

615 375

๗๙๗๖๗

๙๒

การพัฒนาแอนติบอดีเพื่อพิษงูทะเล  
ที่ผลิตจาก เซรัมม้า

ปริญญาโท

ของ

ไกรฤกษ์ ยี่เอ็ง

๘๘ ก ย ๒๕๓๐

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ ๒๕๓๐

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

164150

การพัฒนาแอนติบอดีจากพืช  
ที่ผลิตจาก เซรุ่มม้า

บทคัดย่อ  
ของ  
ไกรฤกษ์ ยี่เซียง

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร  
เพื่อ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต  
กุมภาพันธ์ 2530

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำแอนติวีนอมแท้พิษงูกะปะที่ได้จากม้ามาทำการเตรียมแอนติวีนอม โดยวิธีการ 2 วิธี วิธีที่หนึ่ง เตรียมแอนติวีนอมโดยวิธีการย่อยสลายด้วยเบปซิน แล้วตกตะกอน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต วิธีที่สอง เตรียมแอนติวีนอมโดยวิธี เจล ฟิลเทรชัน จากนั้น ทำการวิเคราะห์แอนติวีนอมโดยวิธี คัมเบลล์ อิมมูโนดิฟฟิวชัน และ ดิส โพลีอะครีลาไมด์ เจล อีเลคโตรพอรีซิส รวมทั้งทำการศึกษาคูณสมบัติของแอนติวีนอมที่ได้ เช่น ความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะ และความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด

จากการวิเคราะห์โดยวิธี คัมเบลล์ อิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่า แอนติวีนอมที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีที่หนึ่งและวิธีที่สอง เกิด precipitin line กับพิษงูกะปะ และเมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี ดิส โพลีอะครีลาไมด์ เจล อีเลคโตรพอรีซิส พบว่า แอนติวีนอมที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีที่หนึ่ง ปรากฏแถบโปรตีนเฉพาะที่ตำแหน่งโกลบูลิน ส่วนแอนติวีนอมที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีที่สอง ปรากฏแถบโปรตีนที่ตำแหน่งโกลบูลินและอัลบูมิน

แอนติวีนอมที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีที่หนึ่งและวิธีที่สอง มี % yield เท่ากับ 47.79% และ 43.51% ตามลำดับ

จากการศึกษาคูณสมบัติ พบว่า แอนติวีนอมที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีที่หนึ่งและวิธีที่สอง มีความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะ เท่ากับ 0.39 และ 0.07 แอลดี - 50 ต่อโปรตีน 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ และมีความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด เท่ากับ 0.14 และ 0.09 แอลดี - 50 ต่อโปรตีน 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ

DEVELOPMENT OF ANTIVENOM AGAINST MALAYAN PIT VIPER  
PRODUCED FROM HORSE SERUM

AN ABSTRACT  
BY  
KRILERK YEEHENG

Presented in partial fulfillment of the requirements  
for the Master of Education Degree  
at Srinakharinwirot University

February 1987

In this investigation, antivenom against Malayan Pit Viper was isolated from the serum of suitably inoculated horses. Two methods were used ; the first, a peptic digestion followed by ammonium salt precipitation and the second, gel filtration. The purified antivenoms were characterized by double immunodiffusion, disc polyacrylamide gel electrophoresis, and by their neutralizing and anticoagulant activities.

Using double immunodiffusion it has shown that both antivenom formed precipitin lines with Malayan Pit Viper venom.

The result of disc polyacrylamide gel electrophoresis showed that the antivenom prepared by the first method produced one protein band in the globulin position, but the antivenom obtained from the second method showed two bands, one in the globulin and the other in the albumin position.

The yields of the antivenoms prepared by the first and the second method were 47.79% and 43.51% respectively.

The neutralizing activities of the antivenoms prepared by the first and the second method were 0.39 and 0.07 LD<sub>50</sub> per mg. protein respectively. The anticoagulant activities of the antivenoms prepared by the first and the second method were 0.14 and 0.09 LD<sub>50</sub> per mg. protein respectively.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปริญญานิพนธ์  
ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดามหลักสูตรปริญญา การศึกษามหาบัณฑิต  
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒไว้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... นฤมล สีงอกวิเศษ ..... ประธาน  
..... ดน อภิบาล ..... กรรมการ

คณะกรรมการสอบ

..... นฤมล สีงอกวิเศษ ..... ประธาน  
..... ดน อภิบาล ..... กรรมการ  
..... ปวีณา สีงอกวิเศษ ..... กรรมการ

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์เรื่องนี้สำเร็จลงด้วยดี เนื่องจากผู้เขียนได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำจาก อาจารย์ นฤมล เรืองฤทธิมนตรี แห่งกองวิทยาศาสตร์ สภาอากาศไทย อาจารย์ ดร. สายสนม ธรรมพิทักษ์ แห่งคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในด้านการทดลองค้นคว้า ตลอดจนการเขียนปริญญานิพนธ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณยิ่ง

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ธารารัตน์ สุภศิริ และ อาจารย์ จริญญา สิ้นเต็มสุข แห่งคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้กรุณาตรวจทานและแก้ไขปริญญานิพนธ์เรื่องนี้จนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. กุวัจน์ ชูติวงศ์ ผู้อำนวยการกองวิทยาศาสตร์ สภาอากาศไทย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทางด้านสถานที่และเครื่องมือในการทดลอง

นอกจากนี้ผู้เขียนขอขอบคุณผู้มีรายชื่อต่อไปนี้ สำหรับน้ำใจและความช่วยเหลือที่มีต่อผู้เขียนด้วยดีเสมอมา

1. คุณวิรัช บัวแย้ม
2. คุณพรทิพย์ ศรีวรรณะ

ไกรฤกษ์ ยี่เอ็ง

## สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ .....	1
คำนำ .....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย .....	5
ความสำคัญของการวิจัย .....	5
ขอบเขตของการวิจัย .....	5
ค่านิยมศัพท์เฉพาะ .....	6
2 ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง .....	8
แกมมา โกลบูลิน (Gamma globulin) .....	8
โครงสร้างของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรค .....	8
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคในม้า .....	9
การย่อยสลายโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคด้วยเบปซิน .....	10
เจล ฟิลเทรชัน .....	11
อีเล็กโตรโฟรีซิส .....	12
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	13
3 การดำเนินการทดลอง .....	15
การเตรียมแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะจากแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะ ที่ได้จากม้า โดยการย่อยสลายด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วย เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต .....	15
การเตรียมแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะจากแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะ ที่ได้จากม้า โดยวิธีเจล ฟิลเทรชัน .....	17
การตรวจสอบสารละลายที่ได้จากเจล ฟิลเทรชัน โดยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน .....	18

การวิเคราะห์แอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะโดยวิธี คีส โพลีอะคริลาไมด์	
เจล อีเลคโตรโฟรีสิส .....	20
การหาปริมาณโปรตีนในแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะ .....	23
การหาค่า แอลดี - 50 (LD <sub>50</sub> ) ของพิษงูกะปะ .....	24
การหาค่าความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะของแอนติวีนอม .....	25
การหาค่าความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดของ	
แอนติวีนอม .....	27
การตรวจสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของ	
พิษงูกะปะ .....	28
4 ผลการทดลอง .....	30
การเตรียมแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะจากแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่	
ได้จากม้า โดยการย่อยสลายด้วยเปปซินแล้วตกตะกอนด้วย	
เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต .....	30
การเตรียมแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะจากแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่	
ได้จากม้า โดยวิธี เจล ฟิเลเทรชัน .....	30
ความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะของแอนติวีนอม .....	30
ความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดของแอนติวีนอม .....	31
การตรวจสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของ	
พิษงูกะปะ .....	46

บทที่	หน้า
5 สรุป อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ .....	47
บทย่อ .....	47
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย .....	47
ข้อเสนอแนะ .....	50
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัย .....	50
บรรณานุกรม .....	51

## บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงแอนติวีนอม รีแอคชัน (antivenom reaction) ใน ผู้ถูกงูกัด ที่ได้รับแอนติวีนอมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของมาเลเซีย .....	3
2 ค่าแอลดี - 50 ของพิษงูกะปะ .....	35
3 ความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะของแอนติวีนอมที่ได้จากม้า .....	36
4 ความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะของแอนติวีนอมที่ได้จาก การย่อยสลายด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	37
5 ความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะของแอนติวีนอมที่ได้จาก เจล ฟิลเตรชัน .....	38
6 แสดงผลของแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่ได้จากม้าในการยับยั้งการแข็งตัว ของเลือดที่เกิดจากพิษงูกะปะ .....	39
7 แสดงผลของแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเบปซิน แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการยับยั้งการแข็งตัว ของเลือดที่เกิดจากพิษงูกะปะ .....	41
8 แสดงผลของแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่ได้จาก เจล ฟิลเตรชัน ในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดที่เกิดจากพิษงูกะปะ .....	43
9 เปรียบเทียบแอนติวีนอมที่ได้จากการพัฒนาโดยวิธี เจล ฟิลเตรชัน และ วิธีการย่อยสลายด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียม ซัลเฟต .....	45
10 แสดงผลการตรวจสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ของพิษงูกะปะ .....	46

## บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงโครงสร้างโมโนเมอร์ (monomer) ของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ภูมิคุ้มกันโรค .....	9
2 แสดงชิ้นส่วนที่เกิดขึ้นจากการย่อยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคด้วย เปปซิน .....	10
3 แสดงพีค (peak) ของโปรตีนต่าง ๆ ในเซรัมของมนุษย์จาก เจล ฟิเลเทรชัน .....	11
4 แสดงโปรตีนใน เซรัมของมนุษย์ที่ถูกแยกออกจากกันโดย ดิส โพลอะคริลาไมด์ เจล อีเลคโตรฟอริซิส .....	13
5 แสดงตำแหน่งของหลุมวุ้นที่เจาะสำหรับใช้ทดสอบ ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน .....	19
6 แสดงพีคโปรตีนที่ได้จากการผ่านแอนติวีนอมที่ได้จากม้า 4 ลูกบาศก์- เซนติเมตรลงในคอลัมน์ เซฟาคริล เอส - 300 ซุปเปอร์ฟายน์ ขนาด $1.6 \times 68$ เซนติเมตร .....	32
7 แสดง precipitin line ที่ได้จากการทดสอบสารละลายจาก เจล ฟิเลเทรชัน โดยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน .....	33
8 แสดงโปรตีนในเซรัมของแอนติวีนอมที่ถูกแยกออกจากกันโดย ดิส โพลอะคริลาไมด์ เจล อีเลคโตรฟอริซิส .....	34
9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการแข็งตัวของเลือดกับปริมาณ แอนติวีนอมที่ได้จากม้า .....	40
10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการแข็งตัวของเลือดกับปริมาณ แอนติวีนอมที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเปปซินแล้วตกตะกอนด้วย เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต .....	42

ภาพประกอบ

หน้า

11	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการแข็งตัวของเลือดกับปริมาณแอนติวีนอมที่ได้จาก เจด ฟิลเตรชัน .....	44
12	พิษงูกะปะสลายไฟบริโนเจนที่สายเอ $\alpha$ .....	49

คำนำ

ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นั้น สถิติของผู้ที่เสียชีวิตเนื่องจากถูกงูพิษกัด ในแต่ละปีมีจำนวนรวมกันมากกว่า 2,500 ราย ประเทศที่มีรายงานผู้เสียชีวิตอยู่ในเกณฑ์สูง คือ พม่า อินเดี ย ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา และไทย สำหรับประเทศไทยผู้ที่ถูกงูกัดในแต่ละปีมีจำนวนเฉลี่ย 3,989 ราย ในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิตเฉลี่ย 302 ราย หรือทุก ๆ จำนวน ประชากร 100,000 คน จะมีผู้เสียชีวิตเฉลี่ยต่อปี 0.860 ราย หรือราว 1 ราย (WHO. 1981 : 5, 19)

งูกะปะมีชื่อสามัญว่า มาลายัน พิท ไวเปอร์ (Malayan Pit Viper) มีชื่อทาง วิทยาศาสตร์ว่า แอกลิสโทรดอน โรโดสโตมา (Agkistrodon rhodostoma) แฟมิลี : ไวเปอร์ตี (Family . Viperidae) ซับแฟมิลี : กรอตาเลียตี (Sub - family . Crotalidae) จีนัส : แอกลิสโทรดอน (Genus Agkistrodon) (วิโรจน์ นุตพันธุ์ 2514 : 32) งูกะปะเป็นงูพิษชนิดหนึ่งที่พบชุกชุมมากในจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย เช่น ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช เป็นต้น นอกจากนั้นยังสามารถ พบงูชนิดนี้ได้ในจังหวัดทางภาคอื่น ๆ ของประเทศอีกด้วย เช่น ระยอง ชลบุรี จันทบุรี ตราด เชียงใหม่ หนองคาย ลพบุรี กาญจนบุรี เป็นต้น (บุญเยี่ยม ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธุ์ 2525 : 87)

พิษงูกะปะมีพิษต่อโลหิต แม้จะไม่ทำอันตรายถึงชีวิตอย่างทันทีทันใด แต่ผู้ป่วยที่ถูกงู ชนิดนี้กัดจะมีอาการเจ็บปวดมาก เนื่องจากมีเลือดออกจากส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ใต้ผิวหนัง ตามไรฟัน เลือดกำเดาออก ปัสสาวะ และอุจจาระมีเลือดปน ทั้งนี้เพราะพิษงู ต่อโลหิตมี เอนไซม์โปรตีเอส (proteases) ที่สามารถทำลายไฟบริน (fibrinolysis) และทำลายโปรตีนไฟบริโนเจน (fibrinogenolysis) ในเลือด (Cecil and Loeb. 1959 : 518 - 519), (Jiménez - Porras. 1970 : 406), (Mohamed and El - Damarawy. 1974 : 471 - 472) โดยเอนไซม์โปรตีเอสจะย่อยไฟบริโนเจน

ออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ การสะสมของชิ้นส่วนเล็ก ๆ เหล่านี้จะทำให้เกิดการขัดขวางการเกิดโพลีเมอร์ของไฟบริน (polymerization of fibrin) (Mohamed and El - Damarawy citing Fletcher, Alkaersig and Sherry. 1962 : 896) ทำให้เลือดไม่สามารถแข็งตัว (WHO. 1981 : 6) นอกจากนั้นพิษงูปะยังมีสมบัติเหมือนทรอมบิน (thrombin) เมื่อรวมกับไฟบริโนเจนในพลาสมา (plasma) จะทำให้เกิดไฟบริน เมื่อไฟบริโนเจนในพลาสมาลดลงหรือไม่มี จะทำให้เลือดไม่แข็งตัว (มุกดา ตฤณานนท์ และคณะ ๑ 2525 : 52) ผู้ป่วยจะรู้สึกปวดในช่องท้องอย่างรุนแรงจนขนาดเสียชีวิตได้ ถ้าอาการทั่วไปดีขึ้น บริเวณที่ถูกกัดอาจวมเน่าเปื่อยเป็นเนื้อตาย (gangrene) โดยเฉพาะในรายที่พิษงูปะกัดเข้าหลอดเลือด ผู้ป่วยจะมีอาการชักรุนแรงและถึงเสียชีวิตทันที (กองวิทยาศาสตร์ 2523 : 2)

การรักษาผู้ถูกพิษกัด จำเป็นต้องให้แอนติเวินอมแก่พิษงูชนิดที่กัดแก่ผู้ป่วย (Medical letter. 1978 : 101 - 102) แอนติเวินอมแก่พิษงูเป็น เซรุ่มจากม้าที่ถูกกระตุ้นให้มีภูมิคุ้มกันด้วยพิษงู ทำให้เซรุ่มของม้ามมีแอนติบอดี (antibody) ต่อพิษงูนั้น ๆ ในขนาดสูง (มนตรี ชูจินดา, สมโพธิ หุกกะเวส และบุญเย็น ทุมวิภาต 2519 : 224 - 225)

ในการรักษาผู้ป่วยด้วยแอนติเวินอมแก่พิษงู อาจเสี่ยงต่ออาการภาวะภูมิไวเกิน (hypersensitivity) หรืออาการแพ้ (allergy) ชนิดแอนาฟิแล็กซิส (anaphylaxis) (ตาราง 1) หรือเซรุ่ม ซิคเนส (serum sickness) และพบว่าแอนาฟิแล็กซิสมีโอกาสตั้งแต่ไม่เกิดเลยไปจนถึงเกิดมากกว่า 40% (WHO. 1981 : 14) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าราว 30% ถึง 70% ของผู้ป่วยที่ถูกรักษาด้วยแอนติเวินอมแก่พิษงูจะมีอาการภาวะภูมิไวเกินเกิดขึ้นควบคู่อยู่เสมอ (Medical letter. 1978 : 101 - 102)

การให้แอนติเวินอมแก่พิษงูทางเส้นโลหิตดำเท่านั้นที่เป็นการรักษาที่ได้ผลดีที่สุดสำหรับผู้ถูกพิษกัด การให้แอนติเวินอมแก่พิษงูทางใต้ผิวหนังหรือเข้ากล้ามเนื้อจะไม่ให้ผลดีเท่าที่ควร หากจำเป็นต้องให้ทางใต้ผิวหนังหรือเข้ากล้ามเนื้อ จะต้องใช้แอนติเวินอมแก่พิษงูเพิ่มขึ้นมากกว่าที่ให้ทางเส้นโลหิตดำ ประมาณ 2 หรือ 3 เท่า (องค์การเภสัชกรรม 2522 : 2)

ตาราง 1 แสดงแอนติเวโนม รีแอคชั่น (antivenom reaction) ในผู้ถูกงูกัดที่ได้รับแอนติเวโนมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของมาเลเซีย

แอนติเวโนม <sup>1</sup> ชนิด	ขนาด (ลูกบาศก์ เซนติเมตร)	ลักษณะ การฉีด <sup>2</sup>	จำนวนผู้ป่วย (คน)	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น		
				Anaphylactoid	Early mild	Delay <sup>3</sup>
กรุงเทพฯ 1958-1959 แอกคิสโทรคอน โรโคสโตมา	10	IMI	53	-	1	4(+1)
กรุงเทพฯ 1960-1964 แอกคิสโทรคอน โรโคสโตมา	20	IMI	193	2	13	12(+3)
กรุงเทพฯ 1960-1964 แอกคิสโทรคอน โรโคสโตมา	50	IMI	140	5	22	20(+3)
กรุงเทพฯ 1960-1964 แอกคิสโทรคอน โรโคสโตมา	50	IVD	42	6	12	2(+3)
กรุงเทพฯ 1960-1964 แอกคิสโทรคอน โรโคสโตมา	50	IVD	4	1	2	(+3)
กรุงเทพฯ 1960-1964 แอกคิสโทรคอน โรโคสโตมา	28-112	IVD	4	-	1	-

<sup>1</sup> รัฟายน์ แอนติเวโนม (refined antivenom)

<sup>2</sup> IMI การฉีดแอนติเวโนมแก่พิษงูบไซยาลูโรนิเตส (hyaluronidase) 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เข้ากล้ามเนื้อ

IVD การ ใช้แอนติเวโนมแก่พิษงูที่ฉีดจากด้วยสารละลายไซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9% เข้าเส้นเลือดที่ละหยด

<sup>3</sup> ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายหลังจากเกิด Anaphylactoid และ Early mild reaction

ถ้าแอนติวีนอมแก่พิษงูมีความบริสุทธิ์ขึ้น จะช่วยทำให้การฉีดแอนติวีนอมแก่พิษงูทางเส้นโลหิตดำ มีความปลอดภัยจากการเกิดอาการแพ้ รวมทั้งเป็นการประหยัดปริมาณการใช้แอนติวีนอมแก่พิษงูอีกด้วย

ต่อมาได้มีการพัฒนาแอนติวีนอมแก่พิษงูให้มีคุณภาพดีขึ้น สามารถฉีดเข้าเส้นโลหิตได้ เรียกว่า รีฟายน์ แกมมา โกลบูลิน (refined gamma globulin) ซึ่งได้จากการใช้ เปปซิน (pepsin) ย่อยสลายแกมมา โกลบูลิน ที่ส่วน เอฟ ซี (Fc fragment) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้ ไอ จี จี (IgG) ในแกมมา โกลบูลิน รวมตัวกันเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน ดังนั้นถ้าให้ ไอ จี จี ที่มีส่วน เอฟ ซี เข้าเส้นโลหิต จะกระตุ้นให้เกิดการตรึงคอมพลีเมนต์ (complement fixation) ก่อให้เกิดอาการภาวะภูมิไวเกินชนิดแอนเฟิแล็กซิส (ประพันธ์ ภาณุภาค 2527 : 304) (Herbert and Wilkinson. 1977 : 74)

นอกจากนั้นยังได้มีการพัฒนาแอนติวีนอมแก่พิษงูให้มีคุณภาพดียิ่ง ๆ ขึ้น เพื่อให้ได้แอนติบอดีที่จำเพาะ โดยการใช้วิธีแยกสารทางชีวเคมีให้บริสุทธิ์ที่เรียกว่า แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี (affinity chromatography) (Kukongviriyapan. 1979 : 44)

สถานเสาวภา กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย เป็นหน่วยงานที่ผลิตแอนติวีนอมแก่พิษงู ซึ่งปัจจุบันสามารถผลิตได้ 6 ชนิด คือ แอนติวีนอมแก่พิษงูเห่า งูจงอาง งูสามเหลี่ยม งูแมวเซา งูกะปะ และงูเขียวหางไหม้ แอนติวีนอมที่ผลิตเป็นแอนติวีนอมที่ได้จากม้า ซึ่งมักจะก่อให้เกิดภาวะภูมิไวเกินในตัวผู้ป่วยอยู่เสมอ ปัจจุบันทางสถานเสาวภา มีโครงการพัฒนาการผลิตแอนติวีนอมแก่พิษงูให้มีคุณภาพดีขึ้น

ด้วยเหตุดังกล่าวข้างต้น ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะเตรียมแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะให้มีคุณภาพดีขึ้น โดยอาศัยวิธีการย่อยสลายด้วยเปปซิน (pepsin digestion) และ เจล ฟิลเตรชัน (gel filtration) และศึกษาทางด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์เป็นประการสำคัญ ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์โดยตรงกับผู้ผลิตแอนติวีนอมแก่พิษงูในการพัฒนาแอนติวีนอมแก่พิษงู ไม่เพียงแต่แอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะชนิดเดียว ยังรวมถึงการพัฒนาแอนติวีนอมแก่พิษงูชนิดอื่น ๆ อีกด้วย

### จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อเตรียมแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะ จากแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่ได้จากม้า โดยวิธี
  - 1.1 การย่อยสลายด้วยเปปซิน แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต
  - 1.2 เจล ฟิลเตรชัน
2. วิเคราะห์แอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะ โดยวิธี
  - 2.1 ดิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเล็กโทรโฟรีซิส (disc polyacrylamide gel electrophoresis)
  - 2.2 ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟูชัน (double immunodiffusion)
3. การศึกษาคุณสมบัติของแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะ
  - 3.1 ปริมาณโปรตีน
  - 3.2 ความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะ
  - 3.3 ความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด
  - 3.4 ความสามารถในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

### ความสำคัญของการวิจัย

1. ผลที่ได้จากการวิจัย จะทำให้ได้แอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่บริสุทธิ์ขึ้น และมีความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะเพิ่มขึ้น
2. จากเทคนิคและกระบวนการทดลอง จะเป็นแนวทางในการพัฒนาแอนติวีนอมแก่พิษงูชนิดอื่น ๆ ให้มีคุณภาพดีขึ้น

### ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาเฉพาะแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่ได้จากสถานเสาวภา กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย

### คำนิยามศัพท์เฉพาะ

1. แอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะ หมายถึง แอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่ได้จากสถานเสาวภา  
กองวิทยาศาสตร์ สภาวิทยาศาสตร์ ซึ่งเป็นเซรัมจากม้าที่ถูกกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันด้วยพิษงูกะปะ  
ทำให้เซรัมของม้านั้นมีแอนติบอดีต่อพิษงูกะปะในขนาดสูง
2. การย่อยสลายด้วยเบปซิน หมายถึง การใช้เอนไซม์เบปซินย่อยสลายส่วนเอพซี  
ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรค
3. เจล ฟิลเตรชัน หมายถึง เทคนิคการแยกสารทางชีวเคมีโดยอาศัยความ  
แตกต่างของขนาดโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก
4. โพลีอะครีลาไมด์ เจล อีเลคโตรฟอรีซิส หมายถึง เทคนิคการทดสอบความบริสุทธิ์  
ของสารชีวโมเลกุล โดยอาศัยกระแสไฟฟ้า และมีโพลีอะครีลาไมด์ เจล เป็นตัวกลาง
5. แอลดี - 50 หมายถึง ปริมาณพิษงูที่สามารถทำให้หนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ  
18 กรัม ตาย 50% ของจำนวนหนูขาวทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง
6. ความสามารถในการทำลายพิษงู หมายถึง ความสามารถของแอนติวีนอม  
แก่พิษงูชนิดหนึ่งในการทำลายพิษงูชนิดนั้น โดยมีหน่วยเป็นจำนวน แอลดี - 50 ( $LD_{50}$ )  
ของพิษงู ต่อปริมาณแอนติวีนอมแก่พิษงู
7. ความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด หมายถึง ความสามารถของ  
แอนติวีนอมแก่พิษงูชนิดหนึ่ง ในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดที่เกิดจากพิษงูชนิดนั้น โดยมี  
หน่วยเป็น แอลดี - 50 ( $LD_{50}$ ) ของพิษงูต่อปริมาณแอนติวีนอมแก่พิษงู
8. ภาวะภูมิไวเกิน เป็นผลจากปฏิกิริยาระหว่างระบบอิมมูนของร่างกายกับแอนติเจน  
ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย แล้วก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายในรูปแบบต่าง ๆ (เบญจจะ เพชรคล้าย  
2525 : 23) เช่นทำให้เกิดการอักเสบหรือการทำลายเนื้อเยื่อ (ประพันธ์ ภาณุภาค  
2527 : 141)
9. แอแนพิแล็กซิส เป็นภาวะภูมิไวเกินที่เกิดจากการได้รับเซรัม (มนตรี ตูจินดา  
สมโพธิ ทุกกะเวส และบุญเยี่ยม ทุมวิภาต 2519 : 224 - 245) ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยา  
ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ชนิด ไอ จี อี (IgE) ที่เกาะติดบนผิวของ มาสต์ เซลล์  
(mast cell) ไอ จี อี จะใช้ส่วน เอพ ซี (Fc portion) จับผิวของมาสต์ เซลล์

แล้วมีส่วน เอฟ เอ บี (Fab) ออกมานอกเซลล์เพื่อจับแอนติเจน ภาวะภูมิไวเกินชนิดนี้ จะเกิดขึ้นเมื่อ ไอ จี อี 2 โมเลกุลที่อยู่บนผิวของมาสต์ เซลล์ ถูกเชื่อมโยงเข้าด้วยกัน โดยแอนติเจน หรือแอนติ ไอ จี อี (anti - IgE) เมื่อ ไอ จี อี 2 โมเลกุลเชื่อม เข้าหากันจะมีสัญญาณจากผิวของมาสต์ เซลล์ ให้เกิดการปล่อยสารจากภายใน เกรนูล (granule) ของมาสต์ เซลล์ ออกมานอกเซลล์ เรียกว่า ดีเกรนูลเลชัน (degranulation) สารที่ถูกปล่อยออกมาจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดแอนาฟิแล็กซิส สารเหล่านี้ประกอบด้วย Histamine Slow Reactive Substance of Anaphylaxis (SRS - A), Platelet Activating Factor (PAF), Eosinophilic chemotactic factor of anaphylaxis (ECF - A) (เบญจะ เพชรคล้าย 2525 : 23) ทำให้เกิดอาการ รุนแรง เช่น ลมพิษ หอบหืด คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และอาจมีอาการช็อค อาการต่าง ๆ จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหลังได้รับเซรุ่ม

10. เซรุ่ม ซิคเนส เป็นภาวะภูมิไวเกินที่เกิดจากมี ไอ จี จี (IgG) หรือ ไอ จี เอ็ม (IgM) แอนติบอดีต่อแอนติเจน แอนติบอดีจะรวมตัวกับแอนติเจนที่อยู่ใน กระแสโลหิตกลายเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนลอยอยู่ในกระแสโลหิต และอาจฝังตัวบนเส้นเลือดที่ ผิวหนังหรือที่ไต เกิดการตรึงคอมพลีเมนต์ (ประพันธ์ ภาณุภาค 2527 : 141 - 142) ทำให้มีการหลั่งสารออกมาและมีการทำลายเนื้อเยื่อตามอวัยวะต่าง ๆ ได้ เกิดอาการต่าง ๆ เช่น ไข้ ลมพิษ ต่อมน้ำเหลืองโต เป็นต้น

11. คอมพลีเมนต์ เป็นกลุ่มโปรตีนในน้ำเหลืองที่เสริมปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี เป็นผลให้เกิดการอักเสบและการแตกทำลายของเซลล์

12. การตรึงคอมพลีเมนต์ หมายถึง การที่คอมพลีเมนต์ถูกตรึงและกระตุ้นในปฏิกิริยา ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

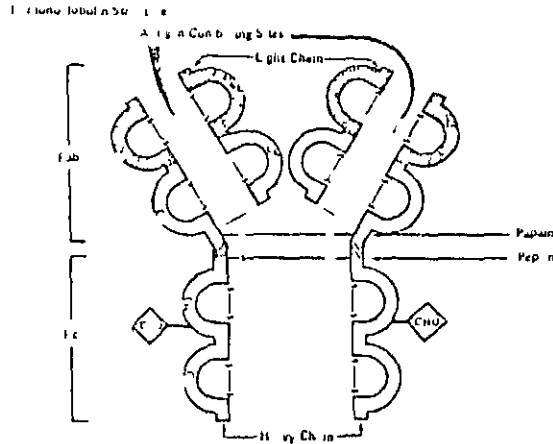
แกมมา โกลบูลิน (Gamma globulin)

แกมมา โกลบูลิน เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรค ซึ่งจำแนกได้ตามลักษณะโครงสร้างและลักษณะทางเคมีวิทยาเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immunochemistry) (วีทูล วีรานูวัตต์ 2525 : 206) ได้ 5 ประเภท คือ

1. อิมมูโนโกลบูลิน จี (immunoglobulin G ; IgG)
2. อิมมูโนโกลบูลิน เอ (immunoglobulin A ; IgA)
3. อิมมูโนโกลบูลิน เอ็ม (immunoglobulin M ; IgM)
4. อิมมูโนโกลบูลิน ดี (immunoglobulin D ; IgD)
5. อิมมูโนโกลบูลิน อี (immunoglobulin E ; IgE)

โครงสร้างของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรค

โครงสร้างของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรค (ภาพประกอบ 1) ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide chain) 2 คู่ คู่หนึ่งเป็น เฮวี เชน (heavy chain) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะของแต่ละประเภท เช่น ไอ จี จี (IgG) เป็นสายแกมมา ( $\gamma$ ) ไอ จี เอ (IgA) เป็นสายแอลฟา ( $\alpha$ ) ไอ จี เอ็ม (IgM) เป็นสายมิว ( $\mu$ ) ไอ จี ดี (IgD) เป็นสายเดลตา ( $\delta$ ) และ ไอ จี อี (IgE) เป็นสายเอพซิลอน ( $\epsilon$ ) อีกคู่หนึ่งเป็น ไลต์ เชน (light chain) ซึ่งจะเหมือนกันหมดในทุกประเภท คือเป็นสายแคปฟา ( $\kappa$ ) หรือไมเกี เป็นสายแลมตา ( $\lambda$ ) ทั้งไลต์ เชน และ เฮวี เชนนี้ ต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ จำนวนพันธะไดซัลไฟด์ที่ต่อระหว่าง เฮวี เชน ด้วยกันก็จะเพาะสำหรับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรค



ภาพประกอบ 1 แสดงโครงสร้างโมโนเมอร์ (monomer) ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรค ลักษณะที่เด่นชัดคือ มีสายเปปไทด์ที่เปลี่ยนได้ทั้งในสายไลท์ เช่น และ เฮวี เช่น ให้ชื่อ วี แอล ( $V_L$ ) และ วี เอช ( $V_H$ ) และมีส่วนที่ไม่เปลี่ยนแปลงคือ ส่วนซีแอล ( $C_L$ ) และ ซี เอช ( $C_H$ ) พันธะไดซัลไฟด์ แสดงด้วยอักษร -SS- บริเวณที่เป็นกล้ายามานับระหว่าง ซี เอช - 1 ( $C_{H1}$ ) และ ซี เอช - 2 ( $C_{H2}$ ) แสดงด้วยเส้นทแยงบริเวณนี้จะถูกแยกออกโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ง่ายเป็นชิ้นส่วนเอฟ เอบี (Fab) และ เอฟ ซี (F<sub>2</sub>C)

(วิบูล วิราวุธคดี 2525 : 207)

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคในน้ำ

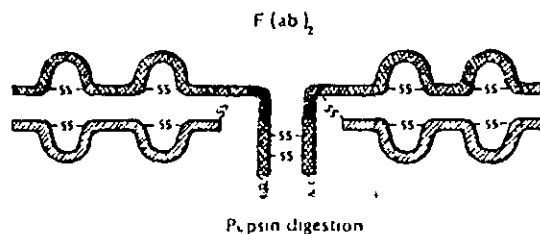
น้ำเป็นสัตว์เลี้ยงดูด้วยน้ำนมชนิดหนึ่งที่มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรค ซึ่งมีคุณสมบัติที่เกี่ยวกับฟิสิกส์และเคมี (physicochemical property) คล้ายกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคของมนุษย์ (Abramoff, 1970 : 46)

ในเซรัมของน้ำนมมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคที่สำคัญ คือ ไอ จี จี (IgG) และ ไอ จี จี (ที) (IgG (T)) หรือ ที - โกลบูลิน (T - globulin) (Ernst, Arnon and Sela, 1968 : 513) ที - โกลบูลิน เป็นโปรตีนที่มีแอนติบอดีอยู่ราว 90% ในเซรัมที่มีแอนติบอดีจำเพาะ

เมื่อตกตะกอน ไอ จี จี ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30% แล้วสามารถแยก ที่ - โกลบูลิน ออกมาได้โดยตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 45% นอกจากนี้สามารถแยก ที่ - โกลบูลินโดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย ดี อี เอ อี เซลลูโลส (DEAE - cellulose column) หรือโซนอิเล็กโตรฟอรีซิส (Zone electrophoresis) ที่ - โกลบูลิน มีค่าสัมประสิทธิ์เซดิเม้นเตชัน (sedimentation coefficient) 6.9 มีน้ำหนักโมเลกุล 160,000 และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 4.9% ในการวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรฟอรีซิส ที่ - โกลบูลิน จะเคลื่อนไปที่ตำแหน่งเบตา - 2 โกลบูลิน ( $\beta_2$  - globulin) (Abramoff. 1977 : 46 - 47)

#### การย่อยสลายโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคด้วยเปปซิน

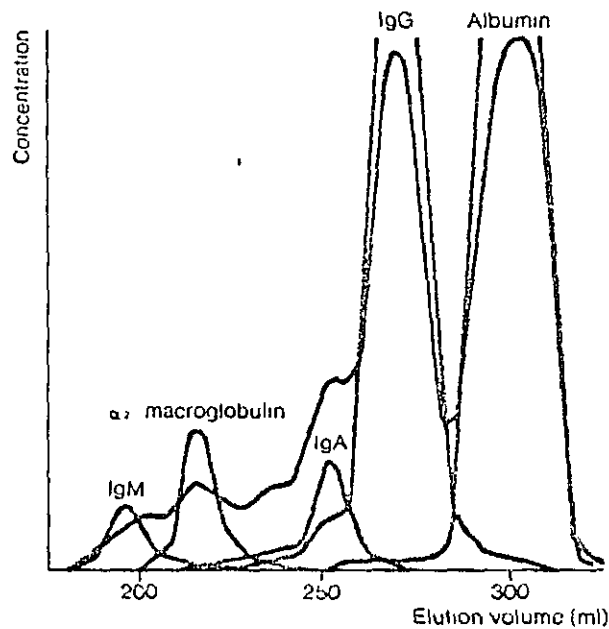
ไอ จี จี เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรค ที่สามารถถูกย่อยออกเป็นส่วน ๆ ได้โดยเอนไซม์เปปซิน (ภาพประกอบ 2) จะได้แอนติบอดีชนิด 5S มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000 (วีกุล วีรานูวัตต์ 2525 : 214) หรือประมาณ 2 ใน 3 ของน้ำหนักโมเลกุลของ ไอ จี จี เริ่มต้น ขึ้นส่วน 5S ที่ได้นี้เรียกว่า เอฟ เอบี ไพร็ม - 2 ซึ่งสามารถจับกับแอนติเจนได้ 2 ที่ สำหรับส่วนที่เป็น เฮวี เช่น ที่เรียกว่า เอฟ ซี มีประมาณ 1 ใน 3 ของโมเลกุลเริ่มต้น จะถูกย่อยเป็นสายโพลีเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่ไม่สามารถจับกับแอนติเจนได้ (Hudson and Hay. 1980 : 196)



ภาพประกอบ 2 แสดงชิ้นส่วนที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคด้วยเปปซิน ส่วนของ เอฟ ซี จะถูกย่อยสลายได้พันธะไดซัลไฟด์ เหลือชิ้นส่วนขึ้นเคียงที่สามารถจับกับแอนติเจน 2 ที่ เรียกว่า เอฟ เอบี ไพร็ม - 2 (วีกุล วีรานูวัตต์ 2525 : 214)

## เจล ฟิลเทรชัน

เจล ฟิลเทรชัน เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสารที่แยกโดยใช้คอลัมน์ ซึ่งภายในบรรจุด้วยเจล แต่ละเม็ดเจลจะมีลักษณะเป็นรูเล็ก ๆ ซ้ำซ้อน เจลเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นสแตชันนารี เฟส (stationary phase) ในคอลัมน์ (วีบูล วีรานูวัตตี 2525 : 60 - 61)



ภาพประกอบ 3 แสดงพีค (peak) ของโปรตีนต่าง ๆ ในเซรัมของมนุษย์ จาก เจล ฟิลเทรชัน

โดยใช้ เจล เซฟาคริล เอส - 300 ซุปเปอร์ฟายน์ คอลัมน์ ( $2.6 \times 94$  เซนติเมตร)

ความสูงของเจลที่บรรจุในคอลัมน์ . 94 เซนติเมตร

ตัวชะ : สารละลายบัฟเฟอร์ทริส - ไฮโครเจนคลอไรด์

ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0

อัตราการไหล : 2.4 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเซนติเมตร

(Pharmacia. 1982 : 14)

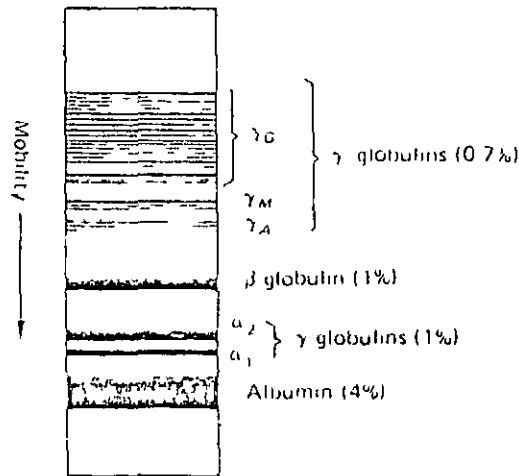
ขณะที่สารผ่านลงมาในคอลัมน์ การเคลื่อนที่ของสารจะขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของโมบิลเฟส (mobile phase) เป็นเหตุให้โมเลกุลของสารมีการแพร่ทั้งเข้าและออกจากสแตชันนารี เฟส สารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูของเจลจึงถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วที่สุด ส่วนสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก จะสามารถผ่านเข้าไปในรูเจลได้ จึงถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า จากสัดส่วนของเวลาที่ต่างกันในการเคลื่อนผ่านสแตชันนารี เฟส จึงทำให้สารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน ถูกชะออกจากคอลัมน์ในเวลาที่แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 3) โดยสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนโมเลกุลเล็ก (Pharmacia, 1982 : 4), (Pherson, 1982 : 31)

### อิเล็กโตรฟอรีซิส

การวิเคราะห์สารด้วยอิเล็กโตรฟอรีซิส ใช้หลักการเคลื่อนที่ของอนุภาคซึ่งมีประจุในตัวกลางที่อยู่ในสนามไฟฟ้า ไปยังขั้วที่มีประจุไฟฟ้าตรงข้าม (Brewer, Pesce and Ashworth, 1974 : 129) ระยะเวลาเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้า จะเป็นปฏิภาคกับความแรงของประจุ และความแรงของประจุจะเปลี่ยนแปลงไปตาม พี เอช (pH) ของสารละลายบัฟเฟอร์นั้น ๆ

ถ้าโปรตีนอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี พีเอช เท่ากับจุดไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point) โปรตีนจะไม่เคลื่อนที่ ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กตริก โปรตีนจะมีประจุบวกมากและเคลื่อนไปทางขั้วลบ ส่วนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชสูงกว่าจุดไอโซอิเล็กตริก โปรตีนจะมีประจุลบมาก และเคลื่อนไปทางขั้วบวก (Jayaraman, 1981 : 28)

การแยกส่วนของโปรตีนในเซรัม มักทำในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นต่าง และที่พีเอชนี้ โปรตีนมีประจุเป็นลบ (วีกุล วีรานูวัตต์ 2525 : 42) และเคลื่อนไปสู่ขั้วบวก ทำให้แยกออกเป็น 5 ส่วน (ภาพประกอบ 4) คือ อัลบูมิน (albumin) แอลฟา - 1 โกลบูลิน ( $\alpha_1$  globulin) แอลฟา - 2 โกลบูลิน ( $\alpha_2$  globulin) เบตา โกลบูลิน ( $\beta$  globulin) และ แกมมา โกลบูลิน ( $\gamma$  globulin) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคนั้นส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของแกมมา ( $\gamma$  fraction) และมีส่วนน้อยอยู่ในส่วนของเบตา และแอลฟา - 2 (วันเพ็ญ ชัยคำภา 2525 : 11 - 12), (Hudson and Hay, 1980 : 122)



ภาพประกอบ 4 แสดงโปรตีนในเซรัมของมนุษย์ที่ถูกแยกออกจากกันโดย ดิส โพลีอะครีลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (disc polyacrylamide gel electrophoresis) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นค่า

(Brewer, Pesce and Ashworth. 1974 : 100).

ในทางชีวเคมีอีเลคโตรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่นิยมใช้วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสาร โดยอาศัยปริมาณสารตัวอย่างเพียงเล็กน้อย (Brewer, Pesce and Ashworth. 1974 : 129) รวมทั้งนิยมใช้ในการแยกโปรตีนในเซรัมอีกด้วย (Weir citing Stelos. 1956, 1957, 1964)

### เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอิร์นส, อาโนน และซีลา (Ernst, Arnon and Sela. 1965 : 513 - 524) ได้เตรียมโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคจากเซรัมม้าโดยการตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40% แล้วย่อยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโรคที่ได้ด้วยไซยาโนเจน โบรไมด์ (cyanogen bromide) จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเจล เซฟาเดกซ์ จี 150 (Sephadex G - 150 column) ได้ชิ้นส่วนที่สำคัญ 5S และพบว่าไซยาโนเจน โบรไมด์ สามารถย่อย ไอ จี จี และ ไอ จี จี (ที) จากแอนติเวโนมแก้พิษงูไวเปอร์ (anti - Viper venom serum) ได้ดีพอ ๆ กับการ

แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสมบัติแตกต่างกันในเรื่องความสามารถในการทำลายพิษงูดังกล่าว ซึ่งจะพบเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย ไอ จี จี (ที) เท่านั้น

ลาชแมน (Lachmann. 1970 : 81 - 86) ได้เตรียม เอฟ เอบี ไพร็ม - 2 จากตะกอน ฮิวแมน ซี-3 - แอนติฮิวแมน ซี-3 (human C-3 - antihuman C-3 precipitate) โดยการย่อยด้วยเปปซิน แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเจลเซฟาเดกซ์ จี 100 (Sephadox G - 100 column) พบว่า เอฟ เอบี ไพร็ม - 2 ที่เตรียมได้ ไม่มีสมัตติในการตรึงคอมพลีเมนต์

ดิสसानายาเก และ เฮย์ (Dissanayake and Hay. 1974 : 373 - 377) ได้เตรียมไอ จี จี จากเซรุ่มหนู (mouse serum) โดยการตกตะกอนด้วยสารละลาย แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 45% ย่อยสลาย ไอ จี จี ที่ได้ด้วยเปปซิน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำส่วนที่ได้จากการย่อยไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเจล เซฟาเดกซ์ จี - 150 พบว่า สามารถย่อยสลายส่วน เอฟ ซี ออกจาก ไอ จี จี

ฟัสท์ และ เทนเจอร์ดี (Faust and Tengerdy. 1970 : 744 - 746) ได้กระตุ้นวัวให้เกิดภูมิคุ้มกันด้วย โอโวทรานสเฟอริน (ovotransferrin) นำแอนติบอดีที่ได้อ้อมผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเจล เซฟาเดกซ์ จี 150 พบว่า แยกโปรตีนที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันโรค ได้ 3 ชนิด เรียงลำดับการถูกชะออกจากคอลัมน์ได้คือ ไอ จี เอ็ม ไอ จี เอ และ ไอ จี จี โดย ไอ จี จี ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 170,000

คุกงวิริยะพันธ์ (Kukongviriyapan. 1979 : 6 - 21) ให้นารีพายน์ โกลบูลิน (refined globulin) ของแอนติวีนอมแก่พิษงูเห่าไทย มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี (Affinity chromatography) ที่ใช้เซฟาโรส (Sephrose) เป็นตัวค้ำจุน พบว่า แอนติบอดีที่จำเพาะ ที่ได้มีความสามารถในการทำลายพิษงูเห่าไทยเพิ่มขึ้นประมาณ 15 ถึง 17 เท่าของแอนติวีนอมแก่พิษงูเห่าไทย

### บทที่ 3

#### การดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมแอนติบอดีพิษงูทะเลจากแอนติบอดีพิษงูทะเลที่ได้จากม้า โดยการย่อยสลายด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Reynolds. 1985 : 1 - 2)

#### สารเคมี

1. แอนติบอดีพิษงูทะเลที่ได้จากม้า
2. เบปซิน
3. แอมโมเนียมซัลเฟต
4. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์
6. สารละลายคลอโรฟอร์ม ความเข้มข้น 0.25% พีเอช 6.8
7. โซเดียมคลอไรด์

#### อุปกรณ์

1. เครื่องอังน้ำ
2. เครื่องวัดพีเอช (Orion Research Digital pH/Millivolt Meter 611)
3. เครื่องเซนตริฟิวส์ (Centra - 7 R Refrigerated Centrifuge)
4. ถุงไดอะไลซิส (dialysis bag)
5. เครื่องคอนดัคโตมิเตอร์ (conductometer)

#### วิธีทดลอง

1. เจือจางแอนติบอดีพิษงูทะเลให้มีปริมาตร 3 เท่าด้วยน้ำกลั่น
2. ใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับสารละลายใน

ข้อ 1 ให้มีพีเอช 3.2

3. เติมเบปรีน 2.5 มิลลิกรัมต่อสารละลายในข้อ 2 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร  
 อนุสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องอั่งน้ำพร้อมเขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส  
 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในสารละลายในข้อ 3 โดยให้ความเข้มข้น 13%  
 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์  
 ปรับสารละลายให้มีพีเอช 4.3 อนุสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องอั่งน้ำพร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลา  
 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ปั่นสารละลายจากข้อ 4 ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส  
 เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายใส่ส่วนบนไว้
6. เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายใส่จากข้อ 5 โดยให้ความเข้มข้น 33%  
 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อนุสารละลายด้วยเครื่องอั่งน้ำพร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิ  
 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
7. ปั่นสารละลายจากข้อ 6 ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส  
 เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนที่ได้ไว้
8. ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น โดยให้สารละลายที่ได้มีปริมาตร เป็นครึ่งหนึ่งของ  
 ปริมาตรเข้รุ่มเริ่มต้น
9. ไคอะไลซ์ สารละลายจากข้อ 8 ด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม ความเข้มข้น  
 0.25% พีเอช 6.8 เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก โดยตรวจสอบค่าคอนดัคตีวิตี  
 (conductivity) ของสารละลายนอกถุงไคอะไลซ์ จนสารละลายมีค่าคอนดัคตีวิตีคงที่  
 จึงหยุดทำการไคอะไลซ์ เก็บสารละลายในถุงไคอะไลซ์ไว้
10. เติมโซเดียมคลอไรด์ลงในสารละลายที่ได้หลังจากทำไคอะไลซ์ โดยให้ความ  
 ความเข้มข้น 0.9% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ทำการทดลองต่อไปนี้
  - 10.1 ทับบีล อิมมูโนดิฟฟิวชัน
  - 10.2 คิส โพลีอะคริลลาไมด์ เจล อีเลคโตรฟอริซิส
  - 10.3 ตรวจสอบปริมาณโปรตีน

10.4 ความสามารถในการทำลายพิษงูทะเล

10.5 ความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด

10.6 ความสามารถในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

2. การเตรียมแอนติบอดีพิษงูทะเลจากแอนติบอดีพิษงูทะเลที่ได้จากม้า โดยวิธี  
เจล ฟิลเทรชัน

สารเคมี

1. แอนติบอดีพิษงูทะเลที่ได้จากม้า
2. เจล Sephacryl S - 300 Superfine
3. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ สาลีไนท์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 7.4

อุปกรณ์

1. คอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.6 เซนติเมตร ความยาว 70 เซนติเมตร
2. fractional collector
3. เครื่องมือวัดการดูดกลืนแสง (Beckman DU - 6 Spectrophotometer)

วิธีทดลอง

1. บรรจุส่วนผสม Sephacryl S - 300 Superfine (เจล Sephacryl S - 300 Superfine : สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ สาลีไนท์ = 2 : 3) ลงในคอลัมน์จนได้ความสูงของเจล 68 เซนติเมตร
2. ผ่านคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ สาลีไนท์ ประมาณ 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ที่ใช้
3. ผ่านคอลัมน์ด้วยสารละลาย blue dextran ความเข้มข้น 2% เพื่อหา void volume
4. ผ่านคอลัมน์ด้วยแอนติบอดีพิษงูทะเล 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วย fractional collector

5. นำสารละลายในแต่ละหลอดมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Beckman DU - 6 Spectrophotometer

6. รวบรวมสารละลายของแต่ละหลอดที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ใน peak โปรตีนเดียวกัน

7. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 5 มาตรวจสอบแอนติบอดี โดยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน (Double Immunodiffusion) เก็บสารละลายที่มีแอนติบอดีไว้ทำการทดลองต่อไป

7.1 ดิส โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

7.2 ตรวจสอบปริมาณโปรตีน

7.3 ความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะ

7.4 ความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด

7.5 ความสามารถในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

3. การตรวจสอบสารละลายที่ได้จากเจล ฟิเลเทรชัน โดยวิธีดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน

### สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมบิโทล ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พี เอช 8.2

โซเดียมบิโทล	47.6	กรัม
สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์	69	ลูกบาศก์เซนติเมตร
สารละลายโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 10%	4.2	ลูกบาศก์เซนติเมตร
เติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร	1,000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. ฝุ่น (โนเบิล เอการ์) ในสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมบิโทล ไฮโดรเจนคลอไรด์ จากข้อ 1 ความเข้มข้น 1.5%

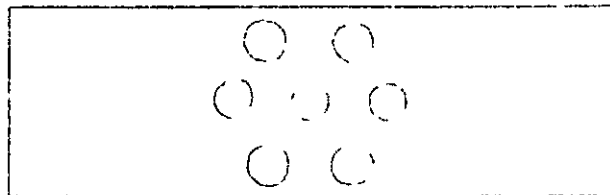
### อุปกรณ์

1. เครื่องดูดสูญญากาศ
2. แผ่นสไลด์ ขนาด 1 × 3 นิ้ว
3. กล้องที่อ้อมตัวด้วยไอน้ำ
4. บีเปตอัดโนมัตติ
5. โคมาสซี บลู
6. กรดอะซีติก

### วิธีทดลอง

1. หลอมวุ้นที่เตรียมไว้ให้มีสถานะเป็นของเหลว
2. ใช้บีเปตดูดวุ้น 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทลงบนแผ่นสไลด์ ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว
3. เจาะวุ้นให้เป็นหลุม (ภาพประกอบ 5) แล้วดูดวุ้นในหลุมออกด้วย

### เครื่องดูดสูญญากาศ



ภาพประกอบ 5 แสดงตำแหน่งของหลุมวุ้นที่เจาะสำหรับใช้ทดสอบดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน

4. หยดสารละลายของพิษงูกะปะที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ลงในหลุมกลาง ส่วนหลุมที่อยู่โดยรอบหยดด้วยสารละลายที่ได้จาก เจล ฟิลเตรชัน ด้วยบีเปตอัดโนมัตติ โดยให้ปริมาตรของสารในแต่ละหลุมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

5. เก็บแผ่นสไลด์ไว้ในกล้องที่อ้อมตัวด้วยไอน้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นสไลด์มาล้างโปรตีนส่วนที่เกินออกจาก วุ้นด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9% หลาย ๆ ครั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. ใช้กระดาษกรองเนื้อละเอียดปิดทับบนแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้เพื่อทำให้หุ่นแห้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. นำแผ่นสไลด์มาเชื่อมดู precipitin line ด้วยสารละลายโคมาสซี บลู : กรดอะซิติก (0.5% : 20%) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยสารละลาย กรดอะซิติก ความเข้มข้น 20% หลาย ๆ ครั้ง จนเห็นแถบสีน้ำเงินของ precipitin line

4. การวิเคราะห์แอนติเจนอิมมูโนแพ็ทเทิร์น โดยวิธี ดิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเลกโตรฟอริซิส (Davis. 1964 : 404 - 427)

#### สารเคมี

1. สารละลายอะคริลาไมด์ : บิส - อะคริลาไมด์ (30% : 0.8%, โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร)
2. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.9
3. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.7
4. สารละลาย เอ็น, เอ็น, เอ็น, เอ็น - เตตระเมทิลเอธิลีนไดเอมีน ความเข้มข้น 10%
5. สารละลาย แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 5%
6. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - โกลซีน พีเอช 8.3
7. โคมาสซี บลู
8. เมทานอล
9. กรดอะซิติก
10. สารตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย แอนติเจนอิมมูโนแพ็ทเทิร์น 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร โกลซีน 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.7 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายบรอมฟีนอล บลู ความเข้มข้น 0.01% 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร

## อุปกรณ์

1. หลอดนำก๊าซ ขนาด  $0.5 \times 13$  เซนติเมตร พร้อมจุกยางที่เจาะรูตรงกลาง-ฐานรอง และแผ่นพาราฟิล์ม
2. กล้องสำหรับใส่บัพเพอร์ ซึ่งมีลวดทลาคันติดต่อกันสำหรับนำไฟฟ้า
3. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

## วิธีทดลอง

1. เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายต่อไปนี้ลงใน suction flask  
สารละลายอะคริลาไมด์ : บิส - อะคริลาไมด์

(30% : 0.8%, โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายบัพเพอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์

ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.9 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายเอ็น, เอ็น, เอ็น, เอ็น -

เตตระเมทิลเอทิลีนไดเอมีน

ความเข้มข้น 10% 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

น้ำกลั่น

9.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร

นำไปคูดอากาศออก 2 - 3 นาที แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ความเข้มข้น 5% ลงไป 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน

2. ใช้ปิเปตคูดสารละลายเจลจากข้อ 1 บรรจุลงในหลอดนำก๊าซที่ปิดปลายด้านหนึ่งไว้ด้วยพาราฟิล์ม จนกระทั่งสารละลายในหลอดนำก๊าซมีความสูง 10 เซนติเมตร แล้วค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นปิดผิวหน้าเจล เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบเมื่อแข็งตัว ทิ้งเจลให้แข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที

3. เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายต่อไปนี้ลงในหลอดทดลอง

สารละลายอะครีลาไมด์ : บิส - อะครีลาไมด์ (30% : 0.8%, โดยน้ำหนักคือปริมาตร)	0.625	ลูกบาศก์เซนติเมตร
สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.7	1.25	ลูกบาศก์เซนติเมตร
สารละลายเอ็น, เอ็น, เอ็น, เอ็น - เตตระเมทิลเอธิลีนไดเอมีน ความเข้มข้น 10%	0.05	ลูกบาศก์เซนติเมตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 5%	0.02	ลูกบาศก์เซนติเมตร
น้ำกลั่น	3.055	ลูกบาศก์เซนติเมตร

เขย่าสารละลายให้เข้ากัน

4. เทน้ำออกจากเจลที่ได้จากข้อ 2 แล้วใช้ปิเปตดูดสารละลายจากข้อ 3 บรรจลงไปในความสูงของเจลเพิ่มขึ้นจากเดิม 0.5 เซนติเมตร ปิดผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย ทิ้งเจลให้แข็งตัว เป็นเวลา 30 นาที

5. | บรรจแต่งเจลลงในกล่องสำหรับใส่บัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - โกลซิน พีเอช 8.3 ลงในกล่องบนและล่างจนสารละลายบัฟเฟอร์ท่วมปลายแท่งเจลทั้ง 2 ซ้าง

6. หยอดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ประมาณ 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงบนหน้าเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 3 มิลลิแอมแปร์ต่อหนึ่งแท่งเจล โดยกำหนดให้ขั้วลบ อยู่ด้านบน

7. ตัดกระแสไฟฟ้าเมื่อแถบสีบรอมฟีนอลบลู เคลื่อนถึงระยะทางประมาณ 1 เซนติเมตร จากปลายล่างของแท่งเจล เอาเจลออกจากกล่องมาแช่ในอ่างน้ำเย็น แล้วใช้เข็มฉีดยาดูดน้ำเย็นเข้าไปไล่อะไรที่เหลือออกจากหลอด ใช้เข็มจิ้มที่ตำแหน่งสีบรอมฟีนอล บลู เพื่อเป็นเครื่องหมาย

8. นำเจลที่ได้ไปย้อมดูตำแหน่งโปรตีนด้วยสารละลาย โคมาสซี บลู : เมทานอล : กรดอะซิติก (1% : 50% : 10%) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยสารละลายเมทานอล : กรดอะซิติก (10% : 10%) หลาย ๆ ครั้ง จนเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนชัดเจน

9. บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายรูปเก็บไว้

5. การหาปริมาณโปรตีนในแอนติวีนอมแก่หิงงูกะปะ (Lowry. 1951 : 265 - 275)

#### สารเคมี

1. สารละลาย A : สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 2% ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
2. สารละลาย B : สารละลายคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.5% ในสารละลายโซเดียม โบแทสเซียม คาร์เตรต ความเข้มข้น 1%
3. สารละลาย C : ผสมสารละลาย A 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยสารละลาย B 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
4. สารละลาย D : ผสมฟีนอล รีเอเจนต์ 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 1 ส่วน
5. อัลบูมินจากเซรัมวัว (Bovine serum albumin)
6. แอนติวีนอมแก่หิงงูกะปะ
7. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9%

#### อุปกรณ์

เครื่องมือวัดการดูดกลืนแสง (Beckman DU - 6 Spectrophotometer)

### วิธีทดลอง

1. เตรียมสารละลายแอนติบอดีพิษงูกะปะในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9% โดยให้มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ในช่วงระหว่าง 25 ถึง 200 ไมโครกรัม ต่อ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. ใช้สารละลายจากข้อ 1 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นเติมด้วย สารละลาย C 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
3. เติมสารละลายที่ได้ด้วยสารละลาย D 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้ เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร
5. อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายจากข้อ 4 โดยเทียบจากกราฟของ สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (อัลบูมินจากเซรุ่มวัว) ที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0 - 200 ไมโครกรัมต่อ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร
6. การหาค่าแอลดี - 50 (LD<sub>50</sub>) ของพิษงูกะปะ

### สารเคมี

1. พิษงูกะปะแห้ง
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9%

### อุปกรณ์

1. หลอดฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยา ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. หนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ 18 กรัม

### วิธีทดลอง

1. เตรียมสารละลายพิษงูกะปะในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9% โดยให้สารละลายมีความเข้มข้นของพิษงู 500 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
2. นำสารละลายจากข้อ 1 มาเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นระหว่าง 200 - 500 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
3. ใช้สารละลายในข้อ 2 ฉีดหนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ 18 กรัม โดยใช้หนู 5 ตัวต่อ 1 สารละลาย หนูแต่ละตัวจะถูกฉีด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เข้าทางเส้นเลือดดำที่หาง
4. บันทึกจำนวนหนูที่ตายของแต่ละสารละลาย หลังจาก 24 ชั่วโมง
5. จากผลการทดลองที่ได้ คำนวณค่า แอลดี - 50 ตามวิธีของ Karber ได้ดังนี้

$$m = x_s - d \left( s_1 - \frac{1}{2} \right)$$

เมื่อ	$m$	คือ $\log$ แอลดี - 50
	$x_s$	คือ $\log$ ของขนาดพิษงูที่เริ่มทำให้หนูขาวตาย 100%
	$d$	คือ $\log$ ของค่าคงที่ของการหารระหว่างขนาดพิษงู
	$s_1$	คือ ผลรวมของ response ratio

### 7. การหาค่าความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะของแอนติเวินอม

#### สารเคมี

1. พิษงูกะปะแห้ง
2. แอนติเวินอมแก่พิษงูกะปะ
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9%

สารเคมี

1. พิษงูพิษร้ายแรง
2. 110 มล. 1 ลิตร แอนติเวเนอแมกซ์พิษงูพิษร้ายแรง
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9%

อุปกรณ์

1. หลอดฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยา ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. หนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ 18 กรัม

วิธีทดลอง

1. เตรียมสารละลายพิษงูพิษร้ายแรงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9% โดยให้สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นของพิษงูต่าง ๆ กัน
2. เตรียมแอนติเวเนอแมกซ์พิษงูพิษร้ายแรง ให้มีความเข้มข้นพอเหมาะกับความเข้มข้นของพิษงูในข้อ 1
3. ผสมสารละลายจากข้อ 1 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร กับสารละลายจากข้อ 2 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
4. ใช้สารละลายจากข้อ 3 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ฉีดหนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ 18 กรัม จำนวน 5 ตัวต่อ 1 สารละลาย โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หาง
5. บันทึกจำนวนหนูที่ตายของแต่ละสารละลาย หลังจาก 24 ชั่วโมง
6. จากผลการทดลองที่ได้ คำนวณค่าแอลดี - 50 ตามวิธีของ Karber
7. คำนวณค่าความสามารถในการทำลายพิษงูพิษร้ายแรงได้จากสูตร

$$SNC = \frac{LD_{50}}{A \times LD_{50}}$$

เมื่อ SNC คือ ความสามารถในการทำลายพิษงูพิษร้ายแรง (Specific Neutralizing Capacity) มีหน่วยเป็นจำนวนแอลดี - 50 ต่อแอนติเวเนอแมกซ์พิษงูพิษร้ายแรง 1 มิลลิกรัม

LD<sub>50</sub> แอลดี - 50 ของพิษงูพิษร้ายแรง มีหน่วยเป็นไมโครกรัม

- LD<sub>50</sub> แอลดี - 50 ของพิษงูกะปะหลังจากผสมด้วยแอนติวีนอม  
 แก่พิษงูกะปะมีหน่วยเป็นไมโครกรัม
- A ปริมาณโปรตีนของแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่ใช้ฉีดหนู 1 ตัว  
 มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม

#### 8. การหาค่าความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดของแอนติวีนอม

##### สารเคมี

1. พิษงูกะปะแห้ง
2. แอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะ
3. สารละลายโซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น 3.8%
4. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์
5. เลือดคนปกติ (citrated blood)

##### อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 10 × 100 มิลลิเมตร
2. ลวดแพลตินัม (platinum wire)

##### วิธีทดลอง

1. บั่นเลือดคนปกติ (citrated blood) ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที  
เป็นเวลา 10 นาที เก็บพลาสมาไว้
2. เตรียมแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน
3. เตรียมสารละลายพิษงูกะปะในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9%  
โดยให้สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

4. ผสมสารละลายจากข้อ 2 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรกับสารละลายจากข้อ 3 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน อุ่นสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

5. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4 ผสมกับพลาสมาจากข้อ 1 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในหลอดทดลองขนาด 10 × 100 มิลลิเมตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ลงไป 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เริ่มจับเวลาของการแข็งตัวของเลือด โดยใช้ลวดพลาตินัม จุ่มทุก ๆ 10 วินาที จนสังเกตเห็น เส้นใยติดลวดพลาตินัมขึ้นมา จึงจับเวลาได้ทันที

6. เขียนกราฟระหว่างเวลาในการแข็งตัวของเลือดกับปริมาณแอนติวีนอมที่ใช้

#### 9. การตรวจสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพินูภาวะปะ

##### สารเคมี

1. พินูภาวะปะแห้ง
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9%
3. เลือดคนปกติ (citrated blood)

##### อุปกรณ์

1. เครื่องเซนตริฟิวจ์ (Centra - 7 R Refrigerated Centrifuge)
2. เครื่องมือวัดการดูดกลืนแสง (Beckman DU - 6 Spectrophotometer)

##### วิธีทดลอง

1. ปั่นเลือดคนปกติ (citrated blood) ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเม็ดเลือดแดงไว้ ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3 ครั้ง
2. นำเม็ดเลือดแดงจากข้อ 1 มาเตรียมสารแขวนลอยของเม็ดเลือดแดงโดยให้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง 2% ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9%

3. บั๊นสารแขวนลอยของเม็ดเลือดแดงจากข้อ 2 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเม็ดเลือดแดงไว้ เติมน้ำกลั่น
- 4 ลูกบาศก์เซนติเมตรลงในเม็ดเลือดแดง แล้วนำไปอุ่นด้วยเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กำหนดให้สารละลายที่ได้นี้เป็น 100% การแตกของเม็ดเลือดแดง
4. เตรียมสารละลายพิฆูกะปะ ความเข้มข้น 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
5. ผสมสารแขวนลอยของเม็ดเลือดแดงจากข้อ 2 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยสารละลายจากข้อ 4 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. บั๊นสารละลายจากข้อ 3 และ 5 ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูคของเหลวใสส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร
7. จากค่าการดูดกลืนแสง คำนวณ% การแตกของเม็ดเลือดแดงของสารละลายจากข้อ 5

ผลการทดลอง

1. การเตรียมแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะจากแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่ได้จากม้า โดยการย่อยสลายด้วยเปปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

แอนติวีนอมที่เตรียมได้โดยวิธีนี้มี % yield 47.79% (ตาราง 9) จากการตรวจสอบโดยวิธีดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่า แอนติวีนอมที่ได้ให้ precipitin line กับพิษงูกะปะ (ภาพประกอบ 7) เมื่อวิเคราะห์แอนติวีนอมที่ได้โดยใช้วิธี คิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเลคโตรฟอริสิส พบว่า ปรากฏแถบโปรตีนบนแท่งเจลเฉพาะที่ตำแหน่งโกลบูลินเท่านั้น (ภาพประกอบ 8)

2. การเตรียมแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะจากแอนติวีนอมแก่พิษงูกะปะที่ได้จากม้า โดยวิธี เจล ฟิลเตรชัน

จากการตรวจสอบสารละลายที่ได้จาก เจล ฟิลเตรชัน โดยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่าสารละลายที่ได้จากพีค F2 (ภาพประกอบ 6) ให้ precipitin line กับพิษงูกะปะ (ภาพประกอบ 7) แสดงว่าสารละลายจาก พีค F2 มีแอนติบอดีต่อพิษงูกะปะ นอกจากนี้ยังพบว่า แอนติวีนอมที่เตรียมได้โดยวิธีนี้มี % yield 43.51 (ตาราง 9) และเมื่อวิเคราะห์แอนติวีนอมที่ได้โดยวิธี คิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเลคโตรฟอริสิส พบว่า ปรากฏแถบโปรตีนบนแท่งเจลที่ตำแหน่งโกลบูลิน และอัลบูลิน (ภาพประกอบ 8)

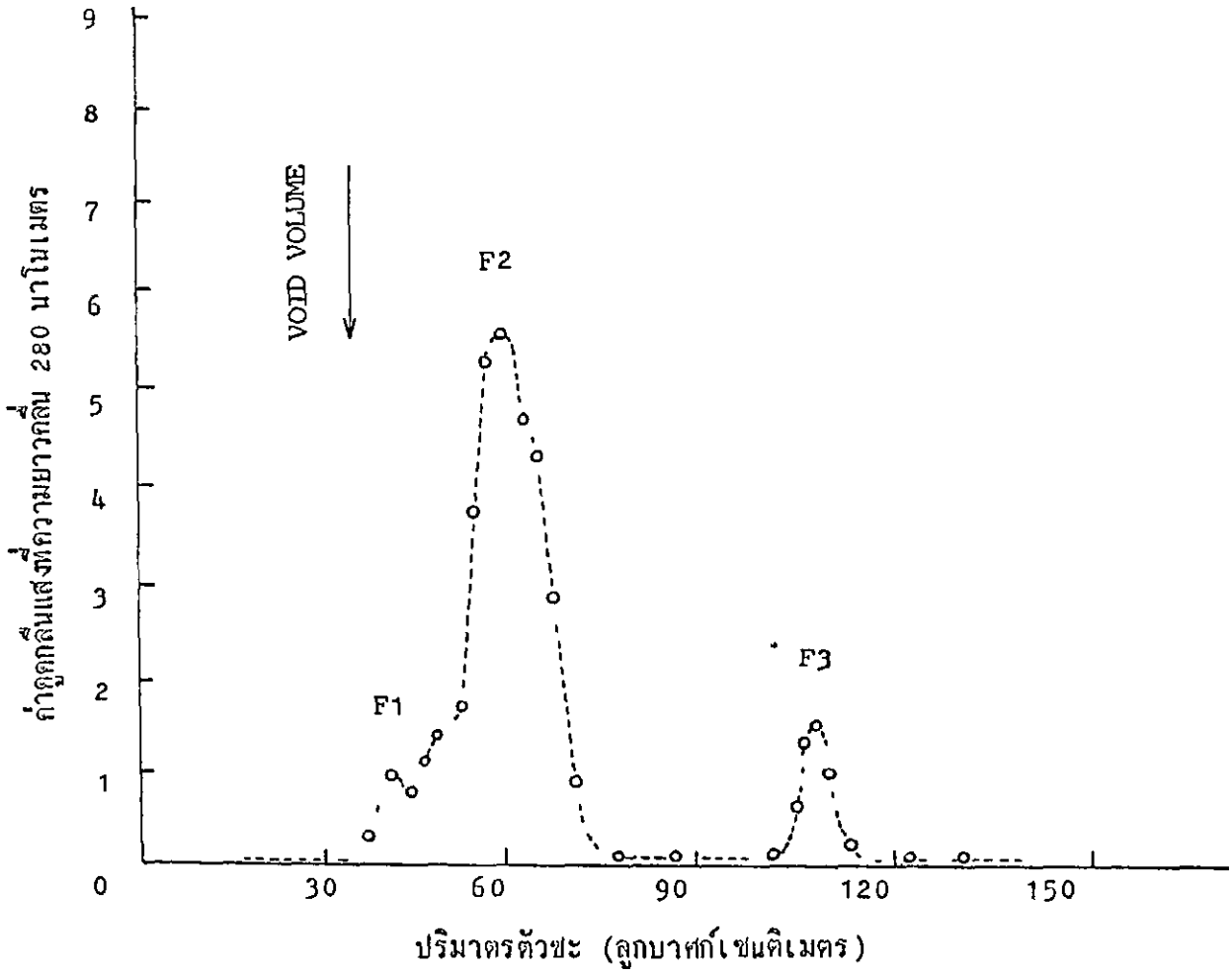
3. ความสามารถในการทำละลายพิษงูกะปะของแอนติวีนอม

จากการศึกษาความสามารถในการทำละลายพิษงูกะปะของแอนติวีนอมโดยใช้พิษงูกะปะที่มีค่าแอลดี - 50 เท่ากับ 174.7 ไมโครกรัมต่อหนูขาวที่มีน้ำหนัก 18 กรัม (ตาราง 2) พบว่า แอนติวีนอมที่ได้จากม้ามีความสามารถในการทำละลายพิษงูกะปะ 0.05 แอลดี - 50 ต่อแอนติวีนอม 1 มิลลิกรัม (ตาราง 3 และ 9) สำหรับแอนติวีนอมที่เตรียมได้จากการย่อยสลาย

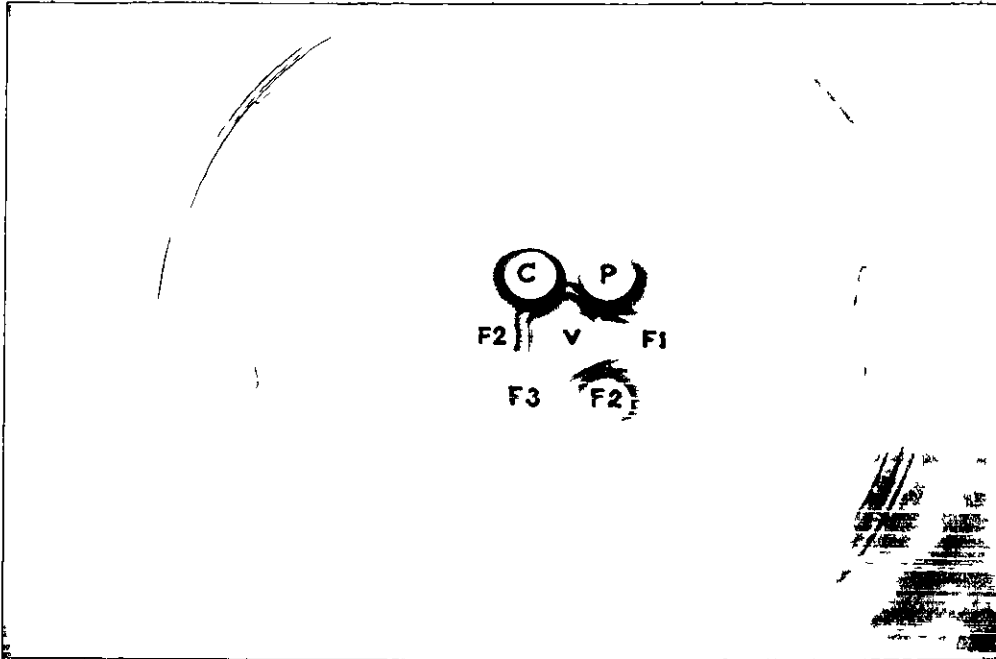
ด้วยเบนซิน แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต มีความสามารถในการทำลายพิษงูปะ  
 0.39 แอลดี - 50 ต่อแอนติวีนอม 1 มิลลิกรัม หรือประมาณ 7.8 เท่าของแอนติวีนอมที่ได้  
 จากม้า (ตาราง 4 และ 9) และแอนติวีนอมที่เตรียมได้จาก เจล ฟิลเตรชัน มีความสามารถ  
 ในการทำลายพิษงูปะ 0.07 แอลดี - 50 ต่อแอนติวีนอม 1 มิลลิกรัม หรือประมาณ 1.4 เท่า  
 ของแอนติวีนอมที่ได้จากม้า (ตาราง 5 และ 9)

#### 4. ความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดของแอนติวีนอม

แอนติวีนอมที่ได้จากม้ามีความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ  
 0.03 แอลดี - 50 ต่อแอนติวีนอม 1 มิลลิกรัม ส่วนแอนติวีนอมที่เตรียมได้จากการย่อยสลาย  
 ด้วยเบนซิน แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และแอนติวีนอมที่เตรียมได้จาก  
 เจล ฟิลเตรชัน มีความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 0.14 แอลดี - 50  
 และ 0.09 แอลดี - 50 ต่อแอนติวีนอม 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ หรือสูงกว่าความสามารถ  
 ในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดของแอนติวีนอมที่ได้จากม้า 4.7 และ 3.0 เท่า ตามลำดับ  
 (ตาราง 9)



ภาพประกอบ 6 แสดงพีคโปรตีนที่ได้จากการผ่านแอนติวีนอมที่ได้จากมี้า 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ขนาด 1.6 x 68 เซนติเมตร ชะด้วยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ สาลีไน้ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 7.4



ภาพประกอบ 7 แสดง precipitin line ที่ได้จากการทดสอบสารละลายจาก

เจล ฟิลเตรชัน โดยวิธี ดับเบิล วิมมูโนดิฟฟิวชัน

V : สารละลายพิษงูทะเล

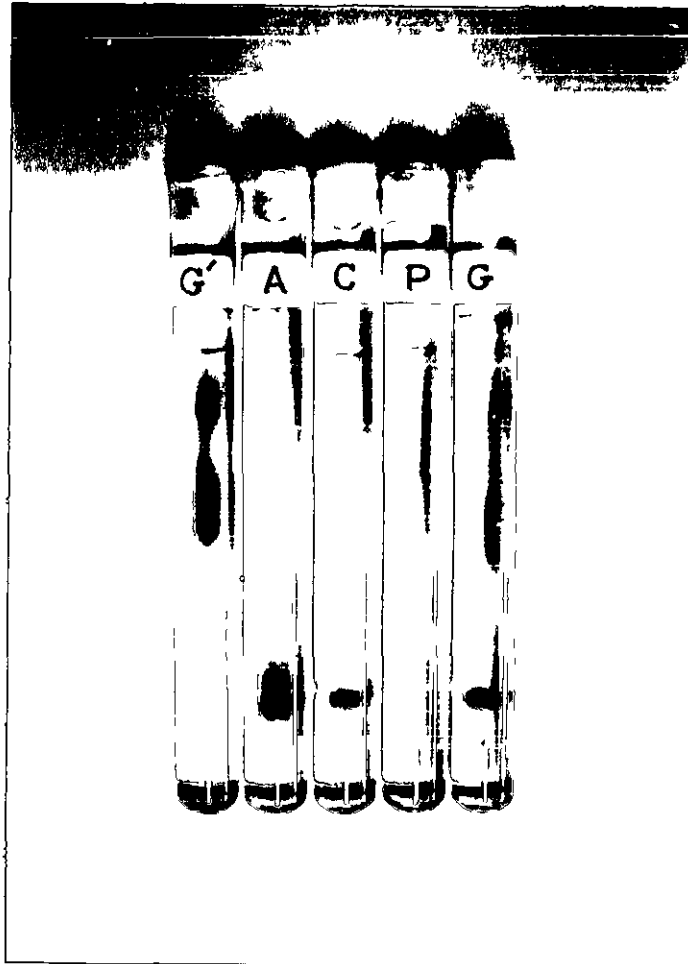
C : แอนติเจนที่ได้จากม้า

P : แอนติเจนที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเปปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

F1 : ฟิคโปรตีนที่ 1 จาก เจล ฟิลเตรชัน

F2 : ฟิคโปรตีนที่ 2 จาก เจล ฟิลเตรชัน

F3 : ฟิคโปรตีนที่ 3 จาก เจล ฟิลเตรชัน



ภาพประกอบ 8 แสดงโปรตีนไบเซรุ่มของแอนติวีนอมที่ถูกแยกออกจากกันโดยดิส โพลีอะครีลาไมด์

เจล อีเลคโตรโฟรีซิส

G' : โกลบูลินของม้า (Horse Globulin) (Kabat, Elvin A. and Mayer, Manfred M. 1961 : 756 - 757)

A : อัลบูมินของม้า (Horse Albumin) (Kabat, Elvin A. and Mayer, Manfred M. 1961 : 756 - 757)

C : แอนติวีนอมที่ได้จากม้า

P : แอนติวีนอมที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเปปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

G : แอนติวีนอมที่ได้จาก เจล ฟิลเตรชัน

ตาราง 2 ค่าแอลดี - 50 ของพิษงูกะปะ

ขนาดพิษงูต่อ หนูขาว 1 ตัว (ไมโครกรัม)	ครั้งที่ 1 จำนวนหนู ที่ตาย (ตัว)	ครั้งที่ 2 จำนวนหนู ที่ตาย (ตัว)	ครั้งที่ 3 จำนวนหนู ที่ตาย (ตัว)	ครั้งที่ 4 จำนวนหนู ที่ตาย (ตัว)	ครั้งที่ 5 จำนวนหนู ที่ตาย (ตัว)
247.68	4	4	5	5	5
221.14	5	5	4	5	5
197.44	4	4	3	3	3
176.28	3	1	1	1	5
156.25	2	3	1	1	1
140.00	2	0	0	0	1
125.00	0	0	0	0	0
แอลดี - 50	162.817	174.293	190.827	186.552	159.191
แอลดี - 50 เฉลี่ย	174.7 ไมโครกรัมต่อหนูขาวหนัก 18 กรัม				

ตาราง 3 ความสามารถในการทำลายพิษงูปะของแอนติเวโนมที่ได้จากม้า

ปริมาณแอนติเวโนม ที่มีความเข้มข้น 130 มิลลิกรัมต่อ ลูกบาศก์เซนติเมตร (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรสารละลาย พิษงู (ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ความเข้มข้นของ สารละลายพิษงู (ไมโครกรัมต่อ ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ปริมาตรสารละลาย พิษงู (ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ขนาดพิษงูต่อหนู (ไมโครกรัม)	จำนวนหนูที่ตาย (ตัว)	
					1	2
1	1	2500	0.3	375	5	5
1	1	1250	0.3	187.5	3	3
1	1	625	0.3	93.75	0	0
1	1	312.5	0.3	46.875	0	0
1	1	156.25	0.3	23.4375	0	0
1	1	78.125	0.3	11.7187	0	0
แอลดี - 50' ความสามารถในการทำลายพิษงูปะ					174.94 ไมโครกรัมต่อหนูขาวที่มีน้ำหนัก 13 กรัม 0.05 แอลดี - 50 ต่อแอนติเวโนม 1 มิลลิกรัม	

ตาราง 4 ความสามารถในการทำลายพิษงูของแอนติเวโนมที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเบซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

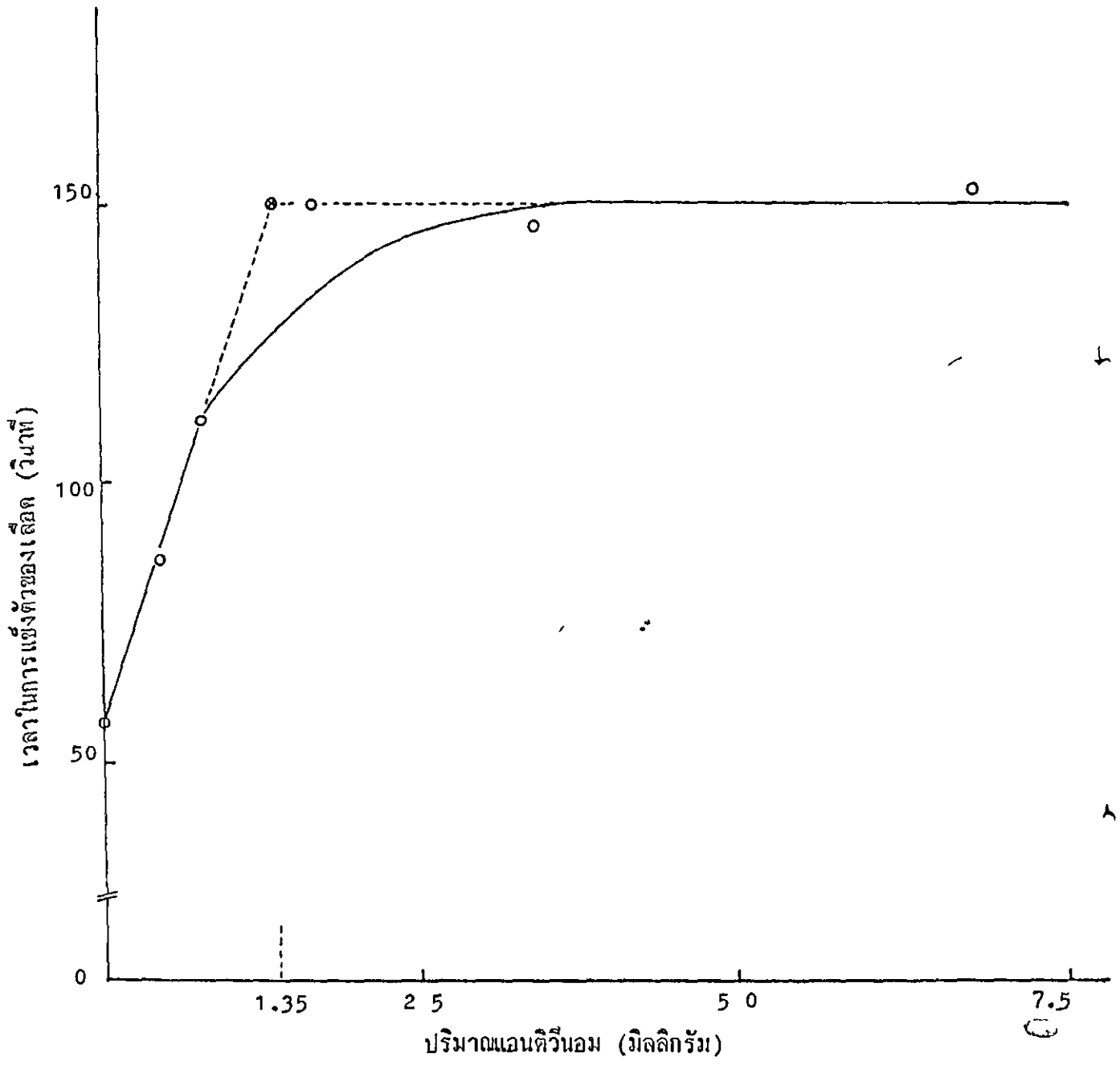
ปริมาณแอนติเวโนม ที่มีความเข้มข้น 48.375 มิลลิกรัม ต่อลูกบาศก์เซนติ เมตร (ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ปริมาตรสารละลาย พิษงู (ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ความเข้มข้นของ สารละลายพิษงู (ไมโครกรัมต่อ ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ปริมาณสารละลาย ที่ฉีดพิษงู (ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ขนาดพิษงูต่อหนู (ไมโครกรัม)	จำนวนหนูที่ตาย (ตัว)	
					1	2
1	1	5000	0.3	750	5	5
1	1	2500	0.3	375	1	0
1	1	1250	0.3	187.5	0	0
1	1	625	0.3	93.75	0	0
1	1	312.5	0.3	46.875	0	0
1	1	156.25	0.3	23.4375	0	0
แอนติ - 50'		495.9	ไมโครกรัมต่อหนูขาวที่ฉีดน้ำหนัก 18 กรัม			
ความสามารถในการทำลายพิษงูปะ		0.39	แอนติ - 50 ต่อแอนติเวโนม 1 มิลลิกรัม			

ตาราง 5 ความสามารถในการทำลายพิษงูของแอนติเวโนมที่ได้จากเจด พิลเทรชัน

ปริมาณแอนติเวโนม ที่มีความเข้มข้น 92 มิลลิกรัมต่อ ลูกบาศก์เซนติเมตร (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรสารละลาย พิษงู (ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ความเข้มข้นของ สารละลายพิษงู (ไมโครกรัมต่อ ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ปริมาตรสารละลาย พิษงู (ลูกบาศก์- เซนติเมตร)	ขนาดพิษงูต่อหนู (ไมโครกรัม)	จำนวนหนูที่ตาย (ตัว)	
					1	2
1	1	4000	0.3	600	5	5
1	1	2000	0.3	300	4	4
1	1	1000	0.3	150	2	2
1	1	500	0.3	75	0	0
1	1	250	0.3	37.5	0	0
1	1	125	0.3	18.75	0	0
แอลดี - 50		184.67 ไมโครกรัมต่อหนูมีน้ำหนัก 18 กรัม				
ความสามารถในการทำลายพิษงูปะ		0.07 แอลดี - 50 ต่อแอนติเวโนม 1 มิลลิกรัม				

ตาราง 6 แสดงผลของแอนติบอดีเพียงอย่างเดียวที่ได้จากส่วในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดที่เกิดจากพิษงูพิษ

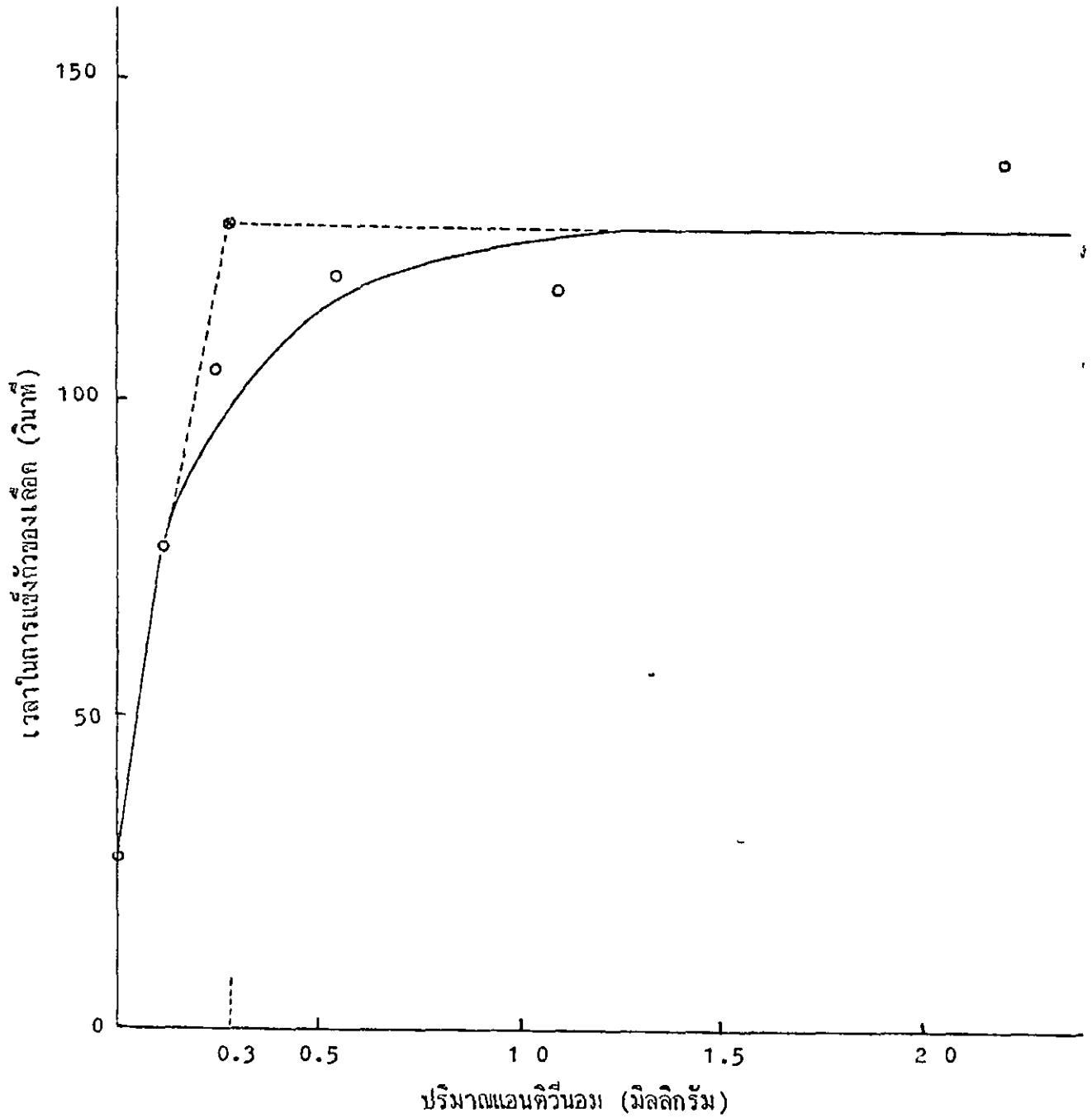
ความเข้มข้นสารละลายพิษงู (ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรสารละลายพิษงู (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ความเข้มข้นแอนติบอดี (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรแอนติบอดี (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรพลาสมา (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	เวลาในการแข็งตัวของเลือด (วินาที)			เวลาเฉลี่ย (วินาที)
					ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
150	0.05	137.5	0.05	0.2	180	170	150	166.6
150	0.05	68.75	0.05	0.2	145	150	140	145
150	0.05	34.37	0.05	0.2	150	155	145	150
150	0.05	17.18	0.05	0.2	135	75	140	116.6
150	0.05	8.59	0.05	0.2	50	105	95	83.3
75	0.1	0	0	0.2	60	60	55	58.3
blank (ใช้สารละลายไซโตลิมคอลลอยด์ความเข้มข้น 0.9%)					150	135	165	150



ภาพประกอบ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลาในการแข็งตัวของเลือดกับปริมาณแอนติวีนอม  
ที่ได้จากมี้า

ตาราง 7 แสดงผลของแอนติบอดีพิษงูอะที่ได้จาก การย่อยสลายด้วยเบบซินแล้วสกัดออกมาในเมียมัสลเพทีในการยับยั้งการ  
แข็งตัวของเลือดที่เกิดจากพิษงูอะ

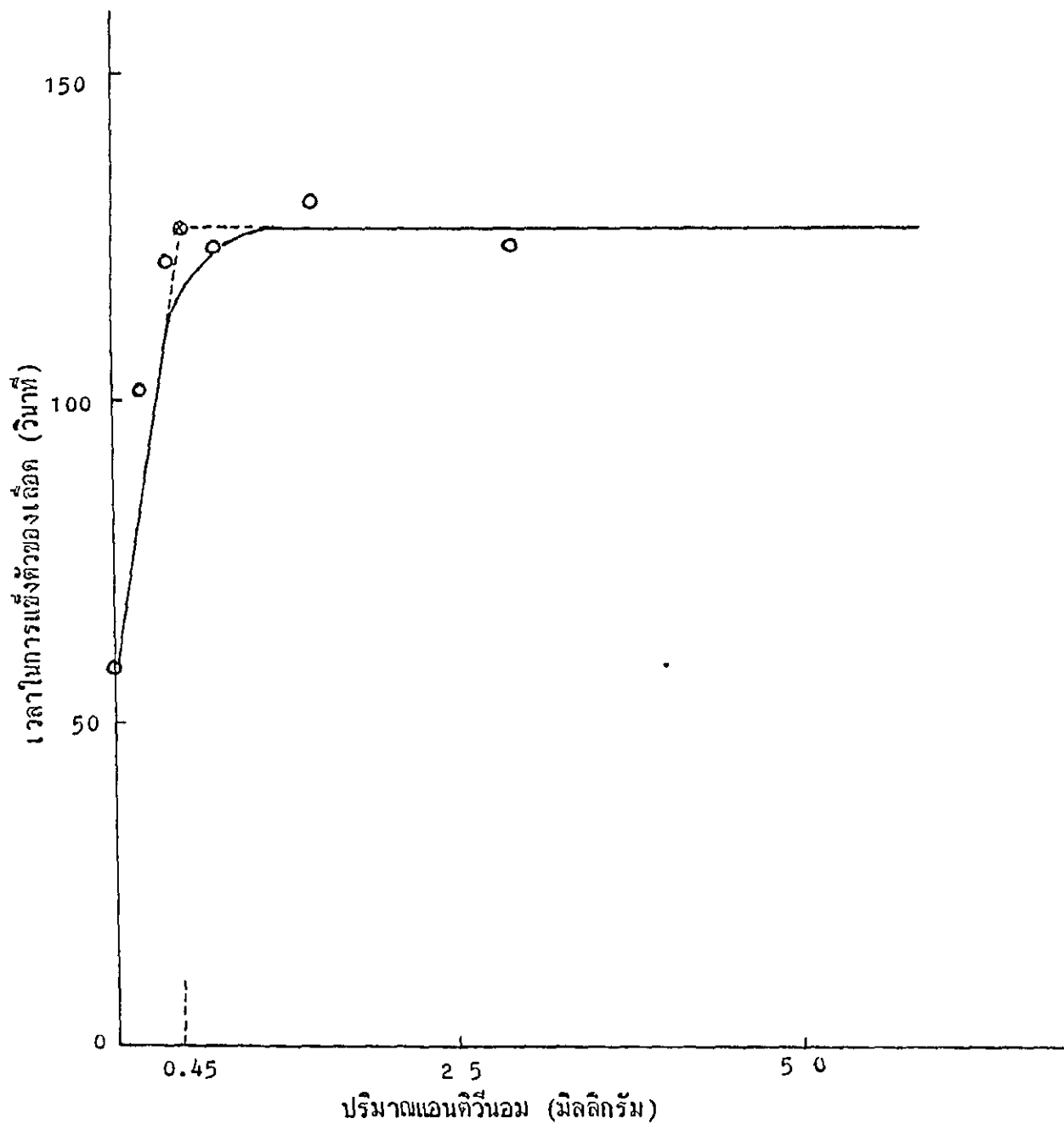
ความเข้มข้นสารละลายพิษงู (ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร)	ปริมาณสารละลายพิษงู (ลูกบาศก์ เซนติเมตร)	ความเข้มข้นแอนติบอดี (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร)	ปริมาณแอนติบอดี (ลูกบาศก์ เซนติเมตร)	ปริมาณทรพลาสมา (ลูกบาศก์ เซนติเมตร)	เวลาในการแข็งตัวของเลือด (วินาที)			เวลาเฉลี่ย (วินาที)
					ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
150	0.05	45	0.05	0.2	145	130	140	138.6
150	0.05	22.5	0.05	0.2	125	120	110	118.3
150	0.05	11.25	0.05	0.2	125	115	120	120
150	0.05	5.12	0.05	0.2	80	95	90	88.3
150	0.05	2.56	0.05	0.2	50	70	70	76.6
75	0.1	0	0	0.2	25	30	28	27.6
Blank (ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9%)					120	130	150	113.3



ภาพประกอบ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการแข็งตัวของเลือดกับปริมาณแอนติบีนอม  
 ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเปปซิน แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ตาราง 8 แสดงผลของแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้น ในการยับยั้งการเจริญตัวของเชื้อที่เกิดจากพิษงูประ

ความเข้มข้นสารละลายพิษ (ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรสารละลายพิษ (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ความเข้มข้นแอนติบอดี (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรแอนติบอดี (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรพลาสมา (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	เวลาในการเข้าถึงของเลือด (วินาที)			เวลาเฉลี่ย (วินาที)
					ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
150	0.05	60	0.05	0.2	125	125	120	123.3
150	0.05	30	0.05	0.2	120	150	120	130
150	0.05	15	0.05	0.2	120	125	125	123.3
150	0.05	7.5	0.05	0.2	115	110	135	121.6
150	0.05	3.75	0.05	0.2	90	110	105	101.6
75	0.1	0	0	0.2	60	60	55	58.3
Blank (ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9%)					180	165	173	172.6



ภาพประกอบ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการแข็งตัวของเลือดกับปริมาณแอนติวีนอม  
ที่ได้จากเจล ทิลเตรชั่น

ตาราง 9 เปรียบเทียบแอนติบอดีที่ได้ออกมาจากการพัฒนาโดยวิธี เจล ฟิลเทรชัน และ วิธีการย่อยสลายด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วย

เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

	ปริมาณแอนติบอดี* (กรัม)	% yield แอนติบอดี หลังผ่านชั้น คอลัมน์พัฒนา คุณภาพ	ความสามารถใน การทำลายพิษงู ภาวะ (จำนวน แอลดี-50 ต่อ แอนติบอดี 1 มิลลิกรัม)	ความสามารถใน การทำลายพิษงู ภาวะสัมพัทธ์	ความสามารถใน การยับยั้งการ แข็งตัวของ เลือด (จำนวน แอลดี-50 ต่อ แอนติบอดี 1 มิลลิกรัม)	ความสามารถใน การยับยั้งการ แข็งตัวของ เลือดสัมพัทธ์
แอนติบอดีจากน้ำ	1.36	100	0.05	1.0	0.03	1.0
แอนติบอดีจาก เจล ฟิลเทรชัน	0.59	43.51	0.07	1.4	0.09	3.0
แอนติบอดีจากวิธีการย่อยสลาย ด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วย เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	0.65	47.79	0.39	7.8	0.14	4.7

\* ปริมาณแอนติบอดี หมายถึง ปริมาณแอนติบอดีที่เตรียมได้ โดยใส่แอนติบอดีจากน้ำเป็นแอนติบอดีเริ่มต้น

ตาราง 10 แสดงผลการตรวจสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูกะปะ

ความเข้มข้นสารละลายพิษงู (ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรสารละลายพิษงู (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาตรสารแขวนลอยของเม็ดเลือดแดง (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร	% การแตกของเม็ดเลือดแดง
125	1	3	0.011	0.00
250	1	3	0.010	0.00
500	1	3	0.007	0.00
1,000	1	3	0.012	0.00
blank (ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9%)			0.000	0.00
100% การแตกของเม็ดเลือดแดง			3.212	100.00

จากผลการตรวจสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูกะปะ โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายพิษงูจาก 125 - 1,000 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่า สารละลายพิษงูกะปะไม่มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

สรุป อภิปรายผล และข้อ เสนอแนะ

บทย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำแอนติเวโนมที่ได้จากม้า (crude antivenom) มาทำการเตรียมแอนติเวโนมโดยวิธีการ 2 วิธี วิธีที่หนึ่ง เตรียมแอนติเวโนมโดยวิธีการย่อยสลายด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต วิธีที่สอง เตรียมแอนติเวโนมโดยวิธีการเจล ฟิลเทรชัน จากนั้นทำการวิเคราะห์แอนติเวโนมที่ได้โดยวิธี ทับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน ดิส โพลีอะครีลาไมด์ เจล อีเลกโตรฟอริซิส และศึกษาคุณสมบัติของแอนติเวโนมที่ได้ เช่น ความสามารถในการทำลายพิษงูปะ ความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

1. แอนติเวโนมที่เตรียมโดยวิธีการย่อยสลายด้วยเบปซิน แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เรียกแอนติเวโนมที่เตรียมขึ้นโดยวิธีนี้ว่า เอฟ เอบี ไพร์ม - 2 หรือ รีพวยน์ โกลบูลินโดยใช้เบปซินย่อย ไอ จี จี เพื่อตัดส่วน เอฟ ซี แล้วแยกโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้อง กับภูมิคุ้มกันโรคออกโดยการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 13% หลังจากนั้นตกตะกอน เอฟ เอบี ไพร์ม - 2 ด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 33% เอฟ เอบี ไพร์ม - 2 ที่ได้ต้องนำไปกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยการไดอะไลซ์ แอนติเวโนมที่ได้พบว่า % yield ประมาณ 47.79% ของแอนติเวโนมเริ่มต้น (ตาราง 9)

จากการศึกษาคุณสมบัติ พบว่า แอนติเวโนม 1 มิลลิกรัม สามารถทำลายพิษงูปะได้ 0.39 แอลดี - 50 (ตาราง 4 และ 9) และสามารถยับยั้งการแข็งตัวของเลือดที่เกิดจากพิษงูปะ 0.14 แอลดี - 50 (ตาราง 9)

จากดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่า แอนติเวโนมที่ได้ให้ precipitation line กับพิษงูปะ และเมื่อวิเคราะห์แอนติเวโนมโดยวิธี ดิส โพลีอะครีลาไมด์ เจล อีเลกโตรฟอริซิส พบว่า ปรากรูแถบโปรตีนบนแท่งเจล เฉพาะตำแหน่งของโกลบูลินเท่านั้น (ภาพประกอบ 8)

แสดงว่า แอนติเวินอมที่ได้ไม่มีอัลบูมินรวมอยู่ ดังนั้นข้อดีของการเตรียมแอนติเวินอมโดยการย่อยสลายด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต คือ สามารถเตรียมแอนติเวินอมที่ปราศจากอัลบูมิน

## 2. แอนติเวินอมที่เตรียมโดยวิธีการ เจล ฟิลเตรชัน ใช้คอลัมน์ที่มีขนาด

1.6 × 68 เซนติเมตร บรรจุด้วยเซพาคริล เอส - 300 สามารถผ่านสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ได้อย่างมากครั้งละ 4 ลูกบาศก์เซนติเมตรหรือสารมีปริมาตรประมาณ 1 - 5% ของ bed volume (Pharmacia. 1982 : 40) ในการเตรียมแอนติเวินอมโดยวิธีนี้ จึงต้องใช้เวลานานพอสมควร เพราะสามารถผ่านแอนติเวินอมที่ได้จากม้าลงในคอลัมน์ได้คราวละน้อย ๆ รวบรวมสารละลายที่ชะออกจากคอลัมน์ได้ 3 ส่วน (ภาพประกอบ 9) แต่ละส่วนมีความเข้มข้นของโปรตีนต่ำ จึงต้องทำให้สารละลายมีความเข้มข้นของโปรตีนสูงขึ้น โดยใช้โพลีเอธิลีน ไกลคอล เมื่อตรวจสอบสารละลายที่ได้จาก เฟค F2 จะให้ precipitin line กับพิษงูกะปะ แสดงว่าสารละลายดังกล่าวมีแอนติบอดีต่อพิษงูกะปะ แอนติเวินอมที่ได้พบว่ามี % yield ประมาณ 43.51% ของแอนติเวินอมเริ่มต้น

จากการศึกษาคุณสมบัติ พบว่า แอนติเวินอม 1 มิลลิกรัม สามารถทำลายพิษงูกะปะ 0.07 แอลดี - 50 (ตาราง 5 และ 9) และสามารถยับยั้งการแข็งตัวของเลือดที่เกิดจากพิษงูกะปะ 0.09 แอลดี - 50 (ตาราง 9)

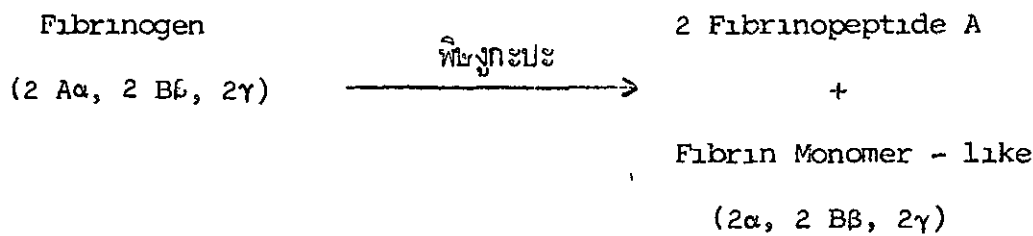
เมื่อวิเคราะห์แอนติเวินอมที่เตรียมได้โดยวิธี ดิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเลกโตรโฟรีซิส พบว่า ปรากฏแถบโปรตีนบนแท่งเจลตรงตำแหน่งโกลบูลิน และอัลบูมิน (ภาพประกอบ 8) แสดงว่าแอนติเวินอมที่ได้นอกจากจะมีโกลบูลินตามต้องการแล้ว ยังมีอัลบูมินรวมอยู่ด้วยค่อนข้างมาก ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะแอนติเวินอมตั้งต้นที่ได้จากม้าเป็นแอนติเวินอมที่ทำแห้ง (lyophilized antivenom) อัลบูมินที่อยู่ในแอนติเวินอมเกิดการรวมตัวเป็นโมเลกุลใหญ่ขึ้น เป็นไดเมอร์หรือไตรเมอร์ ทำให้อัลบูมินมีขนาดใกล้เคียงกับโกลบูลิน อัลบูมินจึงถูกชะออกมาพร้อม ๆ กับโกลบูลิน

3. ในการเตรียมแอนติเวินอมโดยวิธีทั้ง 2 ดังกล่าวข้างต้น มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ได้แอนติเวินอมที่ปราศจากโปรตีนที่ไม่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันโรคหรือโปรตีนที่ไม่มีความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะ เช่น อัลบูมิน และจากการวิเคราะห์ โดยวิธี ดิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเลกโตรโฟรีซิส พบว่า แอนติเวินอมที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเบปซิน แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ปราศจากอัลบูมิน ดังนั้นแอนติวีนอมที่ได้ดังกล่าวจึงมีความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะ และความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดสูงกว่าเมื่อเทียบกับแอนติวีนอมที่ได้จาก เจล พิลเตรชัน

เมื่อพิจารณาวิธีการหั่งลอง จะเห็นได้ว่า แอนติวีนอมที่เตรียมได้จากการย่อยสลาย ด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ประหยัดเวลา และสามารถเตรียม แอนติวีนอมได้คราวละมาก ๆ รวมทั้งแอนติวีนอมที่ได้ก็ปราศจากอัลบูมินที่ไม่ต้องการอีกด้วย

4. พิษงูกะปะทำให้เกิดความผิดปกติโดยออกฤทธิ์เร่งการแข็งตัวของเลือด กล่าวคือ พิษงูกะปะไปสลายไฟบริโนเจนที่สาย เอ  $\alpha$  ให้ไฟบริโนเบปไทด์ เอ 2 สาย แยกออกจาก โมโนเมอร์ (ภาพประกอบ 12)



ภาพประกอบ 12 พิษงูกะปะสลายไฟบริโนเจนที่สาย เอ  $\alpha$

ไฟบริน โมโนเมอร์ - ไลค์ ที่เกิดขึ้นสามารถเกิดโพลีเมอร์จับระหว่างกันเอง ให้ลักษณะคล้ายลิ่มเลือด ทำให้ไฟบริโนเจนลดต่ำลง (สุคนธ์ วิสุทธิพันธ์ และ พรศรี ตันติมิต 2525 : 74)

นอกจากการศึกษาความสามารถในการทำลายพิษงูกะปะของแอนติวีนอมในล้งมีชีวิตแล้ว ด้วยสาเหตุดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง การแข็งตัวของเลือดของแอนติวีนอมในหลอดทดลอง และพบว่า แอนติวีนอมที่เตรียมได้มี ความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแอนติวีนอมที่ได้จากม้า

จากการศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดของแอนติวีนอมในหลอดทดลองนั้น กล่าวได้ว่า เป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย

5. สำหรับการศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงนั้น ก่อนที่จะทำการศึกษาคูสมบัติดังกล่าว ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบถึงความสามารถของพินูกละปะในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากการตรวจสอบทำให้ได้ข้อสรุปว่า พินูกละปะไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (ตาราง 10)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่ได้นำแอนติวีนอมที่ได้จากการเตรียมทั้ง 2 วิธี มาทำการศึกษาคูสมบัติดังกล่าว

### ข้อเสนอแนะ

1. แอนติวีนอมที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเบปซินแล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้น จำเป็นต้องโคอะไลซ์เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกให้หมด ก่อนที่จะนำไปฉีดหนู เพื่อหาค่าความสามารถในการทำลายพินูกละปะ ไม่เช่นนั้นแล้วแอมโมเนียมซัลเฟตที่หลงเหลืออยู่ในแอนติวีนอมจะเป็นสาเหตุที่ทำให้จำนวนหนูที่ตายคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง หรืออาจทำให้หนูตายหมด

2. ในการหาเวลาในการแข็งตัวของเลือดนั้น จำเป็นจะต้องควบคุมในเรื่องต่อไปนี้

2.1 การเติมสารต่าง ๆ ลงในพลาสมา ควรเติมลงในช่วงเวลาเท่ากันและเหมือนกัน เพื่อเป็นการควบคุมให้กลไกการแข็งตัวของเลือดเริ่มดำเนินไปในเวลาเดียวกัน หรือใกล้เคียงกันมากที่สุด

2.2 การใช้ลวดพลาสติกมีจุ่มลงในพลาสมาเพื่อตรวจสอบการแข็งตัวของเลือด เป็นการรบกวนกลไกการแข็งตัวของเลือด ดังนั้นต้องใช้ลวดพลาสติกมีจุ่มพลาสมาเฉพาะช่วงเวลาที่กำหนดเท่านั้นจนพลาสมาเริ่มหนืด จึงทำการจุ่มบ่อยครั้งขึ้น เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยติดลวดพลาสติกมีจุ่มมาจึงจับ เวลาในการแข็งตัวของเลือด

### ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัย

1. ควรทำการศึกษาเสถียรภาพของแอนติวีนอมที่เตรียมได้
2. สำหรับแอนติวีนอมของงูพิษต่อโลหิต ควรทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทำลายพินูกละปะกับความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด

บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

- บุญเยื่อน ทุมวิภาต และ วิโรจน์ นุตพันธุ์ การรักษาผู้ป่วยถูกงูพิษกัด โรงพิมพ์พิมพ์เนศ 2525, 162 หน้า
- เบญจะ เพชรคล้าย ความรู้พื้นฐานและการทดสอบทางอิมมูโนวิทยา 2525, 122 หน้า
- ประพันธ์ ภาณุภาค วิทยานิพนธ์ร่วมกัน สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2527, 348 หน้า
- เกสัชกรรม, องค์การ เอกสารประกอบการใช้เซรุ่มแก้พิษงู 2527, 5 หน้า
- มุกดา ตฤชยานนท์ และคนอื่น ๆ สัตววิทยและการรักษาพิษสัตว์ โรงพิมพ์พิมพ์เนศ 2522, 201 หน้า
- มนตรี ตูจันดา สมโพธิ พุกกะเวส และ บุญเยื่อน ทุมวิภาต ใน วัคซีนและซีรัม โรงพิมพ์อักษรสมัย 2519, 278 หน้า
- วันเพ็ญ ชัยคำภา อิมมูโนวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรค ทิพย์อักษร ห้างหุ้นส่วนจำกัด 2525, 210 หน้า
- วิทยาภาสตร์, กอง เอกสารวิธีใช้เซรุ่มแก้พิษงูชนิดแห้ง ม.ป.ป., 2 หน้า
- วิโรจน์ นุตพันธุ์ งูพิษในเมืองไทย มิตรผลุงการพิมพ์ 2514, 68 หน้า
- วิกุล วีรานุวัตต์ เคมีคลินิก พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพเวชสาร 2525, 554 หน้า
- สัทธ์ พลิชยกุล การศึกษาแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ เพื่อการศึกษาทางเอนไซม์ วิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2508, 54 หน้า
- สุคนธ์ วิสุทธิพันธ์ และพรศรี คันตินิติ การแข็งตัวของเลือดและการละลายลิ้มเลือด โครงการตำราศิริราช 2525, 145 หน้า
- Abramoff, Peter. Biology of Immune Response. United State of America, McGraw-Hill, Inc., 1970. 492 p.
- Brewer, J.M., A.I. Pesce and R.B. Ashworth Experimental Techniques in Biochemistry. New Jersey, Prentice - Hall, Inc., 1974. 374 p.
- Cecil Russell L., Robert F. Loeb. A Textbook of Medicine. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1959. 1665 p.
- Davis, B.J. "Disc Electrophoresis - II. Method and Application to Human Serum Proteins," Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 - 404 - 427, 1964.

- Dawson, R.M.C. and others. Data for Biochemical Research. London, Oxford University Press, 1969. 654 p.
- Dissanayake, S. and F.C. Hay. "Pepsin Digestion of Mouse IgG Immunoglobulins Subfragments of the Fc Region," Immunochemistry. 12 . 373 - 378, 1975.
- Ernst, Mary Lou, Ruth Arnon and Michael Sela. "Cleavage of Horse Immunoglobulin by Cyanogen Bromide," Immunochemistry. 5 513 - 514, 1968.
- Faust, C.H. Jr. and Robert P. tengerdy. "Physiochemical Properties of a Purified Bovine IgG Antibody," Immunochemistry. 7 : 744 - 746, 1970
- Herbert, W.J. and P.C. Wilkinson. A Dictionary of Immunology. 2 nd.ed., London, Blackwell Scientific Publication Ltd., 1974. 194 p.
- Hudson, Leslie and Frank C. Hay Practical Immunology. 2 nd.ed., London, 1980. 360 p.
- Jayaraman, J. Laboratory Manual in Biochemistry India, 1981. 180 p.
- Jiménez - Porras, Jesús M. Biochemistry of Snake Venoms. Marcel Dekker, Inc., 1970. 431 p.
- Kabat, Llvín A., Mayer, Manfred M. Experimental Immunochemistry. United State of America, Charles C Thomas • Publisher, 1961. 905 p.
- Kukongviriyapan, Veerapol. Purification of Antibody Against Naja Naja Siamensis Toxin 3 by Affinity Chromatography. Master's Thesis. Mahidol University, 1979. 44 p. mimeographed.
- Lachmann, P.F. "The Purification of Specific Antibody as F(ab)<sub>2</sub> by the Pepsin Digestion of Antigen - Antibody Precipitates, and its Application to Immunoglobulin and Complement Antigens," Immunochemistry. 8 . 81 - 88, 1970.
- Lowry, O.H. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," J. Biol. Chem. 193 : 265, 1951.
- Medical Letter. "Treatment of Snakebite in The U.S.A.," Med. Lett. Drugs. Ther. 20(23) • 101 - 102, 1978.
- Mohamed, A.H. and N.A. El. Damarawy. "the Role of the Fibrinolytic Enzyme System in the Haemostatic Defects Following Snake Envenomation," Toxicon. 12 467 - 475, 1974.

- Pharmacia Fine Chemicals. Gel filtration, Theory and Practice.  
Sweeden, Rahms i Lund, 1982 - 1983. 64 p.
- Pherson, Alexander Mc. Preparation and Analysis of Protein Crystal.  
U.S.A. John Wiley & Sons, Inc., 1982. 371 p.
- Reynolds, Bruce L. Recommendation For the Refinement of Cobra  
Antivenom by Pepsin Digestion. 1986. 4 p. Photocopied.
- Weir, D.M. Handbook of Experiment Immunology. Great Britain,  
Blackwell Scientific Publications, 1967. 1245 p.
- World Health Organization. Progress in the Characterization of  
Venoms and Standardization of Antivenoms. Geneva, 1981. 44 p.