RESEARCH ARTICLE

Study of Serum Proteins of Captive Elephants in Chonburi Province by Cellulose Acetate Electrophoresis

Rachan Appaicha[1], Jatuporn Noosud[2], Apassara Choothesa[1*]

Abstract

Objective—To study the serum protein patterns by cellulose acetate electrophoresis and to determine the concentrations of serum proteins of captive Asian elephants in Chonburi province.

Materials and Methods—Serum of 31 captive elephants (range in age 3-50 years) from Siam Elephants Camp (Group1) and 24 captive elephants (range in age 2-30 years) from The Million Year Stone Park & Pattaya Croccodile Farm (Group2) were used in this study. The serum protein patterns and serum protein concentrations of the serum samples were determined by cellulose acetate electrophoresis and Quantity One Analysis Software®.

Results—In both groups of elephants, 6 bands of serum protein patterns which moved from cathode to anode were observed. These 6 bands were composed of albumin, alpha1-globulin, alpha2-globulin, beta1-globulin, beta2-globulin and gamma-globulin, respectively. The concentrations (mean±SEM) of albumin, alpha1-globulin, alpha2-globulin, beta1-globulin, beta2-globulin , gamma-globulin and A:G ratio in the serum of elephants in Group 1 were 2.09±0.16 g/dL, 0.66±0.06 g/dL, 1.12±0.12 g/dL, 1.06±0.08 g/dL, 1.46±0.12 g/dL, 1.19±0.08 g/dL and 0.41±0.04, respectively. The mean concentrations of albumin, alpha1-globulin, alpha2-globulin, beta1- globulin, beta2-globulin, gamma-globulin and A:G ratio in the serum of elephants in Group2 were 1.77±0.12 g/dL, 0.59±0.02 g/dL, 1.29±0.10 g/dL, 0.80±0.05 g/dL, 1.12±0.09 g/dL ,0.73±0.10 g/dL and 0.39±0.03, respectively. Gender had no influence on serum protein concentrations.

Conclusion—The combination of cellulose acetate electrophoresis and Quantity One Analysis Software® can be used to study serum protein patterns and concentrations of serum proteins of captive elephants in Chonburi province.

KKU Vet J. 2012;22(2):124-131. http://vmj.kku.ac.th/

Keywords: Serum protein; Cellulose acetate; Electrophoresis; Asian captive elephants

[1]Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok, 10900, Thailand.

[2]Department of Companion Animals Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok, 10900, Thailand.

[*]**Corresponding author** E-mail: fvetapsc@ku.ac.th

การศึกษาซีรัมโปรตีนของช้างเลี้ยงในจังหวัดชลบุรี โดยเซลลูโลสอะซิเตต อิเล็กโตรโฟรีซิส

ราชันย์ อัพภัยชา[1], จตุพร หนูสุด[2], อาภัสสรา ชูเทศะ[1*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษารูปแบบและความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนของช้างเลี้ยงซึ่งเป็นช้างเอเชียที่อยู่ในจังหวัดชลบุรี โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ช้างเลี้ยงกลุ่มที่ 1 จากปางช้างสยาม อ.บางละมุง จ.ชลบุรี จำนวน 31 เชือก(อายุ 3-50 ปี) และกลุ่มที่2 ช้างเลี้ยงจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้ พัทยา อ.บางละมุง จ.ชลบุรี จำนวน 24 เชือก(อายุ 2-30 ปี) นำมาใช้ในการศึกษารูปแบบและความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนโดยใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล ควอนติตี้ วัน

ผลการศึกษา โดยการใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส พบรูปแบบของซีรัมโปรตีนประกอบด้วย 6 แถบในตัวอย่างช้างทั้งสองกลุ่ม โปรตีนมีการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวกเรียงลำดับการเคลื่อนที่เร็วที่สุด คือ อัลบูมิน แอลฟ่า1-กลอบบูลิน แอลฟ่า2-กลอบบูลิน เบต้า1- กลอบบูลิน เบต้า2-กลอบบูลิน และ แกมม่า-กลอบบูลิน มีค่าความเข้มข้นเฉลี่ย (mean±SEM) ในช้างกลุ่มที่ 1 คือ อัลบูมิน 2.09±0.16 g/dL แอลฟ่า1-กลอบบูลิน 0.66±0.06 g/dL แอลฟ่า2-กลอบบูลิน 1.12±0.12 g/dL เบต้า1-กลอบบูลิน 1.06±0.08 g/dL เบต้า2-กลอบบูลิน 1.46±0.12 g/dL และแกมม่า-กลอบบูลิน 1.19±0.08 g/dL อัตราส่วนอัลบูมินต่อกลอบบูลินเท่ากับ 0.41±0.04 ส่วนค่าความเข้มข้นเฉลี่ยในช้างกลุ่มที่ 2 คือ อัลบูมิน 1.77±0.12 g/dL แอลฟ่า1-กลอบบูลิน 0.59±0.02 g/dL แอลฟ่า2-กลอบบูลิน 1.29±0.10 g/dL เบต้า1-กลอบบูลิน 0.80±0.05 g/dL เบต้า2-กลอบบูลิน 1.12±0.09 g/dL และ แกมม่า-กลอบบูลิน 0.73±0.10 g/dL อัตราส่วนอัลบูมินต่อกลอบบูลินเท่ากับ 0.39±0.03

ข้อสรุป การใช้เทคนิคเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส ร่วมกับการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล ควอนติตี้ วัน สามารถใช้ศึกษารูปแบบของซีรัมโปรตีนและหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนในซีรัมของช้างเลี้ยง ใน จ.ชลบุรี

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2555;22(2):124-131. http://vmj.kku.ac.th/

คำสำคัญ: ซีรัมโปรตีน เซลลูโลสอะซิเตต อิเล็กโตรโฟรีซิส ช้างเลี้ยง

[1]ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

[2]ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: fvetapsc@ku.ac.th

บทนำ

โปรตีนในซีรัมมีประจุสุทธิเป็นลบ ที่พีเอชเป็นด่าง (pH 8.6) จึงมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบ (cathode) ไปยังขั้วบวก (anode) ความหนาแน่นประจุของโปรตีนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันจึงสามารถแยกออกจากกันโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งทิศทางและอัตราการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับจำนวนของประจุบวกหรือลบของโปรตีน ขนาดของโปรตีน ความเข้มของสนามไฟฟ้า และตัวกลาง (support medium) [1] ซีรัมโปรตีนถูกใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงในชีวเคมีคลินิกและเป็นวิธีที่นิยมใช้ทางคลินิกการแพทย์

เซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นวิธีที่ง่าย เที่ยงตรง และนิยมใช้ทั่วไป โปรตีนในซีรัมมีประจุเป็นลบในบาร์บิทอลบัฟเฟอร์ (barbital buffer) ที่พีเอช 8.6 จึงมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วบวก โดยอัลบูมินเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ไกลที่สุดเนื่องจากมีประจุเป็นลบมากจึงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าใกล้ขั้วบวก ในขณะที่กลอบบูลินมีประจุเป็นลบน้อยจึงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ช้ากว่าอัลบูมินและสามารถแยกออกเป็น แอลฟ่า-เบต้า-และแกมม่า-กลอบบูลินตามลำดับโดยที่แกมม่า-กลอบบูลินอาจจะไม่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ไปขั้วลบ ในสัตว์แต่ละชนิดมีความแตกต่างของกลอบบูลินโดยขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของสัตว์แต่ละชนิด เช่น บางชนิดอาจมี 1 หรือ 2 แอลฟ่า-เบต้า-หรือแกมม่า-กลอบบูลิน [1,2]

การศึกษาซีรัมโปรตีนในเลือดช้างแอฟริกาโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสแยกโปรตีนออกได้เป็นอัลบูมิน แอลฟ่า1-กลอบบูลิน แอลฟ่า2-กลอบบูลิน เบต้า1-กลอบบูลิน เบต้า2-กลอบบูลิน และแกมม่า-กลอบบูลินและมีรายงานค่าอัตราส่วนอัลบูมินต่อกลอบบูลิน [3,5-8] การศึกษาในช้างเอเชียสามารถแยกโปรตีนในซีรัมออกได้เป็น 5 แถบ และมีรายงานค่าซีรัมโปรตีนรวมทั้งค่าอัตราส่วนอัลบูมินต่อกลอบบูลิน [4] ในประเทศไทยมีการศึกษาค่าซีรัมโปรตีนในช้างเลี้ยงในหลายภูมิภาค มีรายงานค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน ค่าโปรตีนในซีรัมและค่าอัตราส่วนอัลบูมินต่อกลอบบูลิน [9] จากข้อมูลเบื้องต้นเท่าที่ทราบยังไม่มีข้อมูลการศึกษารูปแบบของซีรัมโปรตีนและความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนแต่ละชนิดในช้างเลี้ยงในประเทศไทย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษารูปแบบและค่าความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนในช้างเลี้ยงใน จ. ชลบุรี

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ช้างเลี้ยงที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นช้างเลี้ยงใน จ.ชลบุรี แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นช้างเลี้ยงจากปางช้างสยาม จำนวน 31 เชือก (เพศผู้ 4 เชือก เพศเมีย 27 เชือก) อายุระหว่าง 3-50 ปี กลุ่มที่ 2 เป็นช้างจากอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้ พัทยา จำนวน 24 เชือก (เพศผู้ 3 เชือก เพศเมีย 21 เชือก) อายุระหว่าง2-30 ปี ช้างทุกเชือกมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี มีโปรแกรมการฉีดวัคซีนและถ่ายพยาธิตามคำแนะนำของสัตวแพทย์เป็นประจำทุกปี ซึ่งช้างทุกเชือกไม่แสดงอาการป่วยทางคลินิก

ในวันที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากช้างทั้ง 2 กลุ่ม โดยเจาะเก็บจากหลอดเลือดดำขนาดใหญ่ที่ใบหู ถ้าเป็นช้างที่ตัวสูงต้องให้ช้างหมอบต่ำลง หรือให้นอนตะแคง หรือขึ้นไปยืนเทียบโรงเรือน ทำความสะอาดผิวหนังด้วยแอลกอฮอล์ เจาะเลือดด้วยกระบอกฉีดยา 10 ซีซี และเข็มฉีดยาขนาดเบอร์18 ยาวนิ้วครึ่ง เชือกละ 10 มิลลิลิตร โดยแบ่งเลือดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกใส่เลือดประมาณ 5 มิลลิลิตร ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA เคลือบอยู่ เพื่อตรวจค่าทางโลหิตวิทยา และส่วนที่ 2 ใส่เลือดประมาณ 5 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปปั่นแยกซีรัมโดยใช้เครื่องเซนตริฟิวซ์ แยกโปรตีนในซีรัมโดยวิธีเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส (Helena Laboratory, U.S.A.) โดยใช้แผ่นเซลลูโลสอะซิเตต (Titan® III Cellulose Acetate Plate) ขนาด 94 x 76 มิลลิเมตรและสารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-บาร์บิทอล-โซเดียม บาร์บิทอล (Electra® HR buffer) พีเอช 8.8 เปรียบเทียบกับซีรัมโปรตีนมาตรฐานของมนุษย์[10] ปรับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 180 โวลล์ เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเสร็จแล้ว ย้อมสีโปรตีนโดยแช่แผ่นเซลลูโลสอะซิเตตในสารละลายสีย้อมพองโซเอส (ประกอบด้วย 0.5% พองโซเอส ในสารละลาย 3.5% กรดซัลโฟซาลิไซลิก และ 3.5% กรดไตรคลอโรอะซิติก) และล้างสีย้อมใน 5% กรดอะซิติก นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตมาหารูปแบบของซีรัมโปรตีนและความเข้มข้นของโปรตีนในซีรัมโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล ควอนติตี้ 1 (BIO-RAD, U.S.A.) และหาความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนรวม (total serum protein) โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์เคมีคลินิกอัตโนมัติ (ILab 650, Germany) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนในซีรัมของช้างทั้งสองกลุ่มด้วยวิธี two sample t-test โดยใช้โปรแกรม NCSS 2007

ผลการศึกษา

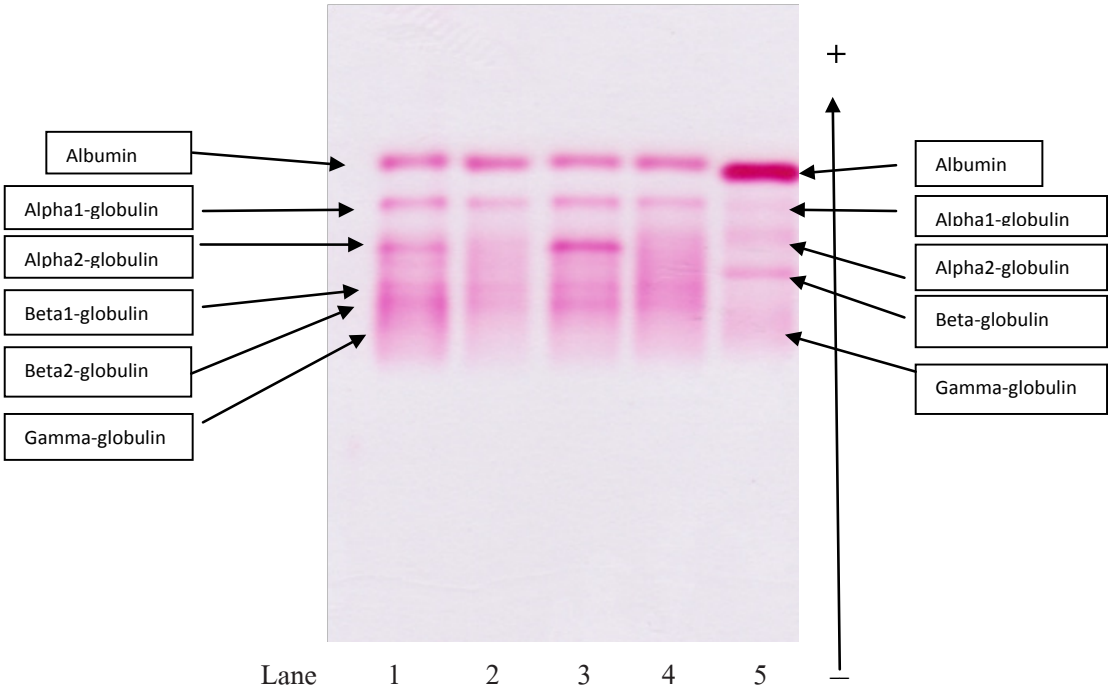
รูปแบบซีรัมโปรตีนของช้างเลี้ยง (**Figure 1, 2**) แสดง 6 แถบทั้งสองกลุ่ม โปรตีนมีการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยเรียงลำดับการเคลื่อนที่เร็วที่สุดไปหาการเคลื่อนที่ช้าที่สุดดังนี้ อัลบูมิน แอลฟ่า1-กลอบบูลิน แอลฟ่า2-กลอบบูลิน เบต้า1-กลอบบูลิน เบต้า2-กลอบบูลิน และ แกมม่า-กลอบบูลิน ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนในกลุ่มที่1 คือ อัลบูมิน 2.09±0.16 g/dL แอลฟ่า1-กลอบบูลิน 0.66±0.06 g/dL แอลฟ่า2-กลอบบูลิน 1.12±0.12 g/dL เบต้า1-กลอบบูลิน 1.06±0.08 g/dL เบต้า2-กลอบบูลิน 1.46±0.12 g/dL และ แกมม่า-กลอบบูลิน 1.19±0.08 g/dL และ อัตราส่วนอัลบูมินต่อกลอบบูลินเท่ากับ 0.41±0.04 ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนในกลุ่มที่2 คือ อัลบูมิน 1.77±0.12 g/dL แอลฟ่า1-กลอบบูลิน 0.59±0.02 g/dL แอลฟ่า2-กลอบบูลิน 1.29±0.10 g/dL เบต้า1-กลอบบูลิน 0.80±0.05 g/dL เบต้า2-กลอบบูลิน 1.12±0.09 g/dL และ แกมม่า-กลอบบูลิน 0.73±0.10 g/dL และอัตราส่วนอัลบูมินต่อกลอบบูลินเท่ากับ 0.39±0.03 (**Table 1**)

Table1. Mean± SEM Concentrations of the Serum Proteins

Serum protein	Siam Elephants Camp (Group1) n=31	The Million Year Stone Park & Pattaya Croccodile Farm (Group2) n=24	*P*-value
Albumin (g/dL)	2.09±0.16	1.77±0.12	0.283
Alpha1-globulin (g/dL)	0.66±0.06	0.59±0.02	0.938
Alpha2-globulin (g/dL)	1.12±0.12	1.29±0.10	0.626
Beta1-globulin (g/dL)	1.06±0.08	0.80±0.05	0.072
Beta2-globulin (g/dL)	1.46±0.12[a]	1.12±0.09[b]	0.046
Gamma-globulin (g/dL)	1.19±0.08[a]	0.73±0.10[b]	0.001
Globulin (g/dL)	1.19±0.08[a]	0.73±0.10[b]	0.000
A:G ratio	0.41±0.04	0.39±0.03	0.930
Total protein (g/dL)	7.56±0.10[a]	6.64±0.15[b]	0.000

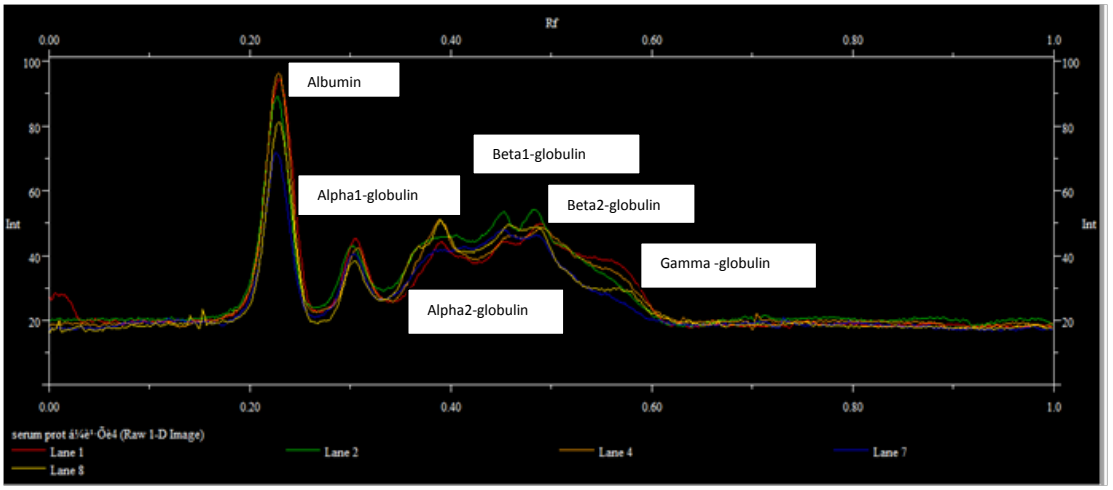
[ab] Different superscripts within each row indicate a significant difference ($P<0.05$).

Figure 1. Serum Protein Patterns in Captive Asian Elephants[a]



[a]The serum protein patterns were determined by cellulose acetate electrophoresis , pH 8.8, 180 volts, 15 minutes. Lane assigment: lane 1,2,3 and 4 were serum protein patterns of Asian captive elephants and lane 5 was human serum protein Control of Helena Laboratory, U.S.A.

Figure 2. Electrophoretogram of Serum Proteins from Asian Captive Elephants[a]



[a]Electrophoretogram of serum proteins from Asian captive elephants was made from Quantity One (Bio-Rad, U.S.A)

วิจารณ์

การแยกซีรัมโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสขึ้นอยู่กับการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีประจุในสนามไฟฟ้า โดยทิศทางและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นกับประจุ ขนาด และชนิดของตัวค้ำจุน เมื่อศึกษาด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตต พบว่าเมื่อใช้บาร์บิทอลบัฟเฟอร์ พีเอช 8.8 ซีรัมโปรตีนส่วนใหญ่มีประจุเป็นลบสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาบวก นอกจากนี้คุณสมบัติของเซลลูโลสอะซิเตตที่ไม่ดูดซับสารหรือดูดซับสารน้อยมีผลลดพื้นหลัง หลังจากการย้อมสีทำให้เพิ่มความไวในการตรวจวัด และยังเป็นสารโปร่งใสจึงช่วยในการตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี และสามารถใช้สารละลายหลายชนิดในการชะสารที่แยกออกจากแผ่นเยื่อ (membrane) นี้ได้ อีกทั้งเป็นแผ่นสำเร็จรูปทำให้ง่ายต่อการเตรียม โดยที่อัลบูมินมีความเป็นประจุลบมากที่สุดจึงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกได้ไกลที่สุด ส่วนกลอบบูลินมีความเป็นประจุลบต่ำกว่าจึงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปหาขั้วบวกช้ากว่า ซีรัมโปรตีนส่วนกลอบบูลินสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าแยกออกเป็นแอลฟ่า เบต้า และแกมม่า-กลอบบูลิน ตามลำดับ

จากผลการศึกษาพบว่า รูปแบบของซีรัมโปรตีนประกอบด้วยโปรตีน 6 แถบและมีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของซีรัมโปรตีนของทั้งสองปางช้างที่อยู่ในช่วงอ้างอิง [5,7] (Reference Range Elephant) คือ อัลบูมิน และอัตราส่วนระหว่างอัลบูมินต่อกลอบบูลิน แต่มีค่าความเข้มข้นของแอลฟ่า1-กลอบบูลิน เบต้า2-กลอบบูลิน ต่ำกว่าค่าอ้างอิง [5,7] ส่วนค่าแอลฟ่า2-กลอบบูลิน และเบต้า1-กลอบบูลิน สูงกว่าค่าอ้างอิง [5,7] และไม่มีความแตกต่างในอายุและเพศ ช้างทั้ง 2 กลุ่ม มีความเข้มข้นของซีรัม

โปรตีนชนิดอัลบูมิน แอลฟ่า1-กลอบบูลิน แอลฟ่า2-กลอบบูลิน เบต้า1-กลอบบูลิน และอัตราส่วนอัลบูมินต่อกลอบบูลินไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่เบต้า2-กลอบบูลิน แกมม่า-กลอบบูลินและกลอบบูลิน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P <0.05) ค่าซีรัมโปรตีนรวมของช้างทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P <0.05) อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของอาหารและการเลี้ยง ช้างส่วนใหญ่ของปางช้างสยามทำงานบรรทุกนักท่องเที่ยวเดินชมธรรมชาติ อาหารเป็นหญ้า ต้นสับปะรด กล้วยน้ำว้า และใบไม้ระหว่างทางเดิน ส่วนช้างที่อุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยาส่วนใหญ่จะยืนโรง มีบางเชือกที่ไว้รับนักท่องเที่ยว อาหารเป็นหญ้า ต้นสับปะรด อาหารเม็ดสำหรับช้างและมีการเสริมให้กินต้นอ้อยเดือนละครั้ง ส่วนช้างรับนักท่องเที่ยวจะได้กินกล้วยน้ำว้าเสริมจากนักท่องเที่ยว โดยทุกเชือกได้กินอาหารแบบเต็มที่ วิธีเซลลูโลสอะซิเตตอิเล็กโตรโฟรีซิส จึงเป็นวิธีพื้นฐานที่ง่ายและสะดวก สามารถนำมาใช้ศึกษารูปแบบและความเข้มข้นของซีรัมโปรตีนในเลือดช้างเลี้ยง อันจะเป็นประโยชน์ในทางคลินิกทั้งการช่วยวินิจฉัยโรค การติดตามผลการรักษาโรคและการสืบค้นหรือป้องกันโรคบางชนิดได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณปางช้างสยามและอุทยานหินล้านปีและฟาร์มจระเข้พัทยา อ.บางