวจสอบชนิดของพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้โดยวิธี Ion-exchange chromatography สามารถอ่านผลในการตรวจวัดระดับพิษงูได้ไม่ชัดเจน เนื่องจากพื้นของกระดาษไนโตรเซลลูโลสจะเปื้อนสีไม่สะอาด ทำให้การอ่านผลไม่ชัดเจนและการใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกโดยวิธี affinity chromatography จะให้ผลดีกว่า

6. การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของพิษงูกะปะและพิษงูเห่า ด้วยวิธี dot-ELISA พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มระหว่างพิษงูทั้งสองชนิดนี้

7. การตรวจสอบชนิดของพิษงูด้วยวิธี ELISA บนไมโครเพลต โดยใช้คอนจูเกตที่เตรียมได้ในการตรวจสอบ สามารถวัดระดับพิษงูกะปะได้ที่ระดับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และพิษงูเห่าที่ระดับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

8. การตรวจสอบชนิดของพิษงูด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้แกมมาโกลบูลินที่แยกได้ด้วยวิธี affinity chromatography จะสามารถตรวจสอบพิษงูกะปะได้ที่ระดับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสามารถตรวจสอบพิษงูเห่าได้ที่ระดับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นันทิกา ปานจันทร์. 2541. การสังเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพบูลย์ จินตกุล และ ลาวัณย์ จันทร์โฮม. 2539. งูพิษในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: ประชาชน.

วิโรจน์ นุตพันธ์. 2514. งูพิษในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: มิตรผดุงการพิมพ์.

ภาษาอังกฤษ

Amuy, E., Alape-Giron, A., Lomonte, B., Thelestam, M. and Gutierrez, J.M. 1997. Development of immunoassays for determination of circulating venom antigens during envenomations by coral snakes (*Micrurus* species). Toxicon 35: 1605-1616.

Audebert, F., Grosselet, O., Sabouraud, A. and Bon, C. 1993. Quantitation of venom antigens from European vipers in human serum or urine by ELISA. J. Anal. Toxicol. 17: 236-240.

Barral-Netto, M., Schriefer, A., Vinhas, V. and Almeida, A.R. 1990. Enzyme linked immmunosorbent assay for the detection of *Bothrops jararaca* venom. Toxicon 28: 1053-1061.

Barral-Netto, M. and Sohsten, R.L.V. 1991. Serum kinetics of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice : evidence for a rapid clearance. Toxicon 29: 527-531.

Bhatti, A.R., Wong, J.P., Siddiqui, Y.M. and Siddiqui, S. 1993. A sensitive fluorogenic enzyme linked immunosorbent assay for the detection of *Vipera russelli* venom. Nat. Toxins 1: 277-282.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Boctor, F.N., Stek, M.J., Jr., Peter, J.B. and Kamal, R. 1987. Simplification and standardization of dot-ELISA for human schistosomiasis mansoni. J. Parasitol. 73: 589-592.

Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Oliveira, F., Fransheschi, A.M., Rucavado, A., Giglio, J.R. and Homsi-Brandeburgo, M.I. 2001. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venom by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). Toxicon 39: 1863-1869.

Borkow, G., Gutierrez, J.M. and Ovadia, M. 1997. Inhibition of toxic activities of *Bothrops asper* venom and other crotalid snake venoms by a novel neutralizing mixture. Toxicol. Appl. Pharmacol. 147: 442-447.

Bosompem, K.M., Assoku, R.K.G. and Nantulya, V.M. 1996. Differentiation between culture-derived insect stage of *T. brucei, T.vivax, T. congolense* and *T. simiae* using a monoclonal antibody-based dot ELISA. Parasitology 112: 59-66.

Burdmann, E.A., Woronik, V., Prado, E.B.A., Abdulkader, R.C., Saldanha, L.B., Barreto, O.C.O. and Marcondes, M. 1993. Snakebite induced acute renal failure : an experimental model. Am. J.Trop. Med. Hyg. 48 : 82-88.

Camey, K.U., Velarde, D.T. and Sanchez, E.F. 2002. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. Toxicon 40: 501-509.

Chavez-Olortegui, C., Penaforte, C.L., Silva, R.R., Ferreira, A.P., Rezende, N.A., Amaral, C.F.S. and Diniz, C.R. 1997. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between the venoms of brazilian *Bothrops* species and *Crotalus durissus*. Toxicon 35: 253-260.

Doellgast, G.J., Triscott, M.X., Beard, G.A. and Bottoms, J.D. 1994. Enzyme-linked immunosorbent assay-enzyme-linked coagulation assay for detection of antibodies to

Clostridium botulinum neurotoxins A, B and E and solution-phase complexes. J. Clin. Microbiol. 32: 851-853.

