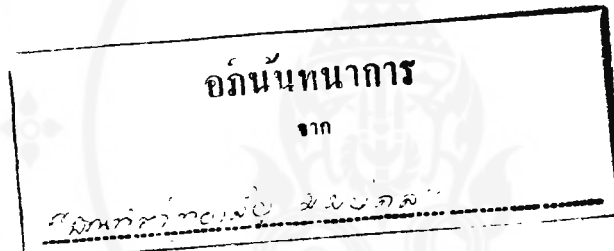




7 JUL 1993

A STUDY ON THE PEPSIN DIGESTION OF THE HORSE
ANTI-SNAKE VENOM

SIT THIRAPAKPOOMANUNT



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1993

23161

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการย่อยเซรุ่มแก๊พิษงูที่ผลิตจากม้าด้วยเอนไซม์เปปซิน
ผู้วิจัย	สิทธิ์ ธีระภาคภูมิอนันต์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	กวี รัตนบรรณางกูร, Ph.D. พรชัย มาตังคสมบัติ, M.D., Ph.D. นภาพร บานชื่น, M.D., Ph.D. ชโลบล อยู่สุข, Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	19 เมษายน พ.ศ. 2536

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาการย่อยเซรุ่มแก๊พิษงูที่ผลิตจากม้า ด้วยเอนไซม์เปปซิน ภายใต้สภาวะต่างๆ โดยมีเป้าหมายที่จะหาสภาวะการย่อยที่เหมาะสมได้ทำการเตรียมแอนติบอดีของกระต่ายที่สร้างต่อ IgG/IgG(T), F(ab')₂ และ Fc ของม้า และทำให้บริสุทธิ์ด้วย affinity chromatography จากการใช้แอนติบอดีเหล่านี้ของกระต่ายในการพัฒนาวิธี ELISA ที่มีความจำเพาะต่างๆซึ่งเมื่อใช้ร่วมกันแล้วสามารถตรวจวัด IgG/IgG(T) และ F(ab')₂ ของม้า(ที่สร้างต่อพิษงู) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 5 - 50 x 10⁻⁵ มิลลิโมลาร์

ได้ทำการย่อยเซรุ่มแก๊พิษงูด้วยเอนไซม์เปปซินในสภาวะต่างๆ รวม 6 สภาวะ คือ สภาวะ A เปปซินเข้มข้น 0.15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) pH 3.5; สภาวะ B เปปซินเข้มข้น 0.15%, pH 3.0; สภาวะ C เปปซินเข้มข้น 0.15%, pH 3.25; สภาวะ D เปปซินเข้มข้น 0.15%, pH 3.75; สภาวะ E เปปซินเข้มข้น 0.1125%, pH 3.5; สภาวะ F เปปซินเข้มข้น 0.1875%, pH 3.5 โดยทำการย่อยที่อุณหภูมิ 25°C และให้เวลาย่อยนาน 24 ชั่วโมง ระหว่างเวลาดังกล่าวได้นำตัวอย่างจากปฏิกิริยาการย่อยมาตรวจวัดปริมาณของ IgG/IgG(T) และ F(ab')₂ ด้วย ELISA's พบว่าอัตราการย่อยเร็วมากที่สุดที่ pH ต่ำ หรือที่ความเข้มข้น

ชั้นของเอนไซม์สูง และส่วนใหญ่ของการย่อยจะให้โมเลกุลที่ต้องการคือ $F(ab')_2$ สูงสุดที่ 2 ชั่วโมงของการย่อย โดยได้โมเลกุล $F(ab')_2$ จากผลการย่อยในปริมาณ ประมาณ 60% ของโมเลกุลภูมิต้านทานพิษงูตั้งต้น

การศึกษานี้จะนำมาซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเซรุ่มแก่พิษงูที่มี ประสิทธิภาพสูง และลดผลข้างเคียงที่ทำให้เกิดการแพ้เซรุ่มในผู้ป่วยให้เกิดน้อยที่สุด



Thesis Title A Study on the Pepsin Digesting of the
Horse Anti-snake Venom

Name Sit Thirapakpoomanunt

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Kavi Ratanabanangkoon, Ph.D.

Pornchai Matangkasombut, M.D., Ph.D.

Napatawn Banchuin, M.D., Ph.D.

Chalobon Yoosook, Ph.D.

Date of Graduation 19 April B.E. 2536 (1993)

ABSTRACT

A study was carried out aiming at optimizing the pepsin digestion reaction of horse antiserum against snake venoms. Rabbit antibodies, specific to horse antivenom IgG/IgG(T), horse F(ab')₂ and horse Fc, were prepared and purified by using different affinity adsorbents. These rabbit antibodies were used to develop ELISA's which, when used together, quantitated horse IgG/IgG(T) and horse F(ab')₂ over a linear concentration range between 5-50 x 10⁻⁵ mM.

Horse antivenom was digested with pepsin under the following 6 conditions: Condition A, pepsin 0.15% (w/v), pH 3.5; Condition B, pepsin 0.15% (w/v), pH 3.0; Condition C, pepsin 0.15% (w/v), pH 3.25; Condition D, pepsin 0.15% (w/v), pH 3.75; Condition E, pepsin 0.1125% (w/v), pH 3.5

and Condition F, pepsin 0.1875% (w/v), pH 3.5. The reaction temperature was 25 °C and the digestion was carried out over a period of 24 hours. Aliquots, from each reaction Condition, were taken at various time intervals to assess the extent of digestion by measuring the concentrations of the immunologically active antivenom IgG/IgG(T) and the F(ab')₂ product. It was found that the digestion rate was faster at lower pH or at higher enzyme concentration. Under most of the conditions, the starting IgG(T) were all digested within 2 hours with the concomitant appearance of F(ab')₂. Using 0.15% pepsin, digestion at pH 3.5 (Condition A), the highest level of immunologically active F(ab')₂ was observed with a recovery of antibody activity of about 60%.

This study should lead to the optimization of the pepsin digestion reaction of horse antivenom for the preparation of antivenom refined globulin.