๒. วิธีทำการทดลอง

๒.๑ วัสดุและเคมีภัณฑ์

พิษงูแมวเซา เป็นผงสีขาว ได้รับเป็นอภินันทนาการจากกองวิทยาศาสตร์ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย เป็นพิษงูที่เก็บจากงูหลาย ๆ ตัว แล้วแช่แข็งไว้ เมื่อเก็บรวมกันหลายครั้งก็นำมาไลโอฟิไลส์ เมื่อ ๒๕ เมษายน ๒๕๐๘

DEAE - cellulose ของบริษัท Whatman ชนิด DE 11 มี nominal capacity 1 milliequivalent / กรัม

cellulose dialyzer tubing ของบริษัท Arthur H. Thomas Company ความกว้างขณะแบน ๑$\frac{๗}{๘}$ นิ้ว

ทริส (tris), AMP, BAEE, DNA, โซเดียมพาราไนโตรเฟนิลฟอสเฟต ซื้อจาก British Drug Houses (B.D.H.) ประเทศอังกฤษ

โซเดียมคลอไรด์ ของบริษัท E. Merck

คะตะเลส กรดไฮยาลูโรนิก โซเดียม-บิส-พาราไนโตรเฟนิลฟอสเฟต ไลโซเลซิติน ของบริษัท Kock Light ประเทศอังกฤษ

L - phenylalanine ของ Cal biochem

เคมีภัณฑ์ที่ใช้อื่น ๆ เป็น reagent grade ซื้อจากหลายบริษัท

๒.๒ เครื่องมือ

fraction collector ของบริษัท LKB- Radirac ประเทศสวีเดน model 3402 B

pH-stat (titrator 11, titigraph SBR_{2c} และ titration assembly ABU_{1c}) ของบริษัท Radiometer โคเปนเฮเกน

refrigerated centrifuge ของบริษัท International equipment Co. สหรัฐอเมริกา mcdel PR-2

shaking water bath ของบริษัท A. Gallenkamp and Co.Ltd.

ธรอมบ์อิลาสโตกราฟ ของบริษัท Hellige model 2601 D

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ของบริษัท Unicam ประเทศอังกฤษ model SP_{500}

lyophilizer ของบริษัท Quickfit

๒.๓ การแยกพิษงูแมวเซาโดยเซลลูโลสคอลัมน์

การแยกพิษงูทำโดย ion exchange chromatography ตามวิธีของ Williams and Esnouf (1962) และ สัณห์ (๒๕๑๐) ซึ่งแยกพิษงูแมวเซาโดยใช้คอลัมน์ซึ่งอัดด้วย DEAE - cellulose และ elute คอลัมน์ด้วย 0.01 M tris buffer ซึ่งปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริก* ดัดแปลงเฉพาะวิธีเตรียมคอลัมน์บ้างเล็กน้อย

๒.๓.๑ การเตรียมคอลัมน์

ชั่ง DEAE - cellulose ๕ ส่วน ๆ ละ ๕ กรัม แช่แต่ละส่วนใน 2.0 M โซเดียมคลอไรด์ ซึ่งละลายใน 0.01 M ทริส–ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH ๘.๕ เป็นเวลา ๔ ชั่วโมง ล้าง ion exchanger ด้วย 0.01 M ทริส–ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH ๖.๐ ครั้งละ ๕๐ มล. และร่อนอนุภาคเล็ก ๆ ทิ้งไปด้วยเพื่อให้อัตราการไหลสูง เมื่อล้างครบ ๕ ครั้งแล้ว ปริมาตรของ DEAE - cellulose ที่เหลือทั้งหมดจะรวมเป็นประมาณ ๑/๔ ของปริมาตรเริ่มแรก เตรียม slurry โดยเติมบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ล้างลงไปอีกส่วนละ ๕๐ มล. บรรจุคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ ๓๐° ซ.) ใช้คอลัมน์แก้วขนาด ๓ x ๖๐ ซม. โดยอัดแต่ละส่วนภายใต้ความกดดัน

---

* 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1, 3-diol (tris) buffer ซึ่งมีความเข้มข้นของทริสตามที่กำหนดไว้ และปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริคเพื่อความสะดวกต่อไปจะเรียก ทริส บัฟเฟอร์ที่ปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริคว่า ทริส–ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ และถ้าปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก จะเรียกว่า ทริส–คลอไรด์ บัฟเฟอร์.

ของกาซไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ส่วนล่างอัดด้วยความกดดัน ๕๐ ซม. ของปรอทเพิ่มจากความกดดันของบรรยากาศ และส่วนต่อ ๆ ไป เพิ่มความกดดันของอาซไนโตรเจนอีกส่วนละ ๕๐ มม. ของปรอท ตามลำดับ ซึ่งส่วนบนสุดจะใช้ความกดดัน ๒๕๐ ซม.ของปรอทเพิ่มจากความกดดันของบรรยากาศ เมื่อบรรจุคอลัมน์ครบ ๕ ส่วนแล้ว ก็equilibrate คอลัมน์ด้วย ๐.๐๑ M ทริส–ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH ๘.๕ โดยแกรมการอัดคอลัมน์ด้วยกาซไนโตรเจน แสดงไว้ในรูปที่ ๓

๒.๓.๒ การเตรียมพิษงู

ชั่งพิษงูแมวเซา ๒๙๕.๖ มก. ละลายใน ๓๗.๕ มล. ๐.๐๐๑ M ทริส–ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH ๘.๕ ตกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายของพิษงูด้วยแรงเหวี่ยง ๕๐๐ x g* นาน ๘ นาที ทิ้งตะกอนเสีย นำสารละลายที่ได้ไปแยกต่อไป

๒.๓.๓ การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี

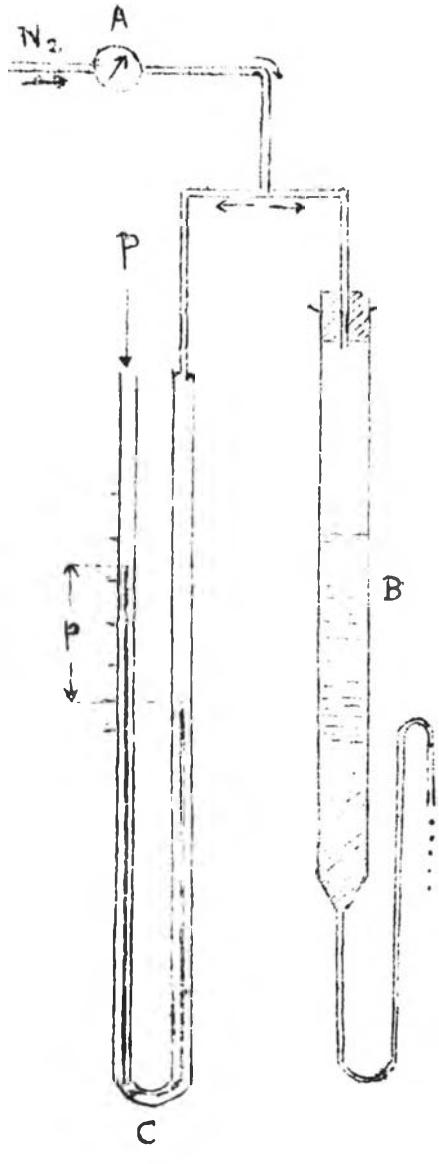
ทำในห้องเย็นอุณหภูมิประมาณ ๘ ° ซ. (๑ ° – ๗ ° ซ.) เทสารละลายพิษงูที่ได้ใน ๒.๓.๒ ลงไปในคอลัมน์ เมื่อสารละลายพิษงูซึมผ่านคอลัมน์ลงไปหมดก็ elute ด้วย ๐.๐๑ M ทริส–ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH ๘.๕ จำนวน ๕๐๐ มล. โดยปรับให้ effluent มีอัตราการไหล ๗๕ มล./ชม. ใช้ fraction collector เก็บ effluent ไว้ในหลอดทดลอง fraction ละ ๑๐ มล. การ elute คอลัมน์หลังจาก ๐.๐๐๑ M ทริส–ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH ๘.๕ ผ่านไปครบ ๕๐๐ มล. แล้วแบ่งออกเป็น ๒ ขั้น ขั้นแรกค่อย ๆ ลด pH ของบัฟเฟอร์ และขั้นสุดท้ายให้ pH ของบัฟเฟอร์คงที่ แต่ค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ดังนี้

(ก) เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ elute คอลัมน์เป็น ๐.๐๑ M ทริส–ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH ๗.๐ และผ่านสารละลายนี้เรื่อย ๆ จนคอลัมน์ equilibrated ที่ pH ๗.๐ ก็เปลี่ยนไปใช้สารละลายที่ elute คอลัมน์เป็น ๐.๐๑ M ทริส–ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH ๖.๐ จนคอลัมน์ equilibrated ที่ pH ๖.๐

---

* g = gravitational force

รูปที่ ๓ แผนภาพการบรรจุคอลัมน์ภายใต้ความกดดันต่าง ๆ กันของก๊าซไนโตรเจนเพิ่มจากความกดดันของบรรยากาศ



A = ปุ่มปรับความดันของก๊าซไนโตรเจนที่ใช้อัด

B = คอลัมน์

C = แมโนมิเตอร์ปรอท

P = ความกดดันของบรรยากาศ

p = ความแตกต่างของระดับปรอทในขาทั้งสองข้างของแมโนมิเตอร์ คือ ความกดดันของไนโตรเจนในคอลัมน์ที่เพิ่มจากความกดดันของบรรยากาศ

(ข) เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ elute คอลัมน์เป็น ๐.๑๕ M - ๐.๑๐ M - และ ๐.๐๐ M ไซเดียมคลอไรด์ใน ๐.๐๑ M ทริส-ฮัดเดท บัฟเฟอร์ pH ๖.๐ ด้วยปริมาณ ๕๐๐, ๑๐๐๐ และ ๑๐๐๐๐ มล.ตามลำดับ

ได้ติดตามเก็บ effluent รวมทั้งสิ้น ๖๐๐ fractions เป็นเวลาในการทำโครมาโตกราฟีทั้งสิ้นประมาณ ๘๐ ชม. ดังกล่าวมา

๒.๓.๔ การวัด optical density

นำ effluent แต่ละหลอดที่เก็บได้จาก ๒.๓.๓ ไปวัดปริมาณโปรตีน โดยวัด optical density[๑] ที่ความยาวคลื่น ๒๘๐ nanometer[๒] ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เทียบกับ buffer blank และรวมสารละลายของเชื้อในหลอดต่าง ๆ ที่มีค่า OD_{280} สูงใกล้เคียงกัน (ปริมาณโปรตีนอยู่ใน peak เดียวกัน) เป็นสารเดียวกัน สารละลายโปรตีนที่รวมได้ในขั้นตอนนี้ นำไปไดอะไลส์กับน้ำ[๓] ที่อุณหภูมิ ๔ องศาซ. เป็นเวลา ๑๔ ชม. โดยเปลี่ยนน้ำ ๖ ครั้ง เก็บเชื้อแต่ละส่วนหลังจากไดอะไลส์แล้วไปทำให้แห้ง และแช่เย็น (ไลโอฟิไลส์) โดยใช้เครื่องมือ freeze dryer

๒.๓.๕ การหาปริมาณโปรตีน

ละลายเชื้อจุลินทรีย์ส่วนที่ได้จากการไลโอฟิไลส์ด้วย ๐.๑๕ M โซเดียมคลอไรด์ประมาณ ๒๕–๔๐ มล. นำสารละลายเชื้อใน ๐.๑๕ M โซเดียมคลอไรด์นี้ไปหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยวัด OD_{280} เทียบกับสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวที่เจือจางใน ๐.๑๕ M โซเดียมคลอไรด์ช่วง ๐ มก./มล. และนำไป

---

๑ เพื่อความสะดวกต่อไปจะใช้วลีย่อ OD แทนคำว่า optical density และยกความยาวคลื่นที่ใช้วัดไว้ข้างท้าย เช่น OD_{280} หมายถึง optical density ที่ความยาวคลื่น ๒๘๐ nm

๒ 1 nanometer (nm) = 10^{-9} meter

๓ น้ำที่ใช้สำหรับทุกการทดลอง เป็นน้ำที่ถูกดีไอออนไนซ์แล้ว (deionized water)

ตกตะกอนเอาสารที่ไม่ละลายของพิษงูออกแล้ว (เตรียมได้จากการนำสารละลายพิษงู ใน 0.15 M โซเดียมคลอไรด์ไปตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง ๕๐๐ x g เป็นเวลา ๘ นาที แล้วทิ้งตะกอน) แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนของพิษงูแต่ละส่วนจากค่าบริมาตรและความเข้มข้นที่วัดได้

๒.๓.๖ การเก็บพิษงู

นำสารละลายพิษงูแต่ละส่วนซึ่งละลายใน 0.15 M โซเดียม-คลอไรด์ รวมทั้งสารละลายพิษงูเดิมซึ่งยังไม่แยกใน 0.15 M โซเดียมคลอไรด์ ซึ่งเตรียมได้ (หัวข้อ ๒.๓.๔.) ไปเก็บในหลอดทดลองขนาด ๘ มล. โดยแบ่งเก็บหลอดประมาณ ๒–๓ มล. ปิดด้วย parafilm แล้วแช่แข็ง (ประมาณ – ๒๐ องศาซี.) ซึ่งจะแบ่งมาละลายครั้งละหลอด เฉพาะก่อนจะวัด activity ต่าง ๆ เท่านั้น

๒.๔ การวัดความเป็นพิษของพิษงู

ความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาเดิมซึ่งยังไม่แยก และพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ วัดจากค่ามีเดียนลีธัลโดส (median lethal dose)[๒] เมื่อนำพิษงูไปฉีดในหนู (mice) และความเป็นพิษทั้งหมดของพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ วัดจากค่าความเป็นพิษรวม (total toxicity) ซึ่งคำนวณจากจำนวน LD_{50} ของพิษงูแต่ละส่วน

๒.๔.๑ การวัดมีเดียนลีธัลโดส

ใช้วิธี bioassay คำนวณค่า LD_{50} จากอัตราส่วนของหนูที่ตายหลังจากฉีดพิษงูเข้าเส้นเลือด แล้วแปลงอัตราส่วนของหนูที่ตายเป็นโปรบิต

---

๒ median lethal dose (LD_{50}) คือ โดสหรือปริมาณของสารซึ่งฆ่าสัตว์ทดลองจำนวนหนึ่งตาย ๕๐%

(probit)[๑] คำนวณค่า LD_{50} โดยวิธีเขียนกราฟ (Weiss, 1948) ทำดังนี้

ฉีดสารละลายพิษงูความเข้มข้นต่าง ๆ กันใน 0.15 M โซเดียมคลอไรด์ จำนวน ๐.๕ มล. เข้าเส้นเลือดที่หางหนู โดยใช้หลอดฉีดขนาด ๑ มล. ใช้หนูกลุ่มละ ๕ ตัว น้ำหนักใกล้เคียงกัน หนักประมาณตัวละ ๑๔–๑๕ กรัม จากจำนวนหนูที่ตายภายหลังฉีดพิษงู ๒๔ ชม. แปลงเป็นค่าโปรบิตโดยใช้ตารางสำเร็จ (Weiss, 1948) เขียนกราฟระหว่างค่าโปรบิตกับปริมาณพิษงูที่ฉีด โดยให้ค่าโปรบิตอยู่บนแกนตั้ง และปริมาณพิษงูที่ฉีด (logarithmic scale) อยู่บนแกนราบ จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง จากกราฟที่ได้อ่านค่าปริมาณพิษงูที่ค่าโปรบิต ๕ จะตรงกับค่า LD_{50} ของพิษงูตัวอย่าง วิธีวัดค่า LD_{50} ปรากฏอยู่ในผนวก ข. และตารางสำรวจซึ่งแปลงอัตราส่วนที่ตายเป็นค่าโปรบิต ปรากฏอยู่ในผนวก ก.

๒.๔.๒ การหาความเป็นพิษรวม

ความเป็นพิษรวมของพิษงูแต่ละส่วน วัดจากจำนวน LD_{50} ของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ โดยเทียบกับจำนวน LD_{50} ของพิษงูแมวเซาเดิมที่ยังไม่แยก

---

[๑] การหาค่า LD_{50} จากปริมาณสารที่ใช้ (dose) และอัตราส่วนของสัตว์ทดลองที่ตาย (response ratio) อาจทำได้ โดยเขียนกราฟระหว่างโดสและอัตราส่วนที่ตาย ซึ่งจะได้ความสัมพันธ์เป็น sigmoid curve มีหลายวิธีที่จะเปลี่ยนให้ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งทั้งสองข้างต้นให้เป็นเส้นตรงเพื่อสะดวกในการวัด วิธีหนึ่งคือการแปลงอัตราส่วนที่ตาย เป็นค่าความบายเบนมาตรฐาน (standard deviation) หรือโปรบิต

กำหนดให้ โปรบิต = ความบายเบนมาตรฐาน + ๕

รายละเอียดอ่านได้จาก Wolf (1968)

(Kochwa, 1960) โดยคำนวณหาจำนวน LD_{50} ทั้งหมดของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้จากกำ LD_{50} และน้ำหนักของพิษงูในแต่ละส่วนนั้น ๆ แล้วคำนวณหาความเป็นพิษรวมของพิษงูที่แยกได้แต่ละส่วน กำหนดให้ความเป็นพิษรวมของพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ก็คือ เปอร์เซนต์ของจำนวน LD_{50} ของพิษงูในส่วนนั้น ๆ เมื่อเทียบให้จำนวน LD_{50} ของพิษงูแมวเซาที่ใช้แยกทั้งหมดเป็น ๑๐๐ %

๒.๕ การวัด activity ของเอนไซม์

วัด activity ของเอนไซม์ต่าง ๆ ของพิษงูที่แยกได้และจากพิษงูเดิมที่ยังไม่แยก ซึ่งละลายอยู่ใน ๐.๑๕ M โซเดียมคลอไรด์ โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ซึ่งใช้ ๐.๑๕ M โซเดียมคลอไรด์ แทนสารละลายพิษงู

๒.๕.๑ การวัด activity ของนอนสเปซิฟิก อัลคาไลน์ ไมโนฟอสฟาเทส

โดยวัดวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก (Sulkowski, Bjork and Laskowski, 1963) ใช้ p-nitrophenylphosphate ซึ่งไม่ถูกไฮโดรไอส์ด้วย 5' – นิวคลีโอไทเดส เป็น substrate หลังจากอุ่นชั่วระยะเวลาหนึ่ง ก็หยุดปฏิกริยาโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ p-nitrophenol ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะอยู่ในสภาพเป็น anion สีเหลือง วิธีวัดทำดังนี้

ผสม ๑.๒ มล. substrate solution (ประกอบด้วย ๑ mM โซเดียมพาราไนโตรเฟนิลฟอสเฟต และ ๐.๐๒๕ M มักนีเซียมคลอไรด์ ละลายใน ๐.๑๒ M ทริส–คลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH ๗.๔) กับ ๐.๓ มล. สารละลายพิษงูใส่ใน centrifuge tube ขนาด ๑๐ มล. อุณหภูมิ ๓๐ องศาC. ๑ ชม. หยุดปฏิกริยาโดยเติม ๑.๕ มล. สารละลาย ๐.๑ M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง ๑๕๐๐ x g ๑๐ นาที แล้วนำน้ำใสไปวัด OD_{400} ตามผลการทดลองที่มีผู้ทำไว้ เมื่อใช้ความเข้มข้นและปริมาตรของสารต่าง ๆ เท่าการทดลองนี้ (Laskowski, 1966) OD_{400} ที่เพิ่มขึ้น ๐.๔๐๐ จะเท่ากับ พาราไนโตรฟีนอลที่ถูกปล่อยออกมา ๐.๑ μmol

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย (U) คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ปลดปล่อย พาราไนโตรฟีนอล ออกมาในอัตรา ๑ μmol ต่อนาที ที่ ๓๐ องศาC.

specific activity คือ U /มก.

๒.๕.๒ การวัด activity ของ 5' – นิวคลีโอไทเดส

วัดโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตริก (Sinsheimer and Koerner, 1952) ซึ่งใช้ AMP เป็น substrate วัดฟอสเฟตที่ถูกปลดปล่อยออกมาโดยเปลี่ยนเป็นฟอสโฟโมลิบเดต แล้วรีดิวส์ฟอสโฟโมลิบเดต ที่เกิดขึ้นให้เปลี่ยนเป็นสารสีน้ำเงิน (Fiske and Subbarow, 1925) ทำดังนี้

ผสม ๐.๓ มล.0.01M AMP (ละลายใน ๐.๒ M ทริส–มาเลเอต บัฟเฟอร์ pH ๗.๕ และมี ๐.๒๔ M แมกนีเซียมคลอไรด์ละลายอยู่) กับสารละลายของพืชผู ๐.๑ มล. เติมน้ำจนมีปริมาตร รวม ๑ มล. อุ่นที่ ๓๐ องศาC. ๑๕ นาที แล้วหยุดปฏิกริยาด้วย ๔ มล.๑๐ % กรดไตรคลอโรแอซีติก หลังจากตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง ๓,๐๐๐x g ๒๐ นาที แล้ว นำน้ำไปหาปริมาณฟอสเฟตตามวิธีของ Fiske และ Subbarow ดังนี้

ดูดน้ำใส ๑ มล. ใส่ test tube เติมน้ำเป็น ๕ มล. เติม ๐.๔ มล. สารละลายอัมโมเนียม โมลิบเดต ใน ๑.๕ M กรดซัลฟูริก เขย่า แล้วเติม ๐.๔ มล. reducing solution (๑, ๒, ๔ –aminonaphthosulphonic acid ละลายใน ๑๕% โซเดียมไบซัลไฟต์ และมีโซเดียมซัลไฟต์เป็นตัวช่วยการละลายอยู่เล็กน้อย) เขย่า เติมน้ำจนมีปริมาตร ๑๐ มล. นำไปวัด OD_{660} เปลี่ยนค่า OD_{660} เป็นค่า μmol ฟอสเฟต โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่ง plot ระหว่าง μmol ฟอสเฟต กับ OD_{660}

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย (U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยฟอสเฟตออกมา ในอัตรา ๑ μmol ต่อนาที ที่ ๓๐ องศาC.

specific activity คือ U /มก.

๒.๕.๓ การวัด activity ของเอกโซนิวคลีเอส

วัดโดยวิธีสเปคโตรโฟโตรเมตริก (Sulkowski et al, 1963) โดยใช้ bis-p-nitrophenyl phosphate เป็น substrate หลังจากอุ่นชั่วระยะเวลาหนึ่ง แล้วหยุดปฏิกริยาโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พาราไนโตรฟีนอลที่ถูกปล่อยออกมาจะอยู่ในสภาพ anion สีเหลือง ปฏิกริยานี้ไม่ต้องการมักนีเซียมอิออน วิธีวัดทำดังนี้

ผสม ๑.๒ มล. สารละลาย ๑ mM โซเดียม-บิส-พาราไนโตรเฟนิล-ฟอสเฟต ใน ๐.๑๒ M ทริส-กลอไรด์บัฟเฟอร์ pH ๘.๒ กับ ๐.๑ มล. สารละลายพิษงู เติมน้ำจนมีปริมาตร ๑.๕ มล. อุ่นที่ ๓๐ องศาC. ๑๕ นาที หยุดปฏิกริยาโดยเติม ๑.๕ มล. ๐.๑ M โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำไปวัด OD_{400} ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งตามสภาพที่กล่าวนี้ OD_{400} ที่เพิ่มขึ้น ๐.๔๐๐ จะตรงกับปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ถูกปล่อยออกมา ๐.๑ μmol (Laskowski, 1966)

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย (U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปล่อยพาราไนโตรฟีนอลออกมาในอัตรา ๑ μmol ต่อนาที ที่ ๓๐ องศาC.

specific activity คือ U /มก.

๒.๕.๔ การวัด activity ของ ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส

ใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก (Richard, Vair and Laskowski, 1965) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีเดิม (Kunitz, 1950) ซึ่งมี DNA เป็น substrate แต่ทำที่ pH ๕.๐ และใช้สารละลายของพิษงูที่เจือจางมาก ๆ จนสารที่ทำปฏิกริยาไม่ขุ่น สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของ OD ได้ วิธีวัดทำดังนี้

ผสม ๓ มล. DNA substrate solution (ขน ๐.๐๑ มก./มล. ละลายใน ๐.๒ M โซเดียมแอซีเตต บัฟเฟอร์ pH ๕.๐) กับ ๑ มล. สารละลายพิษงู ในหลอดทดลองซึ่งปิดด้วย parafilm ผสมโดยการหกกลับ ถ่ายไป silica cuvette บันทึกการเปลี่ยนแปลงของ OD_{260} ถ้าจุดต่าง ๆ

ที่บันทึกได้ไม่เพียงพอที่จะเขียนเส้นตรง เมื่อเขียนกราฟระหว่าง OD_{260} ที่เวลาต่างๆ ก็ทำใหม่โดยใช้สารละลายพิษงูที่ทำให้เจือจางลงอีก

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ OD_{260} เพิ่มขึ้นในอัตรา ๑.๐๐๐ ต่อนาที ที่ ๓๐ องศาC.

specific activity คือ หน่วย/มก.

๒.๕.๔ การวัด activity ของฟอสโฟไลเปส เอ

ใช้วิธี titrimetric method (Schnatz, 1964) วัดปริมาณโปรตอนที่ถูกปล่อยออกมาจากเลซิธิน โดยใช้ Radiometer ตั้ง titrator ที่ pH ๗.๕ มีแคลเซียมอิออน และอีเธอร์ เป็น activator (Mohammed-Kamel and Ayobe, 1969) วิธีวัดทำดังนี้

substrate ประกอบด้วย ๑๔ มล. สารละลายเลซิธิน (ข้น ๗ มก./มล. ละลายใน ๐.๑๒๕ M แคลเซียมคลอไรด์ และมีอีเธอร์ละลายอยู่ ๑๐%) บันทึกปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้สำหรับ nonenzymic hydrolysis ที่ ๓๐ องศาC. ๓ นาที แล้วเติมสารละลายพิษงู ๐.๒ มล.ลงไป ปรับ pH ของสารให้เป็นกลางเป็น ๗.๕ บันทึกปริมาณด่างที่ใช้เป็นเวลา ๓ นาที ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้หลังจากหักด่าที่ได้จาก nonenzymic hydrolysis คือ ปริมาณที่ใช้ในการสะเทินไฮโดรเจนอิออนของกรดไขมันอิสระที่ถูกปล่อยออกมาจากเลซิธิน ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทดลองชุดหนึ่ง ๆ หาโดยการติเตรตกับสารละลาย potassium hydrogen phthalate ที่ทราบความเข้มข้น การทดลองทั้งหมดทำไว้โดยอัตโนมัติโดยใช้เครื่องมือ Radiometer (titrator II พ่วงกับ titigraph SBR 2_c และ titration assembly ABU 1_c)

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย (U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปล่อยไฮโดรเจนอิออน ออกมาจากเลซิธิน ในอัตรา ๑ μmol ต่อ นาที ที่ ๓๐ องศาC.

specific activity คือ U /มก.

๒.๕.๖ การวัด activity ของฟอสโฟไลเปส บี

ใช้วิธี titrimetric method (Schnatz 1964) วัดปริมาณไฮโดรเจนไอออนที่ถูกปล่อยออกมาจากไลโซเลซิธิน ด้วย titrator ที่ pH ๘.๒ และใช้ แคลเซียมไอออนเป็น activator อย่างเดียว (Mohammed, Kamel and Ayobe,1969) เนื่องจาก อีเธอร์เป็น inhibitor ของเอนไซม์นี้ ทำดังนี้

Substrate ประกอบด้วย ๑๔ มล. สารละลายไลโซเลซิธิน (ซึ่ง ๑.๕ มก./มล. ละลายใน ๐.๐๗๒ M แคลเซียมคลอไรด์) บันทึกค่า nonenzymic hydrolysis ที่ ๓๐ องศาC. ๓ นาที และบันทึก total hydrolysis หลังจากเติมสารละลายพิษงู ๑ มล. และปรับ pH ของสารทำปฏิกิริยาเป็น ๘.๒ แล้ว อีก ๓ นาที ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ต้องใช้เพิ่มขึ้น คือ ปริมาณที่นำไปใช้ในการละเทินไฮโดรเจนไอออนที่ถูกปล่อยออกมาจากไลโซเลซิธิน

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถปล่อยไฮโดรเจนไอออน จากไลโซเลซิธิน ในอัตรา ๑ μmol ต่อนาที ที่ ๓๖ องศาC.

specific activity คือ U /มก.

๒.๕.๗ การวัด activity ของ อะมีโนแอซิล เอสเทอเรส

ใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก (Schwert and Takenaka, 1955) โดยใช้ α -benzoyl -L-arginine ethyl ester (BAEE) เป็น substrate มีแคลเซียมไอออนเป็น activator และปริมาณ benzoyl arginine ที่ถูกปล่อยออกมา วัดจากการเพิ่มของ OD_{254} วิธีวัดทำดังนี้

ผสม ๓ มล. ๐.๒๐๓ mM BAEE ไฮโดรคลอไรด์ (ซึ่งละลายใน ๐.๐๑ M ทริส–คลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH ๗.๐ และมีแคลเซียมคลอไรด์ละลายอยู่ ๐.๐๐๓ M) กับ ๐.๐๕ มล. สารละลายพิษงูในหลอดทดลองซึ่งปิดด้วย parafilm และถ่ายไป silica cuvette วัด OD_{254} ทุกระยะเวลาหนึ่ง จนได้ค่า

OD_{254} มากพอที่จะเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{254} และเวลา ถ้า OD_{254} เพิ่มขึ้น ในอัตรามากกว่า ๐.๒๐๐/นาที ควรลดความเข้มข้นของสารละลายพิษงูลงอีก ตามผลการทดลองที่มีผู้ทำไว้ (Rick, 1965) ค่า OD_{254} ของ benzcyl-L-arginine และ BAEE ซึ่งมี ๑ mM จะต่างกัน ๑.๑๕ หรือสำหรับการทดลองนี้ ไฮโดรไลซิส ของ BAEE ๑ μ mol จะทำให้ OD_{254} เพิ่มขึ้น ๐.๐๐๑๑๕

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย (U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย benzoyl-L-arginine ออกมาในอัตรา ๑ μmol ต่อนาที ที่ ๓๐ องศาC.

specific activity คือ U /มก.

๒ ๕.๔ การวัด activity ของ เปปไทเดส

ใช้วิธีคัปเปลโครไฟโตเมตริก (Goldbarg and Rutenberg, 1958) เปลี่ยน β -naphthylamine ซึ่งถูกปลดปล่อยออกมาจาก L-leucyl-β-naphthylamide ให้สารประกอบที่มีสี โดยนำไป diazotize แล้ว couple กับ naphthylenediamine จะได้ azo dye สีน้ำเงิน ซึ่งสารนี้ดูดแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น ๕๗๘ นม. วิธีวัดทำดังนี้

ผสม ๑ มล. สารละลาย ๑.๓๗ mM L-lencyl -β -naphthylamide (ละลายใน ๐.๑๒ M ทริส-คลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH ๗.๑) กับ ๑ มล. สารละลายพิษงูที่ ๓๐ องศาC. ๑ ชม. แล้วหยุดปฏิกริยาโดยเติม ๑ มล. ๒๕% กรดไตรคลอโรแอซิติก นำไปตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง ๗๐๐๐ x g ๒๐ นาที แล้วนำน้ำใส ๑ มล. ไปผสมกับ ๑ มล. ๒% โซเดียมไนไตรต์ ตั้งทิ้งไว้ ๑๐ นาที ทำลายไนไตรต์ที่เหลือโดยเติม ๑ มล. สารละลาย ๕% N- (1-napthyl) - ethylenediamine ใน methanol เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ ๑๐ นาที นำสารละลายนี้ไปวัด OD_{578} จากค่า OD_{578} ที่เพิ่มขึ้น เปลี่ยน μmol ของ β-naphthylamine โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ซึ่ง plot ระหว่าง OD_{578} และ μmol ของ

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย (U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย β-naphthylamine ออกมาในอัตรา ๑ μmol ต่อนาที ที่ ๓๐ องศาC.

specific activity คือ U /มก.

๒.๕.๙ การวัด activity ของโปรตีเนส

ใช้วิธีสเปกโตรเฟโตเมตริก (Kunitz, 1947) โดยใช้ casein เป็น substrate จะได้สารเกิดจากปฏิกริยาซึ่งละลายในกรดไตร-คลอโรแอซีติค ซึ่งวัดปริมาณ tyrosine และ tryptophan ของสารเหล่านี้จากค่า OD_{280} ที่เพิ่มขึ้น วิธีวัดทำดังนี้

ผสม ๑ มล. ๐.๒๕ % heat denatured casein (เตรียมจากละลาย casein ใน ๐.๑ M ทริส-คลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH ๗.๐ ที่ ๑๐๐ องศาC. ๑๕ นาที หรือนานจน casein ละลายหมด ทิ้งให้เย็น ปรับให้มี pH ๗.๐ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมน้ำให้มีความเข้มข้นเท่าก่อนต้ม) กับสารละลายเอนซูน ๑ มล. อุ่นที่ ๓๐ องศาC. ๑ ชม. หยุดปฏิกริยาโดยเติม ๑.๕ มล. ๑๐% กรดไตรคลอโรแอซีติก ตั้งทิ้งไว้ ๓๐ นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง ๓๐๐๐ x g ๒๐ นาที แล้วนำน้ำใสไปวัด

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย คือ ปริมาณเอนไซม์ซึ่งไฮโดร-ไลส์ casein แล้วได้ product ซึ่งละลายในกรดไตรคลอโรแอซีติค ซึ่งทำให้ OD_{280} เพิ่มขึ้น ๑.๐๐๐ ต่อนาที ที่ ๓๐ องศาC.

specific activity คือ หน่วย/มก.

๒.๕.๑๐ การวัด activity ของ อะมิโนแอซิด ออกซิเดส

ใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก (Wellner, 1966) โดยใช้ L-phenylalanine เป็น substrate และเปลี่ยน phenylpyruvate

ที่เกิดจากปฏิกริยาของเอนไซม์นี้ ให้เป็น borate enolpyrovate complex ซึ่งมีค่า OD_{360} สูง (Knox and Pitt, 1957) สารละลายพืชผู้ที่ใช้นำมา reactivate ก่อน โดยอุ่นกับ ๐.๑ M แอซิเตต บัฟเฟอร์ pH ๕.๐ ที่ ๓๐ องศาC. ๑ ชม. (Curti, Massey and Smudka, 1968) วิธีวัดทำดังนี้

อุ่น ๐.๕ มล. สารละลายพืชผู้ กับ ๐.๕ มล. ๐.๒ M แอซิเตต บัฟเฟอร์ pH ๕.๐ ในหลอดทดลองปากกว้าง (๑๘ x ๑๕๐ มม.) ที่ ๓๐ องศาC. ๑ ชม. เติม ๐.๒ มล. สารละลาย catalase (๖๐ unit /มล.) เขย่า แล้วเติม ๐.๕ มล. substrate solution (๐.๐๑ M L-phenylalanine ละลายใน ๐.๒ M ทริส–เลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH ๗.๕) อุ่นที่ ๓๐ องศาC. ๑ ชม. เขย่าอย่างแรงตลอดเวลา (๒๐๐ ครั้ง/นาที) หยุดปฏิกริยาโดยเติม ๐.๒๕ มล. ๒๕% กรดไตรคลอโรแอซิติค หลังจากตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง ๓๐๐๐ x g ๒๐ นาที แล้ว นำน้ำใส ๐.๕ มล. ผสมกับ ๒.๕ มล. สารละลาย ๐.๕ M บอเรต–อาร์ซีเนต pH ๖.๕ (เตรียมจากสารละลายซึ่งมีกรดบอริกข้น ๐.๕ M และ มีโซเดียมอาร์–ซีเนต ข้น ๐.๕ M เช่นกัน และปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก) ตั้งทิ้งไว้ ๓๐ นาที แล้วนำไปวัด OD_{300}

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย คือ ปริมาณเอนไซม์ ซึ่งทำให้ OD_{300} เพิ่มขึ้น ๑.๐๐๐ ต่อนาที ที่ ๓๐ องศาC.

Specific activity คือ หน่วย/มก.

๒.๔.๑๑ การวัด activity ของไฮยาลูโรไนเดส

ใช้วิธีดัดแปลงโคโรโฟโตเมตริค (Reissig, Strominger and Leloir, 1965) product ที่เกิดจากการไฮโดรเลส hyaluronic acid จะมี N - acetyl glucosamine end group ซึ่งเมื่อนำไปต้มในด่างจะได้ furan derivative แล้วให้ทำปฏิกริยากับ p - dimethylaminobenzaldehyde จะได้สารสีแดงดูดแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น ๕๘๕ นม. วิธีวัดทำดังนี้

ผสม ๑.๕ มล. ๐.๐๕% กรดไฮยาลูโรนิก (ละลายใน ๐.๑๕ M ฟอสเฟต–

บัฟเฟอร์ pH ๖.๐) กับ ๑ มล. สารละลายพิษงู อุ่นที่ ๓๐ องศาC. ๒ ชม. หยุดปฏิกริยาโดยเติม ๐.๕ มล. ๒๐% กรดเปอร์คลอริค ตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง ๕๐๐๐ x g ๒๐ นาที นำน้ำใส ๒ มล. ผสมกับ ๐.๖ มล. ๐.๒ M สารละลายโปตัสเซียมเทตระบอเรต (เตรียมจากสารละลายซึ่งมีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์และกรดบอริคอยู่ชนิดละ ๐.๒ M) อุ่นในน้ำเดือด ๓ นาที แช่เย็นที่อุณหภูมิ ๐ องศา C. ๑๕ นาที เพื่อให้โปตัสเซียมเปอร์คลอเรตตกตะกอน นำน้ำใส ๑ มล. ผสมกับ ๓ มล. สารละลาย ๑% ของ p - dimethyl aminobenzaldehyde ในกรดแอซิติก (ใส่กรดไฮโดรคลอริคเล็กน้อยเพื่อเป็นตัวช่วยการละลาย) ตั้งทิ้งไว้ ๒๐ นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัด OD_{585}

activity ของเอนไซม์ ๑ หน่วย คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ OD_{585} เพิ่มขึ้น ๑.๐๐๐ ต่อนาที ที่ ๓๐ องศาC.

specific activity คือ หน่วย/มก.

๒.b การวัด activity ของการช่วยให้เลือดแข็งตัว

ใช้วัด recalcification time (Williams and Esnouf,1962) เมื่อเติมคัลเซียมคลอไรด์ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ลงใน citrated platelet-poor plasma ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากการหา prothrombin time โดยใช้พิษงูแมวเซาแทน ธรอมโบปลาสติน (Page, Beer and Orr, 1942) การวัดเวลาบันทึกโดย thromb - elastcgraph ทำดังนี้

อุ่น ๐.๔ มล. ปลาสมา[๑] กับ ๐.๑ มล. สารละลายพิษงู ที่ ๓๗ องศาC. ๕ นาที ในหลอดทดลองขนาด ๑ x ๑๐ ซม. แล้วเติม ๐.๒ มล. ๐.๐๒๕ M

---

[๑] ปลาสมาที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น Acid citrated dextrose human plasma (ACD plasma) U.S.P. formula A ได้รับบริจาคจากคลังเลือด โรงพยาบาลศิริราช.

สารละลายคัลเซียมคลอไรด์ (ซึ่งละลายใน ๐.๐๑ M ทริส–คลอไรด์ บัฟเฟอร์ และปรับให้ pH ๗.๒ แล้ว) ปิดหลอดทดลองด้วย parafilm ผสมโดยการหมุนหลอด ๑ รอบ บันทึกเวลาตั้งแต่เติมคัลเซียมลงไปในปลาสมา ทาย reaction mixture ไปใส่ในเซลล์ของ thromb-elast ograph ซึ่งอุ่นหลอดเวลาที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาC. เปิดเครื่องบันทึกเวลาของ thromb-clastograph วัด reaction time [๑] ซึ่งอ่านได้จากกระดาษถ่ายรูปในเครื่องมือนี้ วัด filling time [๒] และก็ recalcification time ได้จากผลรวมของ filling time และ reaction time รูปถ่ายเครื่องมือธรอมบ์–อีลาสโตกราฟ ปรากฏอยู่ใน ผนวก ก. และภาพถ่ายของกรรชนีแสง ที่ใช้บันทึกเวลาบนกระดาษถ่ายรูป ปรากฏอยู่ใน ผนวก ง.

activity ของการช่วยให้เลือดแข็งตัว ๑ หน่วย คือ ความเข้มข้นของพิษงูแมวเซาเดิมที่ยังไม่แยก (นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งมี activity เท่ากับสารละลายของพิษงูส่วนนั้น ๆ ขนาด ๑ นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยกำหนดจากกราฟมาตรฐาน ซึ่ง plot ระหว่าง recalcification time (นาที) กับความเข้มข้นของพิษงูเดิมที่ยังไม่แยก (นาโนกรัม/มิลลิลิตร) บน double logarithmic paper [๓]

---

๑ reaction time คือ เวลาตั้งแต่เปิดเครื่องมือบันทึกเวลาของธรอมบ์–อีลาสโตกราฟ ให้กรรชนีแสงตกลงบนกระดาษถ่ายรูป จนถึงเวลาที่ปลาสมาเริ่มแข็งตัว ซึ่งเป็นเวลาที่กรรชนีแสงกลับจากกันเป็นระยะทาง ๑ มม. บนกระดาษถ่ายรูป

๒ filling time คือ เวลาที่นับตั้งแต่เติมคัลเซียมแก่ปลาสมา จนถึงเวลาที่เปิดเครื่องบันทึกเวลาของธรอมบ์–อีลาสโตกราฟ.

๓ 1 nanogram (ng) = 10^{-9} gram (g)