บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินออกจากพิษงูเห่าและการทำให้บริสุทธิ์

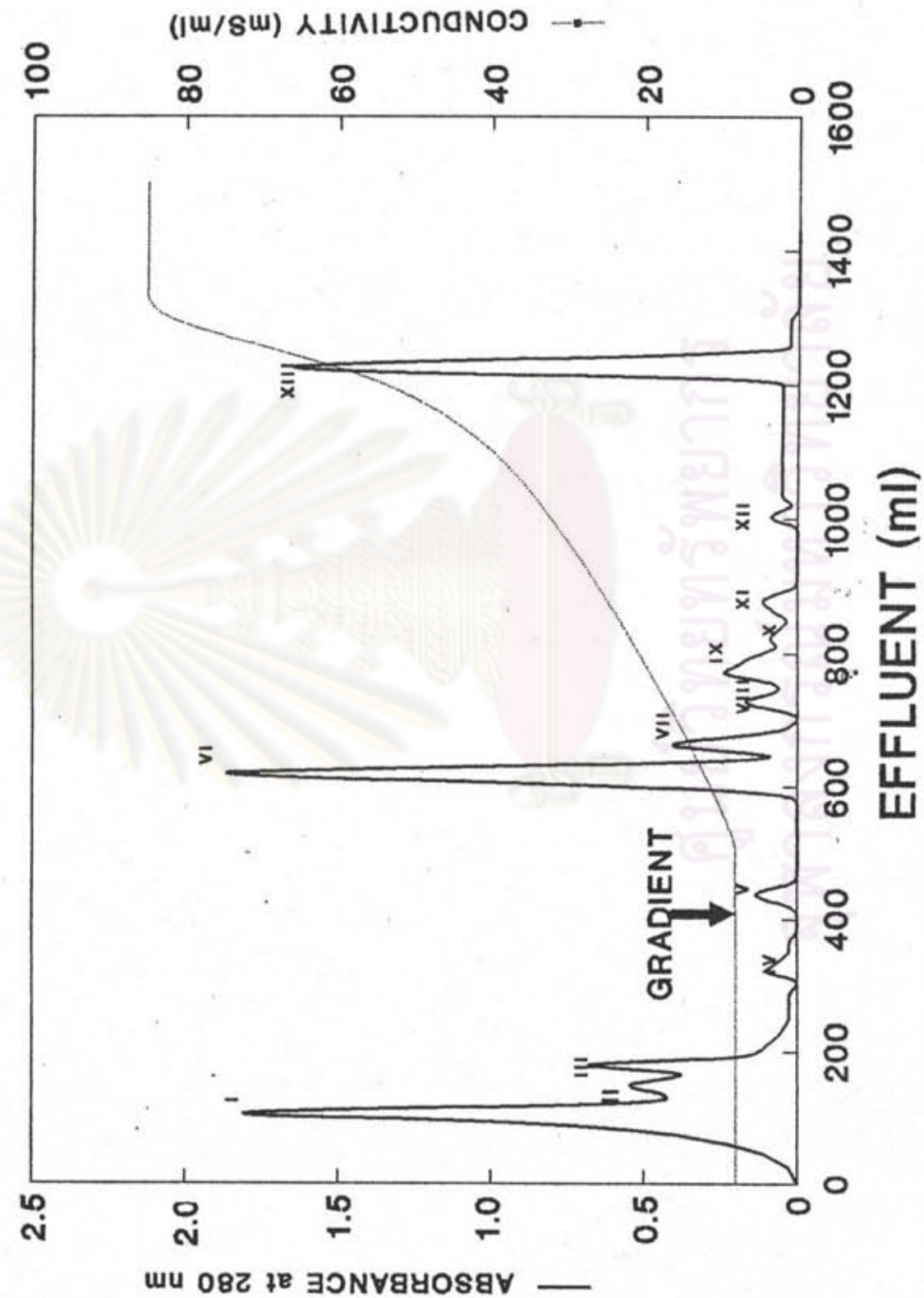
นำสารละลายพิษงูเห่าไปแยกนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินโดยใช้คอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 (ข้อ 3.9.1 หน้า 16) ปรากฏว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาจากคอลัมน์ ทั้งหมด 13 พีค (รูปที่ 1) นำแต่ละพีคไปหาปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก) % ยีโมโกลบิน (ข้อ 3.10.3 หน้า19) และหาแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ (ข้อ 3.11 หน้า19) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าพิษงูเห่าไทยประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ โปรตีนในพีคที่ VI และ XIII ซึ่งมีปริมาณโปรตีนประมาณ 31.5 และ 27.2 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ส่วนพีคที่ 1 มีปริมาณโปรตีนรองลงมา เป็นพีคของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ และพบว่าเฉพาะพีคที่ XIII มีความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะของคาร์ดิโอทอกซิน (Karlsson, 1971) จึงคาดว่านิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินออกมาในพีคที่ VI และ XIII ตามลำดับ และเมื่อนำทอกซินทั้งสองพีคนี้ไปทำให้บริสุทธิ์ขั้นโดยวิธีเจลฟิลเตรชันได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ พบว่าเมื่อผ่านนิวโรทอกซินลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 จะถูกแยกได้โปรตีนพีคใหญ่ 1 พีค [VI(1)] และพีคเล็ก 2 พีค [VI(2), VI(3)] จึงได้รวมแต่ละพีคเพื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุล (ข้อ 3.9.5) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4ก) และไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส (ข้อ 3.12.2) พบว่าพีคที่ VI(1), VI(2), VI(3) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7,798, 1,941 และ <1,450 ดาลตัน ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จึงนำพีคที่ VI(1) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 7,798 ดาลตัน ซึ่งเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของนิวโรทอกซินที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของพิษงูเห่าไทย ซึ่งรายงานไว้โดย Karlsson, 1991 ว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 7,800 ดาลตัน (Karlsson, 1971) ไปใช้กระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อให้สร้างแอนติบอดีนิวโรทอกซินต่อไป โดยใช้ทั้งในรูปนิวโรทอกซินอิสระและที่เป็นคอนจูเกต

ส่วนคาร์ดิโอทอกซินหลังผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 จะถูกแยกได้โปรตีนพีคใหญ่ 1 พีค [XIII(3)] และพีคเล็ก 2 พีค [XIII(1), XIII(2)] จึงได้รวมแต่ละพีคเพื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุล (ข้อ 3.9.6) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4ข) และไปทดสอบความ

บริสุทธิ์โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส(ข้อ 3.12.2) พบว่าพีคที่ XIII(1), XIII(2), XIII(3) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ >25,000, 19,705 และ 7,080 ดาลตัน ตามลำดับ(ตารางที่ 3) จึงนำพีคที่ XIII(3)ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 7,080 ดาลตัน ซึ่งเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของคาร์ดิโอทอกซินที่เป็นส่วนประกอบของเขี้ยงูเห่าซึ่งรายงานไว้โดย Fryklund,1975 ว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 6,727 ดาลตัน ไปใช้กระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อให้สร้างแอนติคาร์ดิโอทอกซินต่อไป โดยใช้ทั้งในรูปคาร์ดิโอทอกซินอิสระและที่เป็นคอนจูเกต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 การแยกนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินออกจากพิษงูเห่าไทยโดยคอลัมน์ไบโอเรกซ์-70

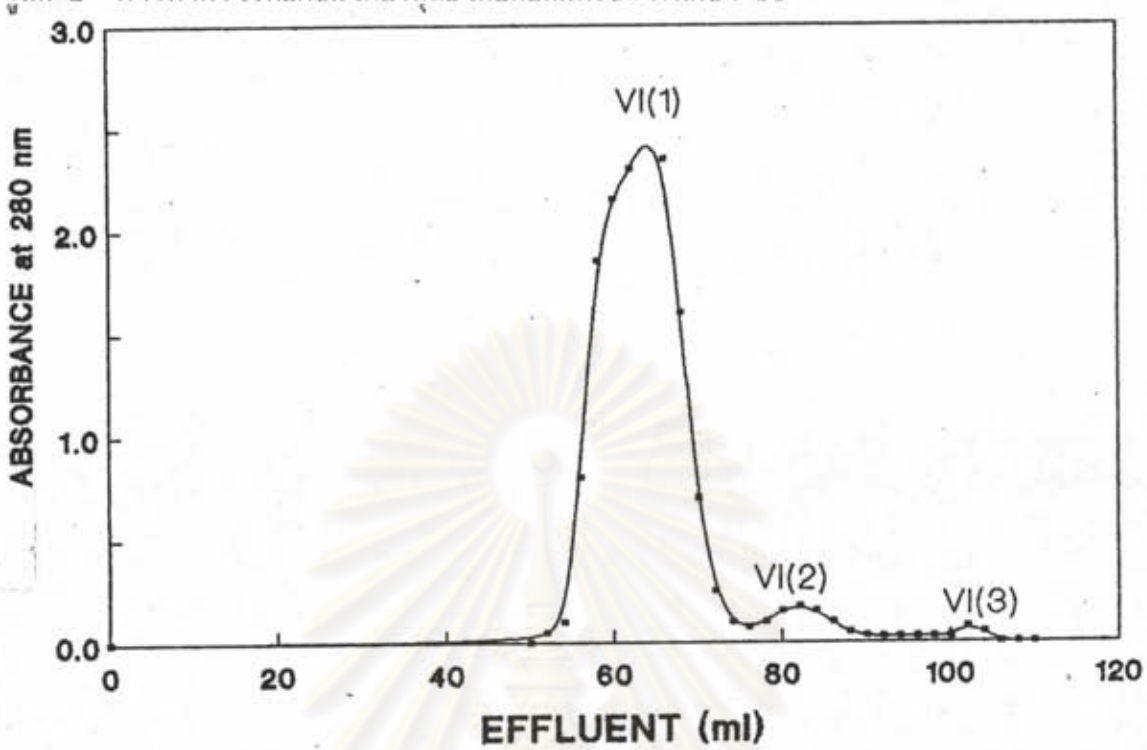


ตารางที่ 1 การวิเคราะห์พีคที่ได้จากการแยกพิษงูเห่าโดยคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70

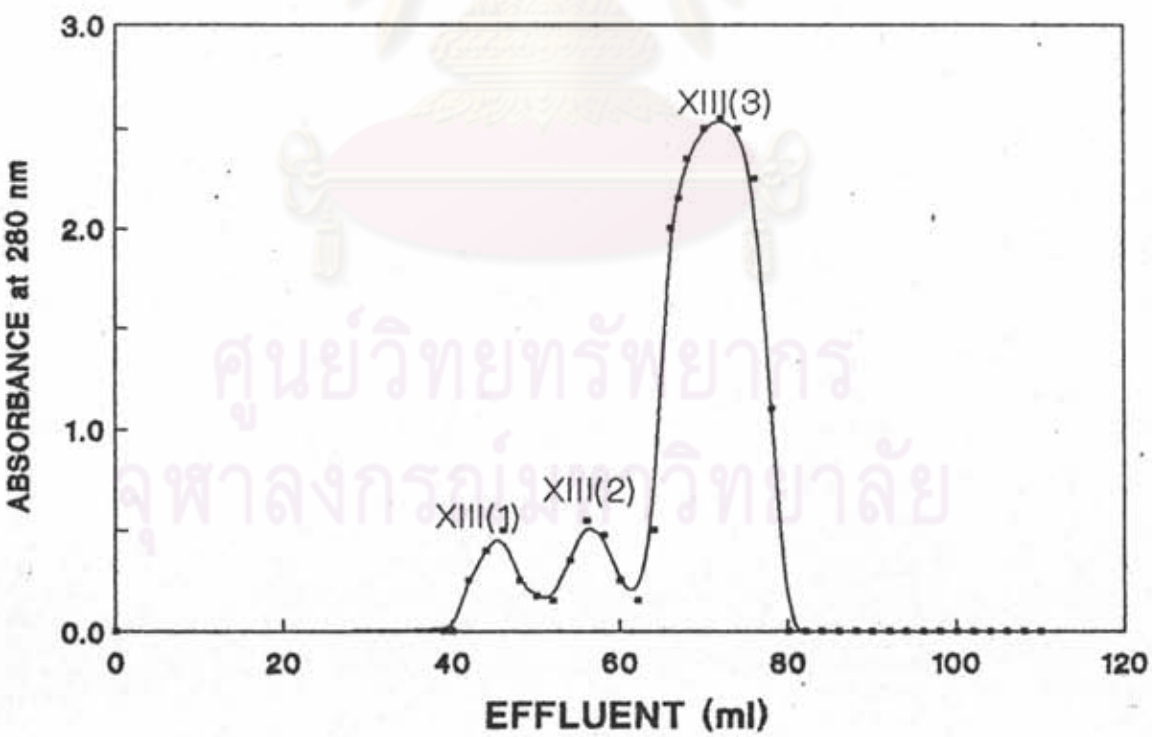
PEAK NO.	PROTEIN CONTENT		%HEMOLYSIS	PHOSPHOLIPASE A ACTIVITY
	(mg)	(%)		
I	86.4	21.5	0	+
II	13.8	3.4	0	+
III	10.5	2.6	0	+
IV	8.8	2.2	0	-
V	6.5	1.6	0	-
VI	126.5	31.5	0	-
VII	10.7	2.7	0	-
VIII	8.1	2.0	0	-
IX	8.4	2.1	0	-
X	3.2	0.8	0	-
XI	5.3	1.3	0	-
XII	4.4	1.1	0	-
XIII	109.9	27.2	53.6	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 การทำนิวโรทอกซินให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50

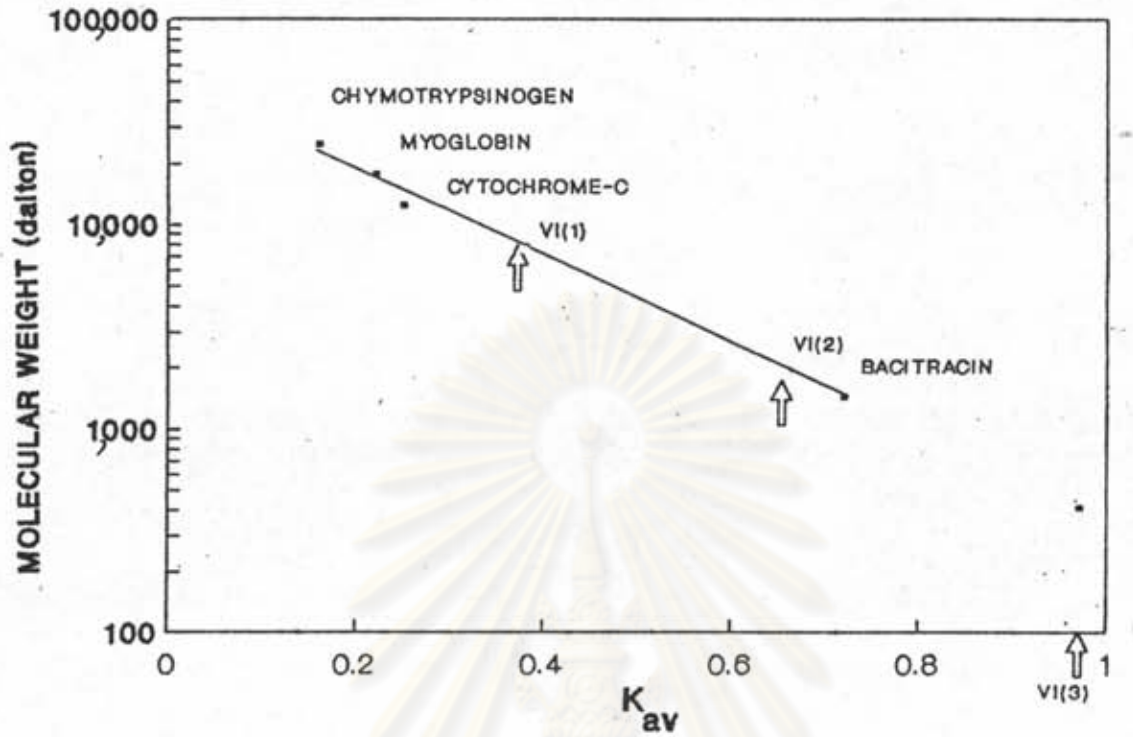


รูปที่ 3 การทำคาร์ดิโอทอกซินให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50

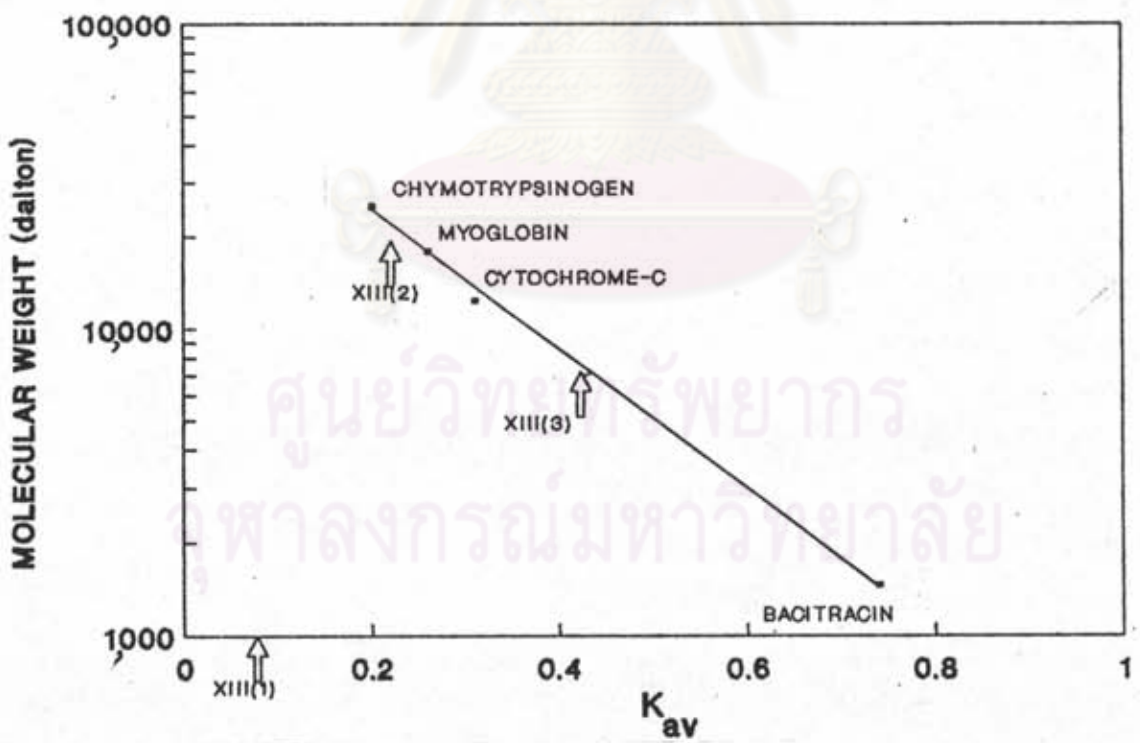


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน



(ข)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและนิวโรทอกซินหลังผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50

SUBSTANCE	MOLECULAR WEIGHT (DALTON)	Ve (ml)	K av
CHYMOTRYPSINOGEN	25,000	50	0.16
MYOGLOBIN	17,800	54	0.22
CYTOCHROME-C	12,400	56	0.25
BACITRACIN	1,450	86	0.72
FRACTION VI(1)	7,798	64	0.38
VI(2)	1,941	82	0.66
VI(3)	<1,450	102	0.97

ตารางที่ 3 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและดาร์ดีโอทอกซินหลังผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50

SUBSTANCE	MOLECULAR WEIGHT (DALTON)	Ve (ml)	K av
CHYMOTRYPSINOGEN	25,000	56	0.20
MYOGLOBIN	17,800	60	0.26
CYTOCHROME-C	12,400	64	0.31
BACITRACIN	1,450	94	0.74
FRACTION XIII(I)	>25,000	46	0.06
XIII(2)	19,705	58	0.23
XIII(3)	7,080	72	0.43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17996950

4.2 ผลการทดสอบสมบัติการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

4.2.1 ผลการหาความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เหมาะสม

เมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีความเข้มข้น 1-5% มาทำให้แตก100 % ดังรายละเอียดในข้อ 3.10.2 หน้า 18 พบว่าความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงกับค่าการดูดกลืนแสง เมื่อเกิดการแตก 100 % มีความสัมพันธ์ดังแสดงในรูปที่ 5 ในการทดลองต่อๆไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่ากับ 4 % เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงพอเหมาะ

4.2.2 ผลการทดสอบสมบัติการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกของสารตัวอย่าง

หลังจากนำสารตัวอย่างที่แยกจากพิษงูแต่ละพีคที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 ไปทดสอบสมบัติการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ดังรายละเอียดข้อ 3.10.3 หน้า 19 ปรากฏว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าสารที่แยกจากพิษงูซึ่งอยู่ในพีคที่ I-XII ไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก เฉพาะที่อยู่ในพีคที่ XIII เท่านั้นที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

4.3 ผลการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ ในโปรตีนที่แยกจากพิษงูเห่า

เมื่อนำโปรตีนพีคต่างๆที่แยกได้หลังจากผ่านพิษงูเห่าลงในคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 มาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอ ปรากฏว่าพบแอคติวิตีเฉพาะพีค I, II, III ดังแสดงในตารางที่ 1

4.4 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของทอกซินโดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส

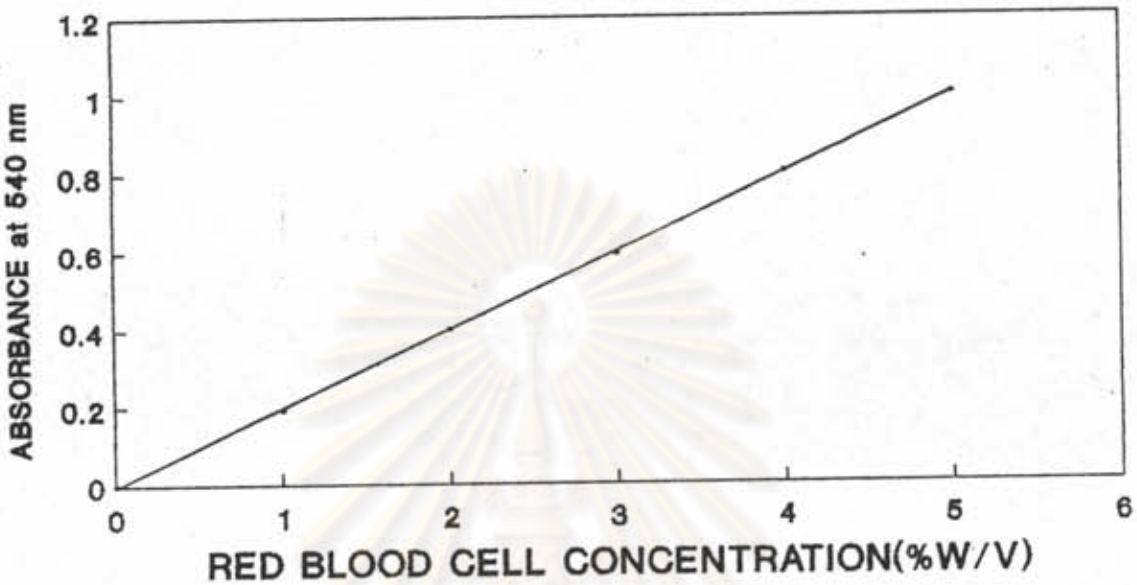
4.4.1 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของนิวโรทอกซิน

ได้นำนิวโรทอกซินที่ได้จากการแยกโดยคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 (ข้อ 3.9.2 หน้า 16) และการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน(ข้อ 3.9.5 หน้า 17) มาทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส(ข้อ 3.12.2 หน้า 20) พบว่าได้แถบโปรตีนแถบเดียว ดังแสดงในรูปที่ 6

4.4.2 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของคาร์ดิโอทอกซิน

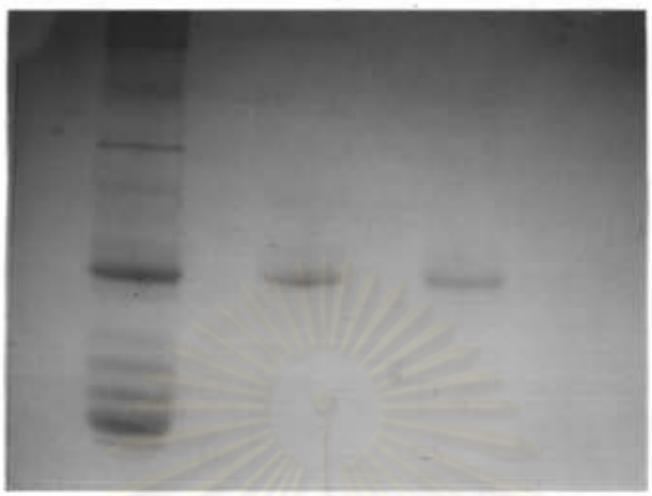
ได้นำคาร์ดิโอทอกซินที่ได้จากการแยกโดยคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70(ข้อ 3.9.2 หน้า 16) และการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน(ข้อ 3.9.6 หน้า 18) มาทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส(ข้อ 3.12.2 หน้า 20) พบว่าได้แถบโปรตีนแถบเดียว ดังแสดงในรูปที่ 7

รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงกับค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง 100 %



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 รูปแบบการแยกนิวโรทอกซินโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส

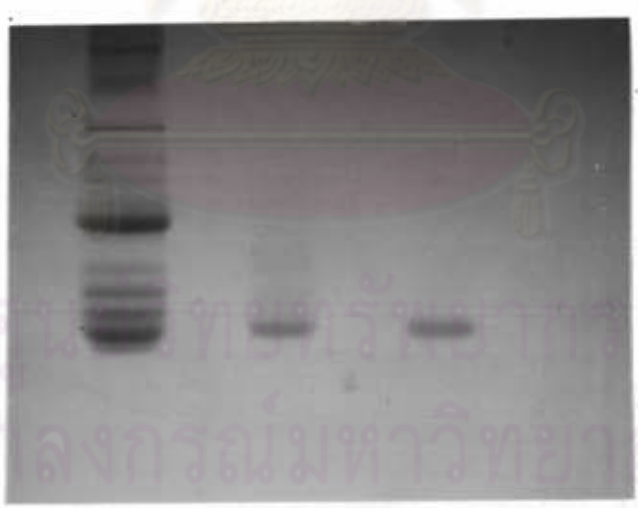


แถวที่ 1 Crude venom 120 ไมโครกรัม

แถวที่ 2 นิวโรทอกซินหลังผ่านคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 20 ไมโครกรัม

แถวที่ 3 นิวโรทอกซินหลังผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 20 ไมโครกรัม

รูปที่ 7 รูปแบบการแยกคาร์ดิโอทอกซินโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส



แถวที่ 1 Crude venom 120 ไมโครกรัม

แถวที่ 2 คาร์ดิโอทอกซินหลังผ่านคอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 40 ไมโครกรัม

แถวที่ 3 คาร์ดิโอทอกซินหลังผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 40 ไมโครกรัม

4.5 ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเอสดีเอสโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส

นำนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน (ข้อ 3.9.5 และข้อ 3.9.6 ตามลำดับ หน้า 18) มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเอสดีเอสโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส (รูปที่ 8) เทียบกับกราฟสำหรับหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 9) พบว่าทั้งนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินต่างมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7,000-8,000 ดาลตัน ค่าที่หาได้นี้เหมือนกับค่าที่รายงานโดย Jiang และคณะ1989 สำหรับคาร์ดิโอทอกซิน(7,000 ดาลตัน) และค่าที่รายงานโดย Chinonavanig และคณะ,1989 สำหรับนิวโรทอกซิน(8,000 ดาลตัน)

4.6 ผลการติดฉลากนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินด้วยไอโอดีน-125 และการแยกออกจากสารรังสีส่วนเกิน

4.6.1 ผลการติดฉลากและการแยกนิวโรทอกซิน

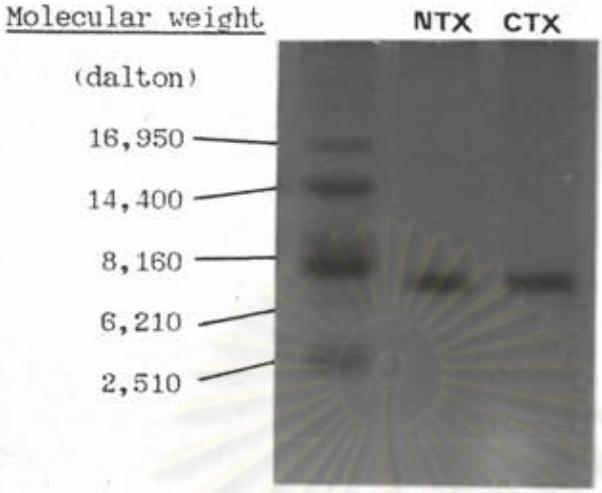
ในการแยกนิวโรทอกซินที่ติดฉลากด้วยไอโอดีน-125 โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-25 (ข้อ 3.15.2 หน้า 22)ปรากฏว่านิวโรทอกซินจะออกมาในพีคแรก และไอโอไดด์-125 อิสระจะออกมาในพีคหลังดังแสดงในรูปที่ 10 และจากการคำนวณพบว่าไอโอดีน-125 สามารถเข้าไปติดฉลากนิวโรทอกซินได้ประมาณ 20 %

4.6.2 ผลการติดฉลากและการแยกคาร์ดิโอทอกซิน

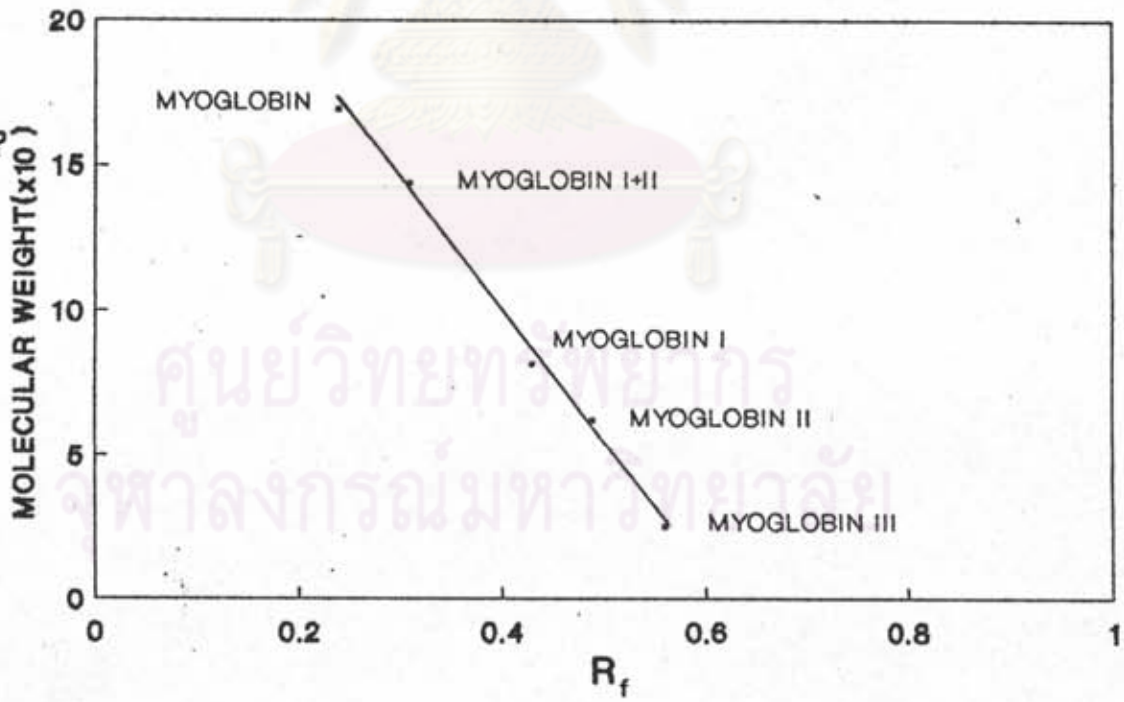
ในการแยกคาร์ดิโอทอกซินที่ติดฉลากด้วยไอโอดีน-125 โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-25 (ข้อ 3.15.4 หน้า 22)ปรากฏว่าคาร์ดิโอทอกซินจะออกมาในพีคแรก และไอโอไดด์-125อิสระจะออกมาในพีคหลัง ดังแสดงในรูปที่ 11 และจากการคำนวณพบว่าไอโอดีน-125 สามารถเข้าไปติดฉลากคาร์ดิโอทอกซินได้ประมาณ 7 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 รูปแบบการแยกโปรตีนมาตรฐานโดยวิธีเอสดีเอสโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส

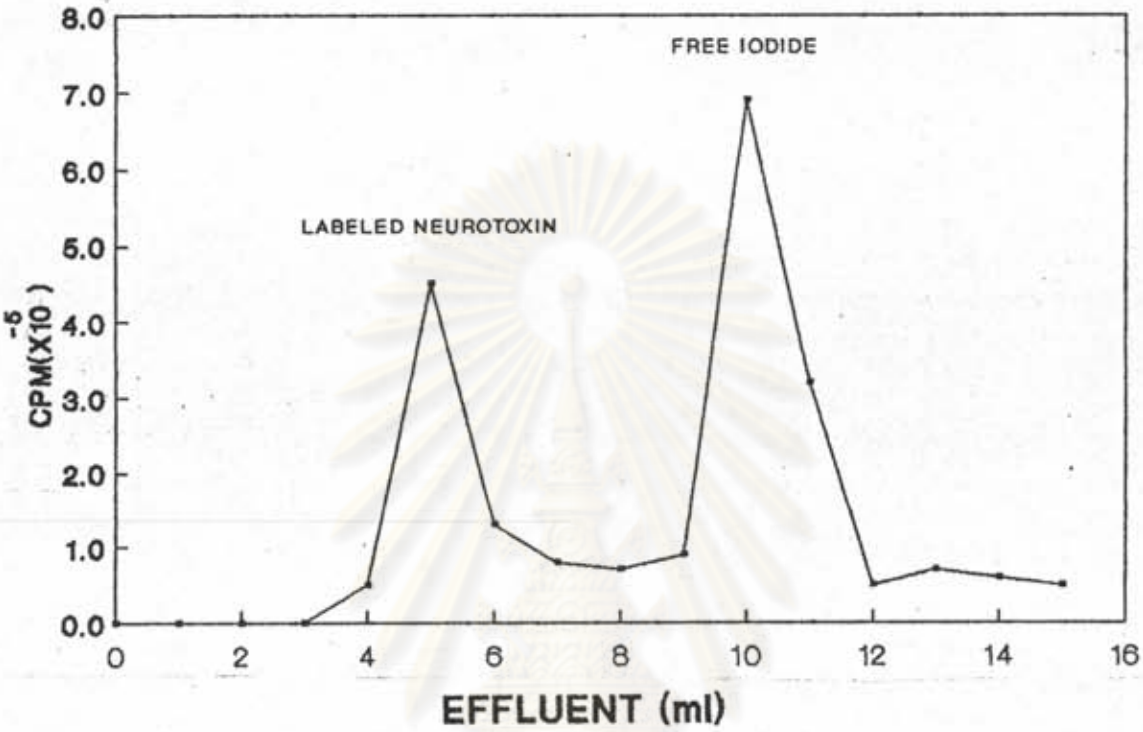


รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่าง R_f กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

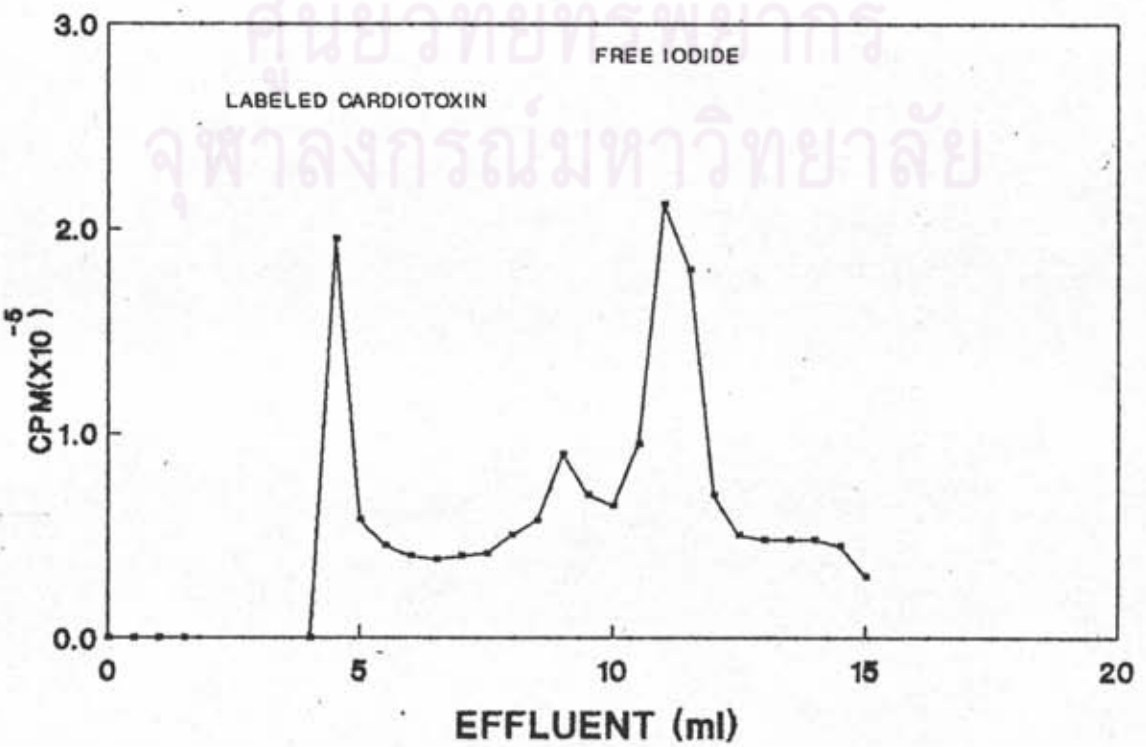


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 การแยกนิวโรทอกซินที่ติดฉลากด้วยไอโอดีน-125 ออกจากไอโอไดด์-125 อิสระด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-25



รูปที่ 11 การแยกคาร์ดิโอทอกซินที่ติดฉลากด้วยไอโอดีน-125 ออกจากไอโอไดด์-125 อิสระด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-25



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินกับโปรตีน

การดัดแปลงโมเลกุลนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซิน เพื่อให้มีสมบัติเป็นอิมมูโนเจนที่ดีและเพื่อลดความเป็นพิษ(detoxified)ของทอกซิน ด้วยการทำให้นิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินเกาะกับโปรตีนตัวนำโดยใช้คาร์โบไดอิไมด์เป็นตัวเชื่อมนั้น การทดลองนี้ใช้โปรตีนตัวนำ 2 ชนิดคือ อัลบูมินและไทโรกลอบูลิน

ปกติการเตรียมคอนจูเกตระหว่างโปรตีนตัวนำกับแฮปเทน จะพบว่าจำนวนของแฮปเทนที่เกาะกับโปรตีนตัวนำ(Incorporation molar ratio)จะขึ้นกับอัตราส่วนจำนวนโมลของสารตั้งต้นที่ใช้(Reagent molar ratio) คือ แฮปเทน: โปรตีนตัวนำ : ตัวเชื่อม และการแยกคอนจูเกตออกจากแฮปเทนอิสระอาจทำได้โดยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน(Ultrafiltration) ซึ่งจะแยกโมเลกุลของแฮปเทนอิสระและโมเลกุลของแฮปเทนที่เชื่อมกันเองออกจากคอนจูเกต

4.7.1 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับอัลบูมิน

จากการทดลองเตรียมคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับอัลบูมิน ตามวิธีข้อ 3.16.2 หน้า 23 โดยใช้อัตราส่วนจำนวนโมลสารตั้งต้น (นิวโรทอกซิน: อัลบูมิน: คาร์โบไดอิไมด์)ต่างๆกัน พบว่าจำนวนโมลของนิวโรทอกซินที่เกาะกับอัลบูมินจะขึ้นกับอัตราส่วนจำนวนโมลของสารตั้งต้นที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 4 เมื่อเพิ่มจำนวนโมลของนิวโรทอกซินจะทำให้มีจำนวนโมลของทอกซินที่เข้าไปเกาะกับอัลบูมินเพิ่มขึ้น ถ้าเพิ่มจำนวนโมลของสารตั้งต้นเป็น 100:1:200 พบว่าจำนวนโมลของนิวโรทอกซินที่เกาะกับอัลบูมินหนึ่งโมลจะเท่ากับประมาณ 18-38 โมล

4.7.2 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับไทโรกลอบูลิน

จากการทดลองเตรียมคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับไทโรกลอบูลิน ตามวิธีข้อ 3.16.2 หน้า 23 โดยใช้อัตราส่วนจำนวนโมลสารตั้งต้น(นิวโรทอกซิน: ไทโรกลอบูลิน : คาร์โบไดอิไมด์)เท่ากับ 100:1:200 พบว่าจำนวนโมลของนิวโรทอกซินที่เกาะกับไทโรกลอบูลินหนึ่งโมลจะเท่ากับประมาณ 41-70 โมล ดังแสดงในตารางที่ 4

4.7.3 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับอัลบูมิน

จากการทดลองเตรียมคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับอัลบูมิน ตามวิธีข้อ 3.16.2 หน้า 23 โดยเปลี่ยนอัตราส่วนจำนวนโมลสารตั้งต้น(คาร์ดิโอทอกซิน: อัลบูมิน : คาร์โบไดอิไมด์)ต่างๆกัน พบว่าจำนวนโมลของคาร์ดิโอทอกซินที่เกาะกับอัลบูมินหนึ่งโมล จะขึ้นกับอัตราส่วนจำนวนโมลของสารตั้งต้นที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 4 เมื่อเพิ่มจำนวนโมลของคาร์ดิโอทอกซินจะทำให้มีจำนวนโมลของทอกซินที่เข้าไปเกาะกับอัลบูมินเพิ่มขึ้น ถ้าเพิ่มจำนวนโมลของสารตั้งต้นเป็น 100:1:200

พบว่าจำนวนโมลของคาร์ดิโอทอกซินที่เกาะกับอัลบูมินหนึ่งโมลจะเท่ากับประมาณ 54-57 โมล

4.7.4 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับไทโรกลอบูลิน

จากการทดลองเตรียมคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับไทโรกลอบูลิน ตามวิธีข้อ 3.16.2 หน้า 23 โดยเปลี่ยนอัตราส่วนจำนวนโมลสารตั้งต้น (คาร์ดิโอทอกซิน: ไทโรกลอบูลิน: คาร์โบไดอิไมด์) ต่างๆกัน พบว่าจำนวนโมลของคาร์ดิโอทอกซินที่เกาะกับ ไทโรกลอบูลินจะขึ้นกับอัตราส่วนจำนวนโมลของคาร์ดิโอทอกซินที่ใช้ ถ้าให้ไทโรกลอบูลินและคาร์โบไดอิไมด์คงที่ ดังแสดงในตารางที่ 4 เมื่อเพิ่มจำนวนโมลของคาร์ดิโอทอกซินจะทำให้มีจำนวนโมลของทอกซินที่เข้าไปเกาะกับไทโรกลอบูลินเพิ่มขึ้น โดยจำนวนโมลสารตั้งต้น200:1:200 พบว่าจำนวนโมลของคาร์ดิโอทอกซินที่เกาะกับไทโรกลอบูลินหนึ่งโมลจะเท่ากับประมาณ 49-72 โมล

ในการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนตินิวโรทอกซินและแอนติคาร์ดิโอทอกซินจะเลือกใช้คอนจูเกตที่มีจำนวนโมลของทอกซินสูงที่สุดไปทดสอบความเป็นพิษก่อนแล้วจึงนำไปฉีดให้กับกระต่าย

4.8 ผลการทดสอบความเป็นพิษของคอนจูเกต

เมื่อนำคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับอัลบูมินที่มีจำนวนโมลของนิวโรทอกซิน เท่ากับ 18-38 และคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับไทโรกลอบูลินที่มีจำนวนโมลของนิวโรทอกซินเท่ากับ 41-70 ไปทดสอบความเป็นพิษโดยการนำไปหา LD_{50} (ข้อ 3.14 หน้า 21) เปรียบเทียบกับพิษงูเห่า (crude venom) และนิวโรทอกซินที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับอัลบูมินมีความเป็นพิษสูงกว่าคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับไทโรกลอบูลินและสูงกว่าพิษงูเห่า (crude venom) ด้วย และนิวโรทอกซินที่ทำให้บริสุทธิ์จะมีความเป็นพิษสูงที่สุด จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าถึงแม้การทำให้นิวโรทอกซินเป็นคอนจูเกต จะทำให้ความเป็นพิษลดลง แต่การคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับอัลบูมินมิได้ทำให้ความเป็นพิษน้อยกว่าพิษงูเห่ามากนัก ดังนั้นจึงใช้เฉพาะคอนจูเกตระหว่างนิวโรทอกซินกับไทโรกลอบูลินในการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนตินิวโรทอกซิน

อนึ่งการเปรียบเทียบ LD_{50} จากผลการทดลองในตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าเฉพาะการหา LD_{50} ของพิษงูเห่าที่ใช้หนูขนาด 20 กรัม นอกนั้นใช้หนูขนาด 16 กรัม ดังนั้นในการเปรียบเทียบกัน ถ้าใช้หนูขนาด 16 กรัมเท่ากัน ค่าLD_{50} ของพิษงูเห่าควรคำนึงว่าจะต้องต่ำกว่า 5.8 เล็กน้อย

เมื่อนำคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับอัลบูมิน ที่มีจำนวนโมลของคาร์ดิโอทอกซิน

เท่ากับ 54-57 และคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับไทโรกลอบูลินที่มีจำนวนโมลของคาร์ดิโอทอกซินเท่ากับ 49-72 ไปทดสอบความเป็นพิษโดยการนำไปหา LD_{50} (ข้อ 3.14 หน้า 21) เปรียบเทียบกับพิษงูเห่า(crude venom)และคาร์ดิโอทอกซินที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับอัลบูมิน มีความเป็นพิษสูงกว่าคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับไทโรกลอบูลินแต่ต่ำกว่าพิษงูเห่า (crude venom) และคาร์ดิโอทอกซินที่ทำให้บริสุทธิ์จะมีความเป็นพิษเท่ากับคาร์ดิโอทอกซิน-อัลบูมินคอนจูเกต แต่ต่ำกว่าพิษงูเห่า(crude venom) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการทำให้คาร์ดิโอทอกซินเป็นคอนจูเกตกับอัลบูมินไม่ได้ทำให้ความเป็นพิษของคาร์ดิโอทอกซินลดลง อย่างไรก็ตามการคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับ ไทโรกลอบูลินจะทำให้ความเป็นพิษลดลงได้เล็กน้อย ดังนั้นจึงจะใช้เฉพาะคอนจูเกตระหว่างคาร์ดิโอทอกซินกับไทโรกลอบูลิน ในการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติ-คาร์ดิโอทอกซินต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ผลการเตรียมคอนจูเกตระหว่างทอกซินกับโปรตีนตัวนำ

Reagent molar ratio	Incorporation molar ratio
NTX:BSA:CDI	BSA:NTX
10 : 1 :20	1: 7-9
50 : 1 :200	1: 23-33
100 : 1 :200	1: 18-38
NTX:Tg:CDI	Tg:NTX
100 : 1 :200	1: 41-70
CTX:BSA:CDI	BSA:CTX
50 : 1 :200	1: 8-39
100 : 1 :200	1: 54-57
CTx:Tg:CDI	Tg:CTX
50 : 1 :200	1: 17-21
100 : 1 :200	1: 32-40
150 : 1 :200	1: 43
200 : 1 :200	1: 49-72

CTX = Cardiotoxin
Tg = Thyroglobulin
BSA = Bovine serum albumin
CDI = Carbodiimide

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ค่า LD_{50} พิษงูเห่าและทอกซิน

SUBSTANCE	LD_{50}
CRUDE VENOM	5.8 ug/20 gm.mouse
NEUROTOXIN	1.8 ug/16 "
NEUROTOXIN-BSA-CONJUGATE	4.5 ug/16 "
NEUROTOXIN-Tg-CONJUGATE	7.2 ug/16 "
CARDIOTOXIN	34.8 ug/16 "
CARDIOTOXIN-BSA-CONJUGATE	34.8 ug/16 "
CARDIOTOXIN-Tg-CONJUGATE	50 ug/16 "

Tg = THYROGLOBULIN BSA = BOVINE SERUM ALBUMIN

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9 ผลการหาปริมาณแอนติบอดี

4.9.1 ผลการหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธีเอาซ์เทอโลนีอิมมูโนดิฟฟิวชัน

เมื่อฉีดนิวโรทอกซินอิสระผสมกับคอมเพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 1 (Rb1, Rb2, Rb3) ตัวละ 50 ไมโครกรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด (ข้อ 3.17.2 หน้า 24) หลังจากนั้น 5 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำ (Booster injection) ตัวละ 330 ไมโครกรัม โดยวิธีเดียวกัน และหลังจากนั้นอีก 5 สัปดาห์จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยนิวโรทอกซินปริมาณเท่ากับการฉีดซ้ำครั้งแรก หลังจากการฉีดแต่ละครั้ง 1-2 สัปดาห์ จะเจาะเลือดกระต่ายมาแยกเอาซีรัมออกมาหาปริมาณแอนติบอดี (antibody titer) โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (ข้อ 3.18.2 หน้า 25) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 12 จะเห็นว่าหลังการฉีดครั้งแรกยังไม่สามารถหาปริมาณแอนติบอดีได้โดยวิธีนี้ในกระต่ายทั้ง 3 ตัว จนกระทั่งหลังการฉีดซ้ำครั้งแรกจึงพบว่ามีแอนติบอดีไตเตอร์ ซึ่งมีค่าประมาณ 4 ในกระต่าย Rb1 และ Rb3 และประมาณ 8 ในกระต่าย Rb2 อย่างไรก็ตามหลังการฉีดซ้ำครั้งที่ 2 พบว่าแอนติบอดีไตเตอร์จะเริ่มลดลงในกระต่ายทั้ง 3 ตัว จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 15 ลดลงจนหาปริมาณไม่ได้

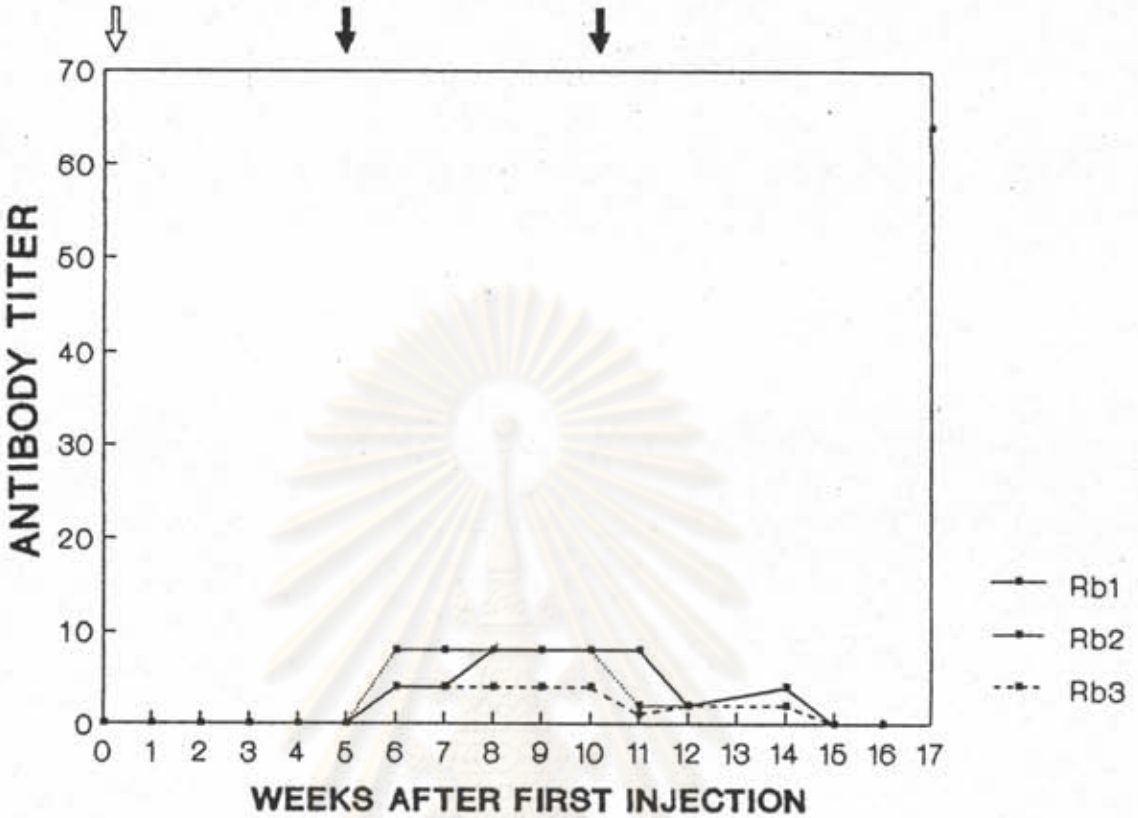
กระต่ายกลุ่มที่ 2 (Rb4, Rb5, Rb6) ฉีดด้วยนิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต (1:70) ตัวละ 1 มิลลิกรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด (ข้อ 3.17.2 หน้า 24) หลังจากนั้น 8 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำ (Booster injection) ตัวละ 1 มิลลิกรัม โดยวิธีเดียวกันและหลังจากนั้นอีก 6 สัปดาห์จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 และอีก 12 สัปดาห์จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 3 ด้วยนิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกตปริมาณเท่ากับการฉีดซ้ำครั้งแรก หลังจากการฉีดแต่ละครั้ง 1-2 สัปดาห์ จะเจาะเลือดกระต่ายมาแยกเอาซีรัมออกมาหาปริมาณแอนติบอดี (antibody titer) โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (ข้อ 3.19.2 หน้า 27) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 13 จะเห็นว่าหลังการฉีดครั้งแรกประมาณ 2 สัปดาห์ กระต่ายทั้ง 3 ตัวจะสร้างแอนติบอดีได้เพิ่มขึ้นจนกระทั่งสัปดาห์ที่ 8 ในกระต่าย Rb5 และ Rb6 จะมีแอนติบอดีไตเตอร์ประมาณ 32 ส่วน Rb4 มีไตเตอร์ประมาณ 16 และหลังการฉีดซ้ำครั้งแรกแอนติบอดีไตเตอร์จะเพิ่มขึ้นช้ามาก จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 14 จึงพบว่ามีแอนติบอดีไตเตอร์เป็น 64 ในกระต่ายทั้ง 3 ตัว และหลังจากการฉีดซ้ำครั้งที่สองก็ยังพบว่า มีแอนติบอดีไตเตอร์เท่าเดิม จนกระทั่งหลังสัปดาห์ที่ 19 กระต่าย Rb6 จึงเริ่มมีไตเตอร์ลดลง และหลังสัปดาห์ที่ 20 และ 24 กระต่าย Rb4 และ Rb5 จึงมีไตเตอร์ลดลงตามลำดับซึ่งจะลดลงเรื่อยๆ ถึงแม้ว่าจะมีการฉีดซ้ำครั้งที่ 3 ในสัปดาห์ที่ 26 ก็ตาม และในสัปดาห์ที่ 30 กระต่าย Rb4 มีแอน-

ติบอดีไตเตอร์ลดลงเหลือเพียง 2 ส่วน Rb5 และ Rb6 เหลือประมาณ 8

กระต่ายกลุ่มที่ 3 (Rb7, Rb8, Rb9) ฉีดคาร์ดิโอทอกซินอิสระผสมกับคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 3 (Rb7, Rb8, Rb9) ตัวละ 1 มิลลิกรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด(ข้อ 3.17.2 หน้า 24)หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำ(Booster injection)ตัวละ 1 มิลลิกรัม โดยวิธีเดียวกันและหลังจากนั้นอีก 5 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยคาร์ดิโอทอกซินปริมาณเท่ากับการฉีดซ้ำครั้งแรก หลังจากการฉีดแต่ละครั้ง 1-2 สัปดาห์ จะเจาะเลือดกระต่ายมาแยกเอาซีรัมออกมาหาปริมาณแอนติบอดี(antibody titer) โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (ข้อ 3.18.2 หน้า 25)ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 14 จะเห็นว่าหลังการฉีดครั้งแรก จะพบปริมาณแอนติบอดีในกระต่ายทั้ง 3 ตัว หลังสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้นแอนติบอดีไตเตอร์จะเพิ่มอีกเล็กน้อยและคงที่ในสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป โดยกระต่าย Rb7, Rb8 และ Rb9 มีแอนติบอดีไตเตอร์คงที่ที่ 8,2 และ 4 ตามลำดับ ถึงแม้จะฉีดคาร์ดิโอทอกซินซ้ำในสัปดาห์ที่ 4 และที่ 5 ก็ตาม หลังสัปดาห์ที่ 9 แอนติบอดีไตเตอร์ลดลงจนหาปริมาณไม่ได้ในสัปดาห์ที่ 18

กระต่ายกลุ่มที่ 4 (Rb10,Rb11,Rb12) ฉีดด้วยคาร์ดิโอทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต (1:72)ตัวละ 1 มิลลิกรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด(ข้อ 3.17.2 หน้า 24) หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำ(Booster injection)ตัวละ 1 มิลลิกรัม โดยวิธีเดียวกันและหลังจากนั้นอีก 5 สัปดาห์จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยคาร์ดิโอทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต ปริมาณเท่ากับการฉีดซ้ำครั้งแรก หลังจากการฉีดแต่ละครั้ง 1-2 สัปดาห์ จะเจาะเลือดกระต่ายมาแยกเอาซีรัมออกมาหาปริมาณแอนติบอดี(antibody titer) โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน(ข้อ 3.18.2 หน้า ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 15 จะเห็นว่าหลังการฉีดครั้งแรกจะเริ่มพบแอนติบอดีไตเตอร์หลังสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งจะมีไตเตอร์คงที่ประมาณ 4 ทุกตัวตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป หลังการฉีดซ้ำครั้งที่หนึ่ง 2 สัปดาห์ กระต่าย Rb10 จะมีแอนติบอดีไตเตอร์เพิ่มขึ้นเป็น 8 และคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 17 แล้วจึงเริ่มลดลงและหาปริมาณไม่ได้ในสัปดาห์ที่ 19 ส่วนกระต่าย Rb11 พบว่ามีไตเตอร์คงที่ตลอดการฉีดซ้ำทั้งสองครั้ง และลดลงหลังสัปดาห์ที่ 17 และหาปริมาณไม่ได้ในสัปดาห์ที่ 19 เช่นกัน กระต่าย Rb12 เริ่มมีไตเตอร์ลดลงหลังสัปดาห์ที่ 11 และหาปริมาณไม่ได้ในสัปดาห์ที่ 16

รูปที่ 12 ปริมาณแอนตินิวโรทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยนิวโรทอกซิน



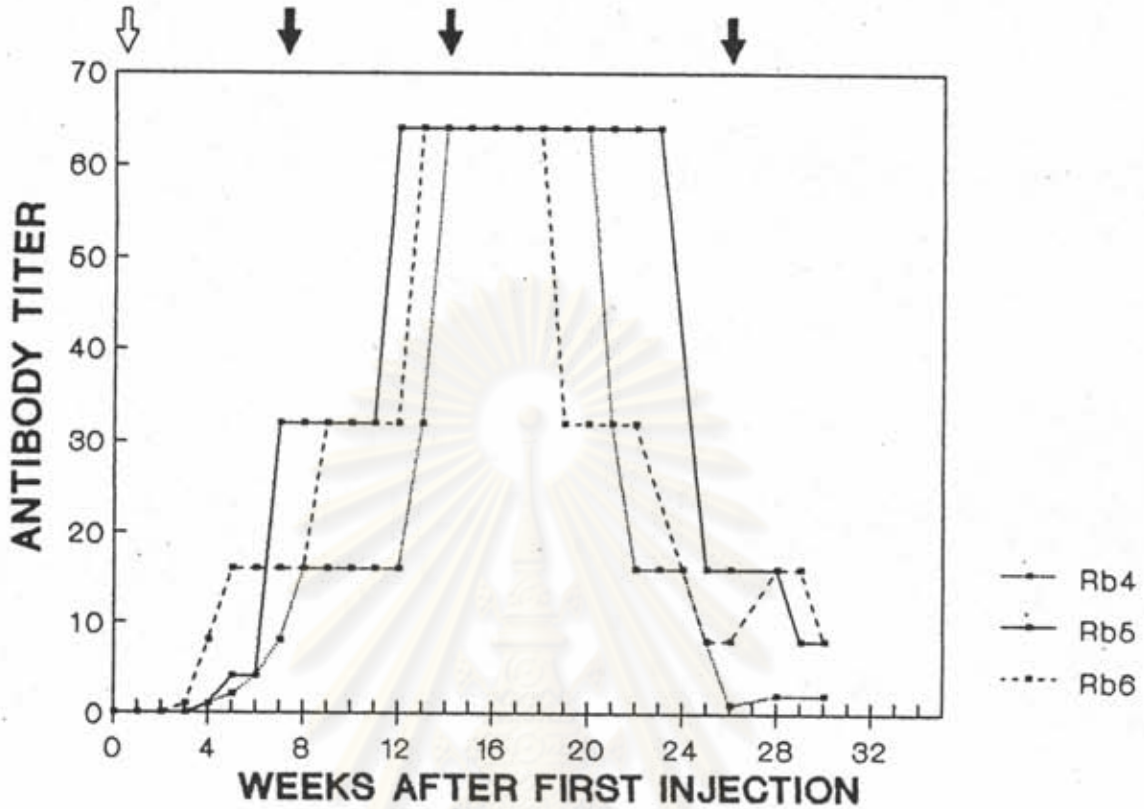
ใช้นิวโรทอกซินอิสระ 50 ไมโครกรัมผสมกับคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ฉีดให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 1 (Rb1, Rb2, Rb3) โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด หลังจากนั้น 5 สัปดาห์ฉีดซ้ำ (Booster injection) ตัวละ 330 ไมโครกรัม โดยวิธีเดียวกันและหลังจากนั้น 5 สัปดาห์จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยนิวโรทอกซินปริมาณเท่ากับการฉีดครั้งแรก

แอนติบอดีไตเตอร์ (วิธีเอาซ์เทอโลโมโนดิเฟ้วชัน) คือ จำนวนเท่าสูงสุดของการเจือจางแอนติซีรัมที่ยังทำให้เกิด precipitin line

⇩ แสดงการฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยนิวโรทอกซิน 50 ไมโครกรัม

⬇ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยนิวโรทอกซิน 330 ไมโครกรัม

รูปที่ 13 ปริมาณแอนตินิวโรทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยนิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต



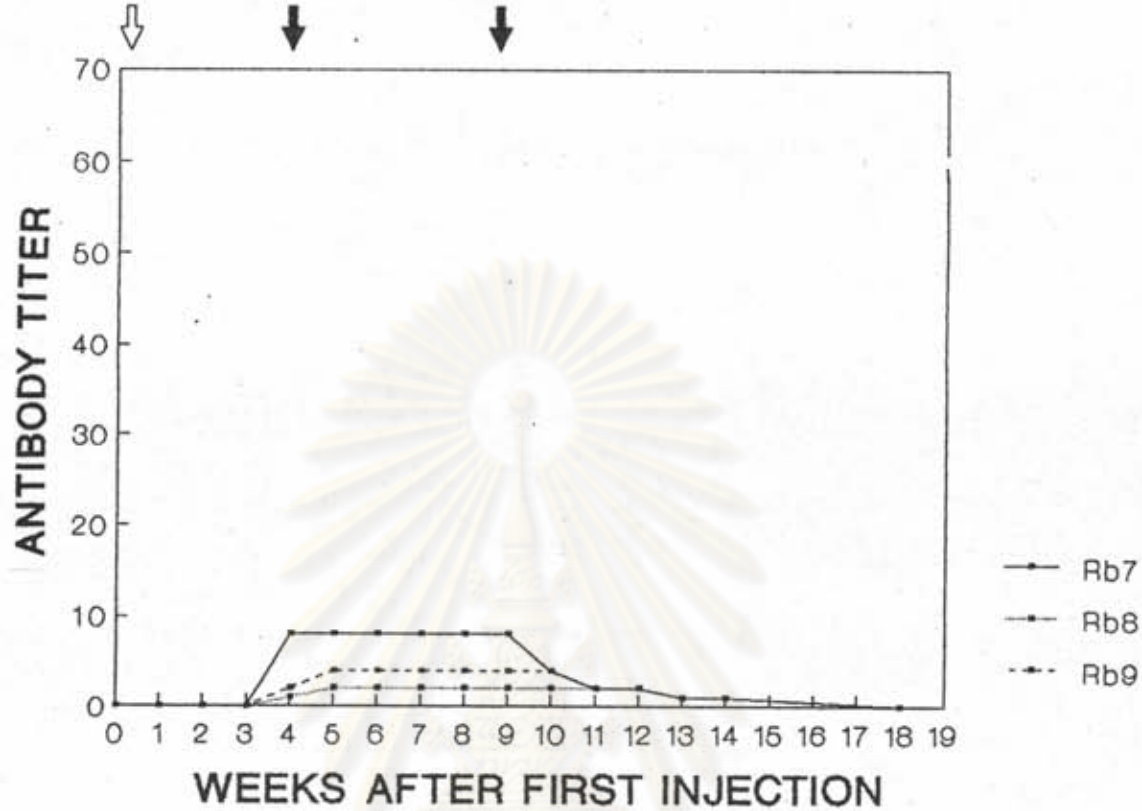
ใช้นิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัมผสมกับคอมพลีทฟรอยด์-แอดจูแวนท์ ฉีดให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 2 (Rb4, Rb5, Rb6) โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด หลังจากนั้น 8 สัปดาห์ ฉีดซ้ำ (Booster injection) ตัวละ 1 มิลลิกรัม โดยวิธีเดียวกัน และหลังจากนั้น 6 และ 12 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 ด้วยนิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกตปริมาณเท่ากับการฉีดครั้งแรก

แอนติบอดีไตเตอร์ (วิธีเอาช์เทอโรนีอิมมูโนดิฟฟิวชัน) คือ จำนวนเท่าสูงสุดของการเจือจางแอนติซีรัมที่ยังทำให้เกิด precipitin line

⇩ แสดงการฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยนิวโรทอกซินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม

⬇ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยนิวโรทอกซินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม

รูปที่ 14 ปริมาณแอนติคาร์ดิโอทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยคาร์ดิโอทอกซิน



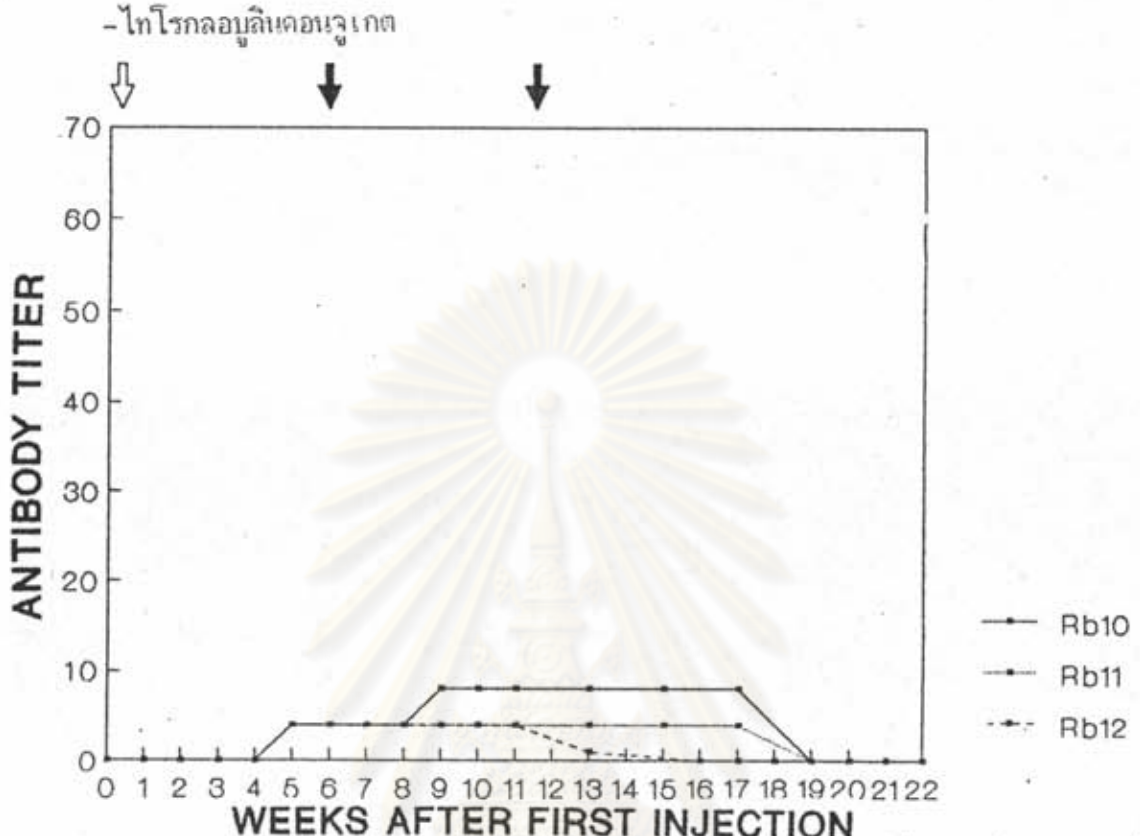
ใช้คาร์ดิโอทอกซินอีสาระ 1 มิลลิกรัมผสมกับคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ฉีดให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 3 (Rb7, Rb8, Rb9) โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ฉีดซ้ำ (Booster injection) ตัวละ 1 มิลลิกรัมโดยวิธีเดียวกันและหลังจากนั้น 5 สัปดาห์จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยคาร์ดิโอทอกซินปริมาณเท่ากับการฉีดครั้งแรก

แอนติบอดีไตเตอร์ (วิธีเอาส์เทอโลนีอิมมูโนดิฟฟิวชัน) คือ จำนวนเท่าสูงสุดของการเจือจางแอนติซีรัมที่ยังทำให้เกิด precipitin line

⇩ แสดงการฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยคาร์ดิโอทอกซิน 1 มิลลิกรัม

⬇ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยคาร์ดิโอทอกซิน 1 มิลลิกรัม

รูปที่ 15 ปริมาณแอนติคาร์ดิโอทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยคาร์ดิโอทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต



ใช้คาร์ดิโอทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัมผสมกับคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ ฉีดให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 4 (Rb10, Rb11, Rb12) โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด หลังจากนั้น 6 และ 5 สัปดาห์ฉีดซ้ำ (Booster injection) ครั้งที่ 2 และ 3 ตัวละ 1 มิลลิกรัมโดยวิธีเดียวกัน

แอนติบอดีไตเตอร์ (วิธีเอาช์เทอโลนีอิมมูโนดิฟฟิวชัน) คือ จำนวนเท่าสูงสุดของการเจือจางแอนติซีรัมที่ยังทำให้เกิด precipitin line

⇩ แสดงการฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยคาร์ดิโอทอกซินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม

⬇ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยคาร์ดิโอทอกซินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9.2 ผลการหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอเบนท์แอสเสย์

ซีรัมที่ได้จากกระต่ายทั้ง 4 กลุ่มข้างต้น เมื่อหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธีเอาซ์เทอโลนีอิมมูโนดิฟิวชันแล้ว ก็จะนำมาหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์ควบคู่ไปด้วย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความถูกต้องสูงกว่าวิธีแรก

กระต่ายกลุ่มที่ 1 (Rb1, Rb2, Rb3) ผลการหาปริมาณแอนติบอดีแสดงในรูปที่ 17 จะเห็นว่าหลังการฉีดครั้งแรกกระต่ายทั้ง 3 ตัวจะสร้างแอนติบอดีได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 5 มีไตเตอร์ประมาณ $7.0X10^3$, $3.0X10^4$ และ $5.0X10^4$ ในกระต่าย Rb2, Rb3 และ Rb1 ตามลำดับ การฉีดซ้ำครั้งแรกไม่ได้ทำให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นมากนัก ยกเว้นกระต่าย Rb3 ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมากและมีค่าไตเตอร์ประมาณ $1.6X10^5$ ในสัปดาห์ที่ 8 และหลังจากนั้นจึงลดลงอย่างรวดเร็ว หลังการฉีดซ้ำครั้งที่สองแอนติบอดีไตเตอร์ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมากนักและหลังสัปดาห์ที่ 11 กระต่ายทั้ง 3 ตัวจะมีแอนติบอดีไตเตอร์ลดลงตามลำดับ และเหลือปริมาณต่ำมากในสัปดาห์ที่ 16

กระต่ายกลุ่มที่ 2 (Rb4, Rb5, Rb6) ผลการหาปริมาณแอนติบอดีแสดงในรูปที่ 18 จะเห็นว่าหลังการฉีดครั้งแรกกระต่ายทั้ง 3 ตัวจะสร้างแอนติบอดีได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 8 มีไตเตอร์ประมาณ $6.0X10^4$, $2.0X10^5$ และ $6.0X10^5$ ในกระต่าย Rb4, Rb6 และ Rb5 ตามลำดับ การฉีดซ้ำครั้งแรกทำให้กระต่ายทั้ง 3 ตัวสร้างแอนติบอดีได้เพิ่มขึ้น และการฉีดซ้ำครั้งที่สองทำให้กระต่าย Rb4 และ Rb5 สร้างแอนติบอดีได้สูงสุดคือมีไตเตอร์ประมาณ $1.4X10^6$ ในสัปดาห์ที่ 17 และ 18 ตามลำดับ แต่กระต่าย Rb6 ไม่สามารถสร้างแอนติบอดีได้เพิ่มขึ้นหลังการฉีดซ้ำครั้งที่สอง และหลังสัปดาห์ที่ 21 กระต่ายทั้ง 3 ตัวจะมีแอนติบอดีไตเตอร์ลดลงเรื่อยๆ ถึงแม้จะมีการฉีดซ้ำครั้งที่ 3 ในสัปดาห์ที่ 26 ก็ตามและเหลือต่ำมากในสัปดาห์ที่ 30

กระต่ายกลุ่มที่ 3 (Rb7, Rb8, Rb9) ผลการหาปริมาณแอนติบอดี ดังแสดงในรูปที่19 จะเห็นว่าหลังการฉีดครั้งแรกกระต่ายทั้ง 3 ตัวจะสร้างแอนติบอดีได้เพิ่มขึ้น จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 4 มีไตเตอร์ประมาณ 30, 300 และ $1.2X10^3$ ในกระต่าย Rb8, Rb9 และ Rb7 ตามลำดับ การฉีดซ้ำครั้งแรกทำให้กระต่ายทั้ง 3 ตัว สร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน แต่การฉีดซ้ำครั้งที่สองไม่ค่อยมีผลต่อการสร้างแอนติบอดีมากนักและหลังสัปดาห์ที่ 11 แอนติบอดีไตเตอร์ในกระต่ายทั้ง 3 ตัวจะลดลงเรื่อยๆและเหลือต่ำมากในสัปดาห์ที่ 14(Rb8) และในสัปดาห์ที่18 (Rb7 และ Rb9)

กระต่ายกลุ่มที่ 4 (Rb10,Rb11,Rb12) ผลการหาปริมาณแอนติบอดีดังแสดงในรูปที่20

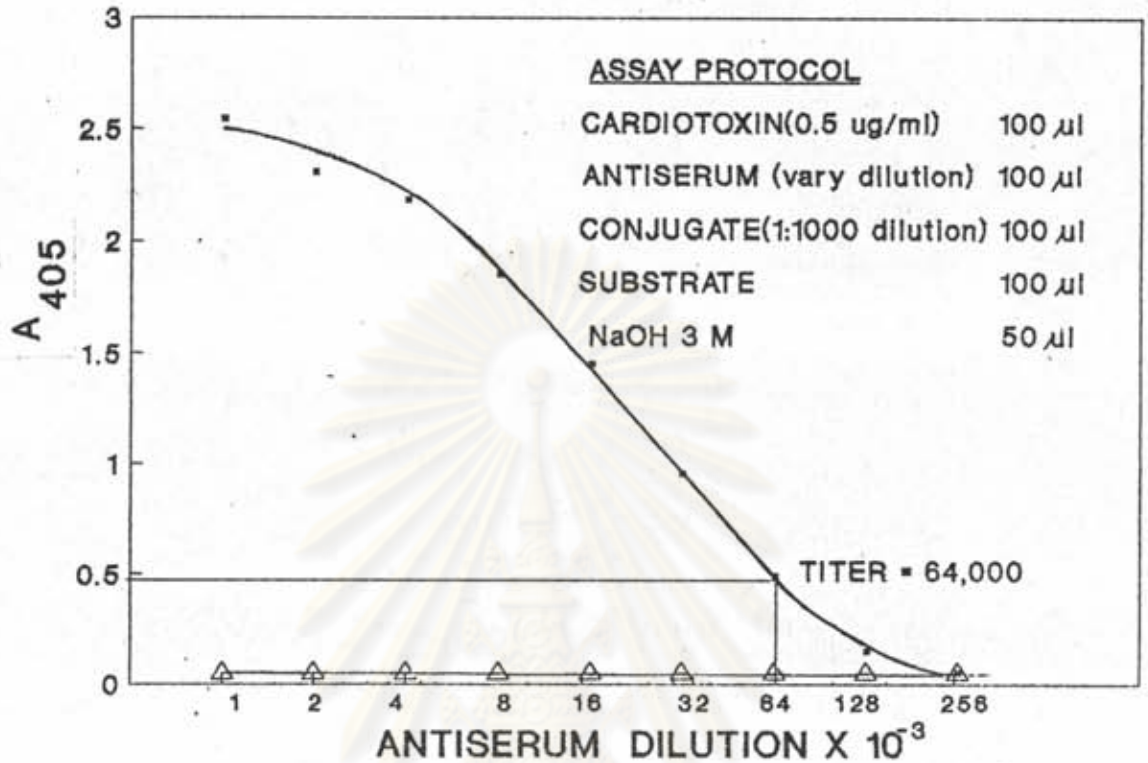
จะเห็นว่าหลังการฉีดครั้งแรกกระต่าย Rb10 จะสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างมากและการฉีดซ้ำทั้งสองครั้งทำให้กระต่าย(Rb10) สร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นและมีไตเตอร์สูงสุดประมาณ $9X10^4$ ในสัปดาห์ที่ 13 ซึ่งต่างจากกระต่าย Rb11 และ Rb12 ที่สร้างแอนติบอดีได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำตลอดการทดลอง

4.9.3 <u>แอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์ของกระต่ายที่มีไตเตอร์สูงสุดของแต่ละกลุ่ม</u>

กระต่ายทั้ง 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัวที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนตินิวโรทอกซิน(กลุ่มที่ 1 และ 2)และแอนติดาร์ดิโอทอกซิน(กลุ่มที่ 3 และ 4) จะพบว่ากระต่ายแต่ละตัวในแต่ละกลุ่มจะมีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อทอกซินได้ต่างกัน ในการเปรียบเทียบปริมาณของแอนติทอกซินที่ได้จากการกระตุ้นด้วยทอกซิน จึงได้เปรียบเทียบโดยใช้ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ที่สูงที่สุดที่ได้จากกระต่ายในแต่ละกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนว่าการใช้ทอกซินคอนจูเกตจะทำให้ได้แอนติทอกซินปริมาณสูงกว่าการใช้ทอกซินอิสระ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

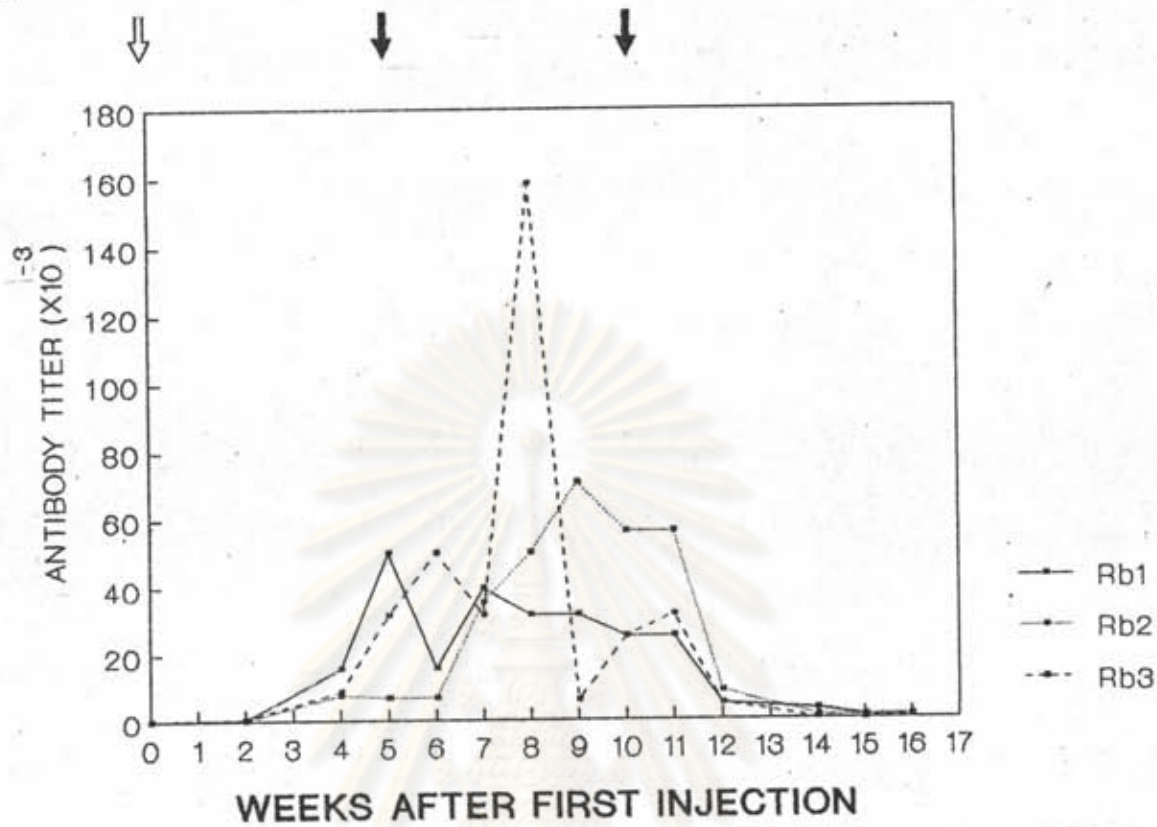
รูปที่ 16 การหาไตเตอร์ของซีรัมกระต่ายโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์



แอนติบอดีไตเตอร์ คือจำนวนเท่าของการเจือจางแอนติซีรัมที่ให้ค่า OD มากกว่า OD ของ baseline 0.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17 ปริมาณแอนตินิวโรทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยนิวโรทอกซิน



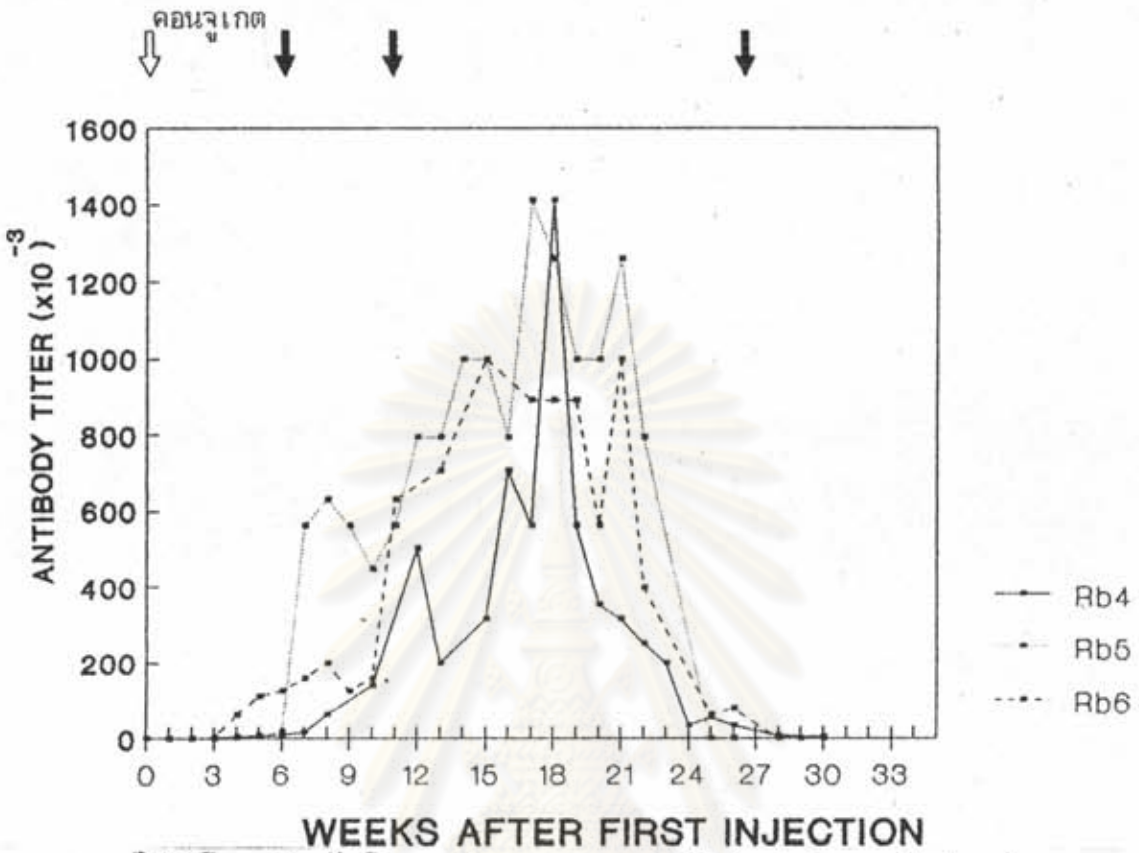
ใช้นิวโรทอกซินอิสระ 50 ไมโครกรัมผสมกับคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ฉีดให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 1 (Rb1, Rb2, Rb3) โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด หลังจากนั้น 5 สัปดาห์ฉีดซ้ำ (Booster injection) ตัวละ 330 ไมโครกรัม โดยวิธีเดียวกันและหลังจากนั้น 5 สัปดาห์จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยนิวโรทอกซินปริมาณเท่ากับการฉีดครั้งแรก

แอนติบอดีไตเตอร์ (วิธี ELISA) คือ จำนวนเท่าของการเจือจางแอนติซีรัมที่ให้ค่า OD มากกว่า OD ของ baseline 0.4

⇩ แสดงการฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยนิวโรทอกซิน 50 ไมโครกรัม

⬇ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยนิวโรทอกซิน330 ไมโครกรัม

รูปที่ 18 ปริมาณแอนตินิวโรทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยนิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลิน



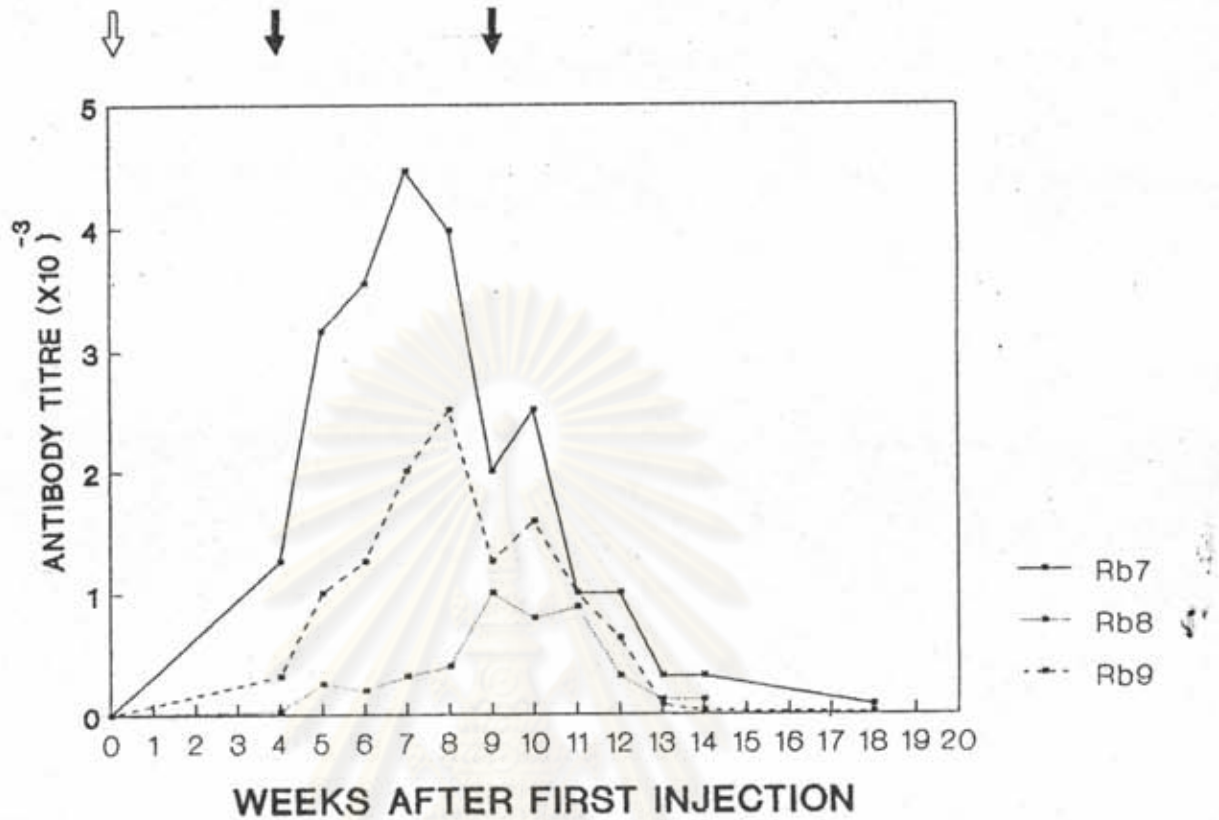
ใช้นิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัมผสมกับคอมพลีทฟรอยด์-แอดจูแวนท์ ฉีดให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 2 (Rb4, Rb5, Rb6) โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด หลังจากนั้น 8 สัปดาห์ ฉีดซ้ำ (Booster injection) ตัวละ 1 มิลลิกรัม โดยวิธีเดียวกัน และหลังจากนั้น 6 และ 12 สัปดาห์ จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 ด้วยนิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกตปริมาณเท่ากับการฉีดครั้งแรก

แอนติบอดีไตเตอร์ (วิธี ELISA) คือ จำนวนเท่าของการเจือจางแอนติซีรัมที่ให้ค่า OD มากกว่า OD ของ baseline 0.4

⇩ แสดงการฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยนิวโรทอกซินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม

⬇ แสดงการฉีดซ้ำ (booster injection) ด้วยนิวโรทอกซินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม

รูปที่ 19 ปริมาณแอนติคาร์ดิโอทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยคาร์ดิโอทอกซิน



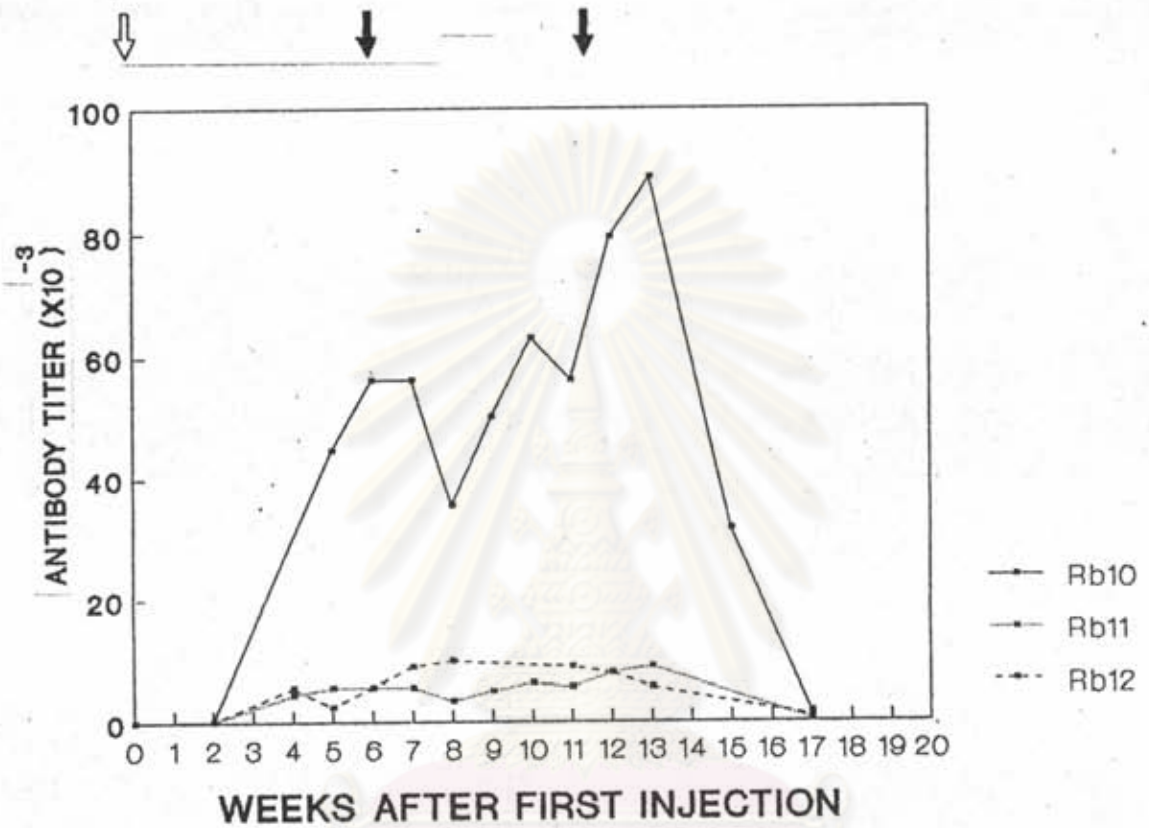
ใช้คาร์ดิโอทอกซินอิสระ 1 มิลลิกรัมผสมกับคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ฉีดให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 3(Rb7,Rb8,Rb9)โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ฉีดซ้ำ(Booster injection)ตัวละ 1 มิลลิกรัมโดยวิธีเดียวกันและหลังจากนั้น 5 สัปดาห์จึงฉีดซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยคาร์ดิโอทอกซินปริมาณเท่ากับการฉีดครั้งแรก

แอนติบอดีไตเตอร์(วิธี ELISA) คือ จำนวนเท่าของการเจือจางแอนติซีรัมที่ให้ค่า OD มากกว่า OD ของbaseline 0.4

⇩ แสดงการฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยคาร์ดิโอทอกซิน 1 มิลลิกรัม

⬇ แสดงการฉีดซ้ำ(booster injection)ด้วยคาร์ดิโอทอกซิน 1 มิลลิกรัม

รูปที่ 20 ปริมาณแอนติคาร์ดิโอทอกซินในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยคาร์ดิโอทอกซิน-ไทโรกลอบูลิน คอนจูเกต



ใช้คาร์ดิโอทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัมผสมกับคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ ฉีดให้กับกระต่ายกลุ่มที่ 4(Rb10,Rb11,Rb12)โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายๆจุด หลังจากนั้น 6 และ 5 สัปดาห์ฉีดซ้ำ(Booster injection)ครั้งที่ 2 และ 3 ตัวละ 1 มิลลิกรัมโดยวิธีเดียวกัน

แอนติบอดีไตเตอร์(วิธี ELISA) คือ จำนวนเท่าของการเจือจางแอนติซีรัมที่ให้ค่า OD มากกว่า OD ของbaseline 0.4

⇩ แสดงการฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยคาร์ดิโอทอกซินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม

⬇ แสดงการฉีดซ้ำ(booster injection)ด้วยคาร์ดิโอทอกซินคอนจูเกต 1 มิลลิกรัม

ตารางที่ 6 แอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอเบนท์แอสเสย์ของกระต่ายที่มีไตเตอร์สูงที่สุดของแต่ละกลุ่ม

ANTIGEN	ANTIBODY	HIGHEST ANTIBODY TITER
Ntx	ANTINEUROTOXIN	$1.6X10^{5}$ ($7.0X10^{4}$, $5.0X10^{4}$)
Ntx-Tg	ANTINEUROTOXIN	$1.4X10^{6}$ ($1.4X10^{6}$, $1.0X10^{6}$)
Ctx	ANTICARDIOTOXIN	$4.4X10^{3}$ ($2.5X10^{3}$, $1.0X10^{3}$)
Ctx-Tg	ANTICARDIOTOXIN	$8.9X10^{3}$ ($8.9X10^{3}$, $8.9X10^{3}$)

Ntx-Tg = neurotoxin-thyroglobulin conjugate
Ctx-Tg = cardiotoxin-thyroglobulin conjugate

ตัวเลขในวงเล็บ เป็นค่าไตเตอร์สูงสุดของกระต่ายอีก 2 ตัวของแต่ละกลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

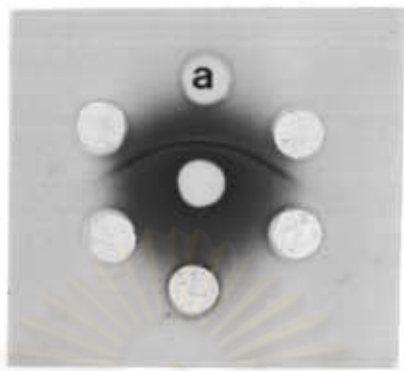
4.9.4 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมของพิษงูเห่าไทยโดยวิธีเอาซ์เทอ-โลนีอิมมูโนดิฟฟิวชัน

จากการทดสอบความจำเพาะของแอนตินิวโรทอกซิน ที่ได้จากการฉีดกระต่ายด้วยนิวโรทอกซิน-ไทโรกลอบูลินคอนจูเกต (นิวโรทอกซินจากพิษงูเห่าไทย) กับพิษงูอีก 5 ชนิด คือ งูสามเหลี่ยม (Bungarus fasciatus), งูแมวเซา (Vipera russelli), งูจงอาง (Ophiophagus hannah), งูกะปะ (Agkistrodon rhodostoma), งูเขียวหางไหม้ (Trimeresurus albolabris) โดยวิธีเอาซ์เทอโลนีอิมมูโนดิฟฟิวชันพบว่าแอนตินิวโรทอกซินของพิษงูเห่าไทยสามารถทำปฏิกิริยากับพิษงูเห่าไทย (crude venom) และทำปฏิกิริยาข้ามกับพิษงูจงอางสังเกตจากเกิด precipitin line ดังแสดงในรูปที่ 21 ก และ ข แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพิษงูที่เหลืออีก 4 ชนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 รูปแบบการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมกับพิษงูชนิดต่างๆ

(ก)



center well : rabbit antineurotoxin (Rb1)

peripheral wells : antigen 1 mg/ml.

a. พิษงูเห่าไทย (Naja naja kaouthia)

(ข)

center well : rabbit antineurotoxin (Rb1)

peripheral wells : antigen 1 mg/ml.

a. พิษงูเห่าไทย (Naja naja kaouthia)

b. พิษงูกะปะ (Agkistrodon rhodostoma)

c. พิษงูสามเหลี่ยม (Bungarus fasciatus)

d. พิษงูแมวเซา (Vipera russelli)

e. พิษงูจงอาง (Ophiophagus hannah)

f. พิษงูเขียวหางไหม้ (Trimeresurus albolabris)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.10 ผลการทดสอบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของแอนติซีรัม

หลังจากกระตุ้นกระต่าย 4 กลุ่ม ให้สร้างแอนติบอดีต่อโมเลกุลของทอกซินและทอกซินคอนจูเกต พบว่ากระต่ายทั้ง 4 กลุ่ม สามารถสร้างแอนติบอดีได้ในปริมาณต่างๆกันจึงรวม(pool) แอนติบอดีที่มีค่าไตเตอร์สูงมาทดสอบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทย ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า แอนตินิวโรทอกซินสามารถทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่า (crude venom) ได้น้อยกว่าแอนตินิวโรทอกซินคอนจูเกตเล็กน้อย คือ แอนตินิวโรทอกซินมีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษได้ 0.6 มิลลิกรัมพิษงูเห่าต่อแอนติซีรัม 5 มิลลิลิตร ส่วนของแอนติ-นิวโรทอกซินคอนจูเกตได้เป็น 0.8 มิลลิกรัม พิษงูเห่าต่อแอนติซีรัม 5 มิลลิลิตร คิดเป็นจำนวนเท่าของค่า LD_{50} ได้เท่ากับ 10.4 และ 13.9LD_{50} ตามลำดับ ในขณะที่แอนติคาร์ดิโอทอกซินและแอนติคาร์ดิโอทอกซินคอนจูเกต มีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษได้เท่ากัน คือ 0.1 มิลลิกรัมพิษงูเห่าต่อแอนติซีรัม 5 มิลลิลิตร หรือคิดเป็น 1.7LD_{50} จะเห็นได้ว่าแอนติคาร์ดิโอ-ทอกซินเกือบจะไม่สามารถทำลายความเป็นพิษได้เลย

เนื่องจากพิษงูเห่ามีทั้งนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินเป็นส่วนประกอบจึงได้ทดลองใช้แอนตินิวโรทอกซินคอนจูเกตผสมกับแอนติคาร์ดิโอทอกซินคอนจูเกตในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่า ปรากฏว่าสามารถทำลายความเป็นพิษได้ 0.6 มิลลิกรัมพิษงูเห่าต่อแอนติซีรัม 5 มิลลิลิตร แสดงว่าการใช้แอนติบอดีทั้งสองชนิดร่วมกันทำให้มีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษเพิ่มขึ้นมากกว่าผลรวมของการใช้แยกกัน นอกจากนั้นยังพบว่าแอนตินิวโรทอกซินคอนจูเกตและแอนติคาร์ดิโอทอกซินคอนจูเกต สามารถทำลายความเป็นพิษของนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินได้ดีกว่าการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่า (crude venom) ทั้งนี้เนื่องจากแอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้มีความจำเพาะต่อทอกซินมากกว่าพิษงูเห่า

ถ้าเปรียบเทียบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษระหว่างแอนตินิวโรทอกซินและแอนติคาร์ดิโอทอกซินกับแอนติเวนินที่ได้จากม้า พบว่าแอนติเวนินจากม้ามีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษได้ดีกว่า โดยเฉพาะแอนติเวนินจากม้าที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ทั้งนี้อาจเนื่องจากแอนติเวนินจากม้ามีปริมาณแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าสูงกว่า

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของแอนติซีรัม

ANTIGEN	ANTISERUM	NEUTRALIZATION POTENCY (mg antigen/5 ml antiserum	PROTECTIVE VALUE
CRUDE VENOM	CRUDE RABBIT ANTI-NTX	0.6	10.4 LD_{50} VENOM
	CRUDE RABBIT ANTI NTX-Tg	0.8	13.9 LD_{50} VENOM
	CRUDE RABBIT ANTI-CTX	0.1	1.7 LD_{50} VENOM
	CRUDE RABBIT ANTI CTX-Tg	0.1	1.7 LD_{50} VENOM
CRUDE VENOM	CRUDE RABBIT ANTI NTX-Tg + ANTI CTX-Tg	0.6	10.4 LD_{50} VENOM
CRUDE VENOM	CRUDE HORSE ANTIVENOM	1.4	24.3 LD_{50} VENOM
	PURIFIED HORSE ANTIVENOM	3.4	59.0 LD_{50} VENOM
NEUROTOXIN	CRUDE RABBIT ANTI NTX-Tg	1.2	66.7 LD_{50} NTX
CARDIOTOXIN	CRUDE RABBIT ANTI CTX-Tg	1.2	2.4 LD_{50} CTX

Ntx = Neurotoxin

Ntx-Tg = Neurotoxin-thyroglobulin conjugate

Ctx = Cardiotoxin

Ctx-Tg = Cardiotoxin-thyroglobulin conjugate

ประสิทธิภาพในการทำลายความเป็นพิษ(Neutralization potency) คือ จำนวนมิลลิกรัมของพิษงูที่ถูกทำลายความเป็นพิษโดยแอนติซีรัม 5 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย