A STUDY ON THE REFINEMENT OF HORSE ANTIVENOM BY SALT FRACTIONATION AND ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

NITTAYA TREAMWATTANA

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1995

TH
N733a
1995

Copyright by Mahidol University

20648

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาการทำเซรุ่มแก้พิษงูให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอน และวิธีโครมาโตกราฟี่ บน Ion-exchangers.

ผู้วิจัย นิตยา เตรียมวัฒนา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พยาธิชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วีณา เชิดบุญชาติ Ph.D.

กวี รัตนบรรณางกูร Ph.D.

รัชนีย์ อุดมแสงเพ็ชร Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 29 พฤษภาคม พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

เซรุ่มแก้พิษงูที่ใช้อยู่ปัจจุบัน เตรียมโดยการสร้างภูมิคุ้มกันต่อพิษงูในม้า แล้วนำเซรุ่มม้ามาทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์เปปซิน และตามด้วยการตกตะกอนภูมิคุ้มกันประเภท $F(ab)'_2$ ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ยังไม่มีการศึกษาอย่างแน่ชัดว่าจากขบวนการดังกล่าวได้ภูมิคุ้มกันคืนมาเท่าใด แต่เป็นที่เชื่อว่าประมาณร้อยละ 50 การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อหาขบวนการอื่นที่อาจจะเพิ่ม recovery ของภูมิคุ้มกันโดยเน้นขบวนการที่ใช้โครมาโตกราฟี่บน ion-exchanger การศึกษานี้ได้ใช้ Enzyme-linked immunosorbent assay ที่ตรวจวัดเฉพาะภูมิคุ้มกันต่อพิษประสาท (post-synaptic neurotoxin) ของงูเห่าไทย เป็นวิธีหาปริมาณภูมิคุ้มกันในขั้นตอนต่างๆ ของขบวนการที่ศึกษา

ได้พบว่าเมื่อนำเซรุ่มของม้ามาย่อยด้วยเอ็นไซม์เปปซินที่ pH 3.8 เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่ 37°ซ ภูมิคุ้มกันต่อพิษงูจะถูกย่อยกลายเป็น $F(ab)'_2$ จนหมดสิ้น การตกตะกอน

Copyright by Mahidol University

แบบลำดับส่วนของ $F(ab)'_2$ ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระหว่าง 30%-50% ของความเข้มข้นอิ่มตัวจะได้ภูมิคุ้มกันคืนมาร้อยละ 53 โดยความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.93 เท่า

การทำโครมาโตกราฟี่บน DEAE-cellulose แบบ step-wise gradient ไม่สามารถแยก IgG(T) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันต่อพิษงู และ IgG ซึ่งไม่เป็นภูมิคุ้มกันต่อพิษงู แต่เมื่อทำโครมาโตกราฟี่บน Q-Sepharose FF โดยใช้ continuous gradient สามารถจะแยก immunoglobulins ทั้งสองออกจากกันได้ นอกจากนี้ Q-Sepharose FF ยังสามารถแยกภูมิคุ้มกันประเภท $F(ab)'_2$ ออกจากโปรตีนอื่นๆได้ ไม่ว่าจะเริ่มต้นด้วยเซรุ่มม้าที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์เปปซิน หรือ immunoglobulins ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วย่อยด้วยเปปซิน พบว่าการใช้ Q-Sepharose FF ในการแยกภูมิคุ้ม $F(ab)'_2$ จากเซรุ่มม้าที่ย่อยด้วยเปปซินจะได้ภูมิคุ้มกันคืนมาร้อยละ 73 และมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 2.08 เท่า เนื่องจากการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูจากม้าเป็นขั้นตอนที่มีราคาสูงมาก ขบวนการแยกภูมิคุ้มกัน $F(ab)'_2$ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี่ที่ได้ผลภูมิคุ้มกันคืนมาสูงกว่า อาจจะคุ้มกับค่าสารเคมี และค่าปฏิบัติการที่สูงขึ้นของวิธีการดังกล่าว

Copyright by Mahidol University

Thesis title A Study on the Refinement of Horse Antivenom by Salt Fractionation and Ion-Exchange Chromatography.

Name Nittaya Treamwattana

Degree Master of Science (Pathobiology)

Thesis Supervisory Committee:

Vina Churdboonchart Ph.D.

Kavi Ratanabanangkoon Ph.D.

Rachanee Udomsangpetch Ph.D.

Date of Graduate 29 May B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

Therapeutic antivenoms against snakes are currently prepared by pepsin digestion of horse hyperimmune serum followed by ammonium sulfate fractional precipitation of $F(ab)'_2$. The recovery of antibody activity from this process has not been accurately determined but is believed to be about 50 percent. The present study was undertaken to find an alternative process with improved recovery of antibody activity, with emphasis on the use of ion-exchange column chromatography. An ELISA which specifically detects the antibody against the principal postsynaptic neurotoxin of the Thai cobra, was used to quantitate the antibody during fractionation.

Copyright by Mahidol University

It was found that pepsin digestion of horse hyperimmune serum at pH 3.8 for 18 hr. at 37°C resulted in complete cleavage of the horse antibody to $F(ab)'_2$.

Fractionation of antivenom $F(ab)'_2$ by ammonium sulfate precipitation was done at 30% to 50% saturated salt solution. The recovery of antibody from this process was 53% with 1.93 fold of purification.

Using ion-exchange chromatography, the horse antivenom antibody of IgG(T) could partially be separated from the non-antivenom IgG on DEAE-cellulose. Better separation was achieved on Q-Sepharose FF. Moreover, the antivenom $F(ab)'_2$ from either pepsin-digested ammonium sulfate precipitated immunoglobulins or the pepsin-digested hyperimmune serum, could be separated from other non-antivenom proteins on Q-Sepharose FF using a linear salt gradient. It was found that fractionation of pepsin-digested hyperimmune serum on Q-Sepharose FF resulted in 73% recovery of antibody activity with 2.08 fold of purification. Considering the high cost of production of horse antivenom sera, this significantly higher antibody recovery may offset the additional material and operational costs of chromatography.

Copyright by Mahidol University