Doellgast, G.J., Triscott, M.X., Beard, G.A., Bottoms, J.D., Cheng. T., Roh, B.H., Roman, M.G., Hall, P.A. and Brown, J.E. 1993. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. J. Clin. Microbiol. 32: 2402-2409.

Dong, L.V., Selvanayagum, Z.E., Gopalakrishnakone, P. and Eng, K.H. 2002. A new avidin-biotin immunoassay for the detection of beta-bungarotoxin and application in diagnosis of experimental snake envenomation. J. Immunol. Methods 260: 125-136.

Draelants, E., Hofkens, E., Harding, E., Brandt, J. and Geerts, S. 1995. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. Research in Veterinary Science 58: 99-100.

Engvall, E. 1980. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. Method Enzymol. 70: 419-439.

Estevao-Costa, M.I.,Martins, M.S., Sanchez, E.F., Diniz, C.R. and Chevez-Olortegui, C. 2000. Neutralization of the hemorrhagic activities of *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms by a monoclonal antibody against mutalysis-II. Toxicon 38: 139-144.

Gutierrez, J.M., Leon, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A., Chaves, F. and Habermehl, G. 1998. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. Toxicon 36: 1529-1538.

Harvey, A.L. 1991. Snake toxins. International encyclopedia of pharmacology and therapeutics, section 34. Pergamon press.

Heneine, L.G.D. and Catty, D. 1993. Species-specific detection of venom antigens from snakes of *Bothrops* and *Lachesis* genera. Toxicon 31: 591-603.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ho, M., Warrell, M.J., Warrell, D.A., Bidwell, D. and Voller, A. 1986. A critical reappraisal of the use of enzyme-linked immunosorbent assays in the study of snake bite. Toxicon 24: 211-221.

Iwanaga, S. and Suzuki, T. 1979. Enzyme in snake venom. In C.Y. Lee (ed), Snake venoms Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 52, 66-158. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

.

Karlsson, E. 1979. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In C.Y. Lee (ed), Snake venoms Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 52, 159-212. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Kawamura, A.Jr. and Aoyama, Y. 1982. Immunofluorescence in medical science. 17-28. Tokyo: University of Tokyo press.

Krifi, M.N., Kharrat, H., Zghal, K., Abdouli, M., Abroug, F., Bouchoucha, S., Dellagi, K. and El-Ayeb, M. 1998. Development of an ELISA for the detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (AAG) and *Buthus occitanus tunetanus* (BOT): correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia. Toxicon 36: 887-900.

Kumar, S., Band, A.H., Samantaray, J.C., Dang, N. and Talwar, G.P. 1985. A dot enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Entamoeba histolytica*. J. Immunol. Methods 83: 125-133.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lalloo, D., Trevett, A., Black, J., Mapao, J., Naraqi, S., Owens, D., Hutton, R., Theakston, R.D.G. and Warrell, D.A. 1994. Neurotoxicity and haemostatic disturbances in patients envenomed by the Papuan black snake (*Pseudechis papuanus*). Toxicon 32: 927-936.

Lee, C.Y. 1979. Snake venoms. Vol. 52. Handbook of Experimental Pharmacology. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Levy, H.B. and Sober, H.A. 1960. A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin. Proc. Soc. Exptl. Bio. Med. 103: 250-252.

Li, Q. and Ownby, C.L. 1994. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for identification of venom from snakes in the *Agkistrodon* genus. Toxicon 32: 1315-1325.

Londner, M.V., Rosen, G., Sintov, A. and Spira, D.T. 1987. The feasibility of a dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* antigens and antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36: 240-245.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Mebs, D. 2000. Notes on the traditional use of plants to treat snake bite in northern Papua New Guinea. Toxicon 38: 299-302.

Nakane, P.K. and Kawaoi, A. 1974. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084-1091.

Ouchterlony, O. and Nilson, L.A. 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In Weir D.M. (ed), Handbook of Experiment Immunology, Oxford: Blackwell Scientific Publication.

Pappas, M.G. 1988. Recent applications of the dot-ELISA in immunoparasitology. Vet. Parasitol. 29: 105-129.

Pappas, M.G., Hajkowski , R. and Hockmeyer, W.T. 1983. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Immunol. Methods 64: 205-214.

Pappas, M.G., Hajkowski , R. and Hockmeyer, W.T. 1984. Standardization of the dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 1105-11.

Pharmacia Fine Chemicals. 1979. Affinity chromatography principles and methods. Sweden: Ljungforetagen AB, Orebro.

Pukrittayakamee, S., Ratcliffe, P.J., McMichael, A.J., Warrell, D.A. and Bunnag, D. 1987. A competitive radioimmunoassay using a monoclonal antibody to detect the factor x activator of Russell's viper venom. Toxicon 25: 721-729.

Rangel-Santos, A.C. and Mota, I. 2000. Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon 38: 1451-1457.

Rawat, S., Laing, G., Smith, D.C., Theakston, D. and Landon, J. 1994. A new antivenom to treat eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) envenoming. Toxicon 32: 185-190.

Requejo, H.I.Z., Guerra, M.L.L.S., Santos, M.D. and Cocozza, A.M. 1997. Immunodiagnoses of community-acquired Pneumonia in childhood. J. Trop. Pediatrics 43: 208-213.

Saengjaruk, P., Chaicumpa, W., Watt, G., Bunyaraksyotin, G., Wuthiekanun, V., Tapchaisri, P., Sittinont, C., Panaphut, T., Tomanakan, K., Sakolvaree, Y., Chongsa-Nguan, M., Mahakunkijcharoen, Y., Kalambaheti, T., Naigowit, P., Wambangco, M.A.L., Kurazono, H. and Hayashi, H. 2002. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. J. Clin. Microbiol. 40: 480-489.

Sanchez, E.E., Garcia, C., Perez, J.C. and De-la-Zerda, S.J. 1998. The detection of hemorrhagic protein in snake venoms using monoclonal antibodies against Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) serum. Toxicon 36: 1451-1459.

Selvanayagam, Z.E., Gnanavendhan, S.G., Ganesh, K.A., Rajagopal, D. and Rao, P.V.S. 1999. ELISA for the detection of venoms from four medically important snakes of India. Toxicon 37: 757-770.

Shemesh, I.Y., Kristal, C., Langerman, L. and Bourvin, A. 1998. Preliminary evaluation of *Vipera palaestinae* snake bite treatment in accordance to the severity of the clinical syndrome. Toxicon 36: 867-873.

Silva, A.M.M.D., Lima, M.R.D.I., Nishikawa, A.K., Brodskyn, C.I., Santos, M.C.D., Furtado, M.F.D., Silva, W.D.D. and Mota, I. 1990. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops.* Toxicon 28: 181-188.

Sithigorngul, P., Stretton, A.O.W. and Cowden, C. 1991. A versatile dot-ELISA method with femtomole sensitivity for detecting small peptides. J. Immunol. Methods 141: 23-32.

Sjostrom, L., Karlson-Stiber, C., Persson, H., Al-Abdulla, I.H. and Smith, D.C. 1996. Development and clinical application of immunoassays for European adder (*Vipera berus berus*) venom and antivenom. Toxicon 34: 91-98.

Tellez-Giron, E., Ramos, M.C., Dufour, L., Alvarez, P. and Montante, M. 1987. Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37: 169-173.

Theakston, R.D.G., Lloyd-Jones, M.J. and Reid, H.A. 1977. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. Lancet ii: 639-641.

Vercammen, F., Berkvens, D., Brandt, J. and Vansteenkiste, W. 1998. A sensitive and specific 30- min dot-ELISA for the detection of anti-leishmania antibodies in the dog. Vet. Parasitol. 79: 221-228.

Vinayak, V.K., Dutt, P. and Puri, M. 1991. An immunoenzymatic dot-ELISA for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool eluates of clinical cases of giardiasis. J. Immunol. Methods 137: 245-251.

Viravan, C., Looareesuwan, S., Kosakarn, W., Wuthiekanun, V., McCarthy, C.J., Stimson, A.F., Bennag, D., Harinasuta, T. and Warrell, D.A. 1992. A national hospital-based survey of snakes responsible for bites in Thailand. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86: 100-106.

Viravan, C., Veeravat, U., Warrell, M.J., Theakston, R.D.G. and Warrell, D.A. 1986. ELISA confirmation of acute and past envenoming by the monocellate Thai cobra (*Naja khouthia*). Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 173-181.

Voet, D. and Voet, J.G. 1995. Biochemistry. 2nd ed. Canada: John Wiley and Sons.

Warrell, D. A. 1993. Venomous bites and stings in the tropical world. Med. J. Aust. 159: 773-779.

Warrell, D.A., Looareesuwan, S., Theakston, R.D.G., Phillips, R.E., Chanthavanich, P., Viravan, C., Supanaranond, W., Karbwang, J., Ho, M., Hutton, R.A. and Vejcho, S. 1986. Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pit viper (Calloselasma rhodostoma) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 1235-1247.

Watt, G. and Theakston, R.D.G. 1985. Seasnake bites in a freshwater lake. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34: 770-773.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีเตรียมสารเคมี

1 mM HCl

HCl	83.6	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

0.1 M $NaHCO_3$, pH 8.3 (coupling buffer)

$NaHCO_3$	8.4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

0.1 M Glycine, pH 8.0

Glycine	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

0.1 M Sodium acetate buffer (CH_3COONa, pH 4.0)

CH_3COONa	8.2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

0.1 M Glycine/HCl, pH 2.5

Glycine	7.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Verosal buffer, pH 8.5

H_3BO_3	9	กรัม
NaOH	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

0.15 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2

NaCl	8.0	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

3.75% และ 8.0% SDS-acrylamide

	ความเข้มข้น 3.75%	ความเข้มข้น 8.0%	
30% acrylamide	0.5	1.85	มิลลิลิตร
3 M Tris-HCl pH 8.8	-	1.75	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.0	-	มิลลิลิตร
1% SDS	0.4	0.7	มิลลิลิตร
2.5% APS	0.2	0.35	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	0.01	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.9	2.35	มิลลิลิตร
รวม	4	7	มิลลิลิตร

30% acrylamide

Acrylamide	30	กรัม
N, N'-methylene bisacrylamide	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

3 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris	36.33	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris	6.055	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1% SDS

Sodium dodecyl sulfate (SDS)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2.5 % ammonium persulfate (APS)

APS	0.025	กรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

0.5 % Bromophenol blue

Bromophenol blue	0.05	กรัม
Tris	10	มิลลิลิตร

Running buffer

Tris	3.03	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
SDS	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Coomassie brilliant blue staining solution

0.2% Coomassie brilliant blue	0.014	กรัม
Acetic acid	7	มิลลิลิตร
Methanol	46.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

Destaining solution

Acetic acid	125	มิลลิลิตร
Methanol	250	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	625	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

0.05 M Sodium carbonate – bicarbonate buffer, pH 9.6 (coating buffer)

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Phosphate buffer saline–Tween (PBST)

Tween 20	0.5	มิลลิลิตร
PBS	1	ลิตร

0.5% BSA ใน PBST (Diluting buffer)

BSA	0.5	กรัม
PBST	100	มิลลิลิตร

Washing buffer

NaCl	9.0	กรัม
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สารละลายสับสเตรต OPD

0-phenylenediamine dihydrochloride	8	มิลลิกรัม
30% H_2O_2	5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	12	มิลลิลิตร

Naphthol (stock)

4-chloro-1-naphthol	30	มิลลิกรัม
Methanol	10	มิลลิลิตร

สารละลายสับสเตรต Naphthol

4-chloro-1-naphthol (stock)	2	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	5	ไมโครลิตร
PBS	10	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

0.3 M Sodium bicarbonate, pH 8.1

$NaHCO_3$	2.52	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

1% Dinitro – fluorobenzene (DNFB)

DNFB	10	ไมโครลิตร
เอธานอล	1,000	ไมโครลิตร

0.06 M Sodium metaperiodate

$NaIO_4$	0.12	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

0.16 M Ethylene glycol

$C_2H_6O_2$	0.993	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

0.01 M Carbonate buffer, pH 9.5

Na_2CO_3	1.06	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

5% Sodium borohydride

$NaBH_4$	50	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

สารละลาย blotto 5%

นมพร่องมันเนย (skim milk)	5	กรัม
Triton X-100	0.1	มิลลิลิตร
สารละลายเมอร์ไธโอเลต 1%	1	มิลลิลิตร
PBS	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายเมอร์ไธโอเลต 1%

$C_9H_9HgNaO_2S$	0.1	กรัม
PBS	10	มิลลิลิตร

การวัด Protien โดยวิธี Lowry

Reagent A

ก. 2% Sodium potassium tartrate 1 มิลลิลิตร

ข. 1% $CuSO_4$ $5H_2O$ 1 มิลลิลิตร

ค. 2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH 98 มิลลิลิตร

Reagent B

2 N – Folin – phenol	25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	75	มิลลิลิตร

2% Sodium potassium tartrate

$NaKC_4H_4O_6.4H_2O$	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

1% $CuSO_4.5H_2O$

$CuSO_4.5H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH

Na_2CO_3	2	กรัม
NaOH	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นายกิตติพันธุ์ รุ่งเรืองสาร เกิดเมื่อวันที่ 9 มกราคม พ.ศ. 2519 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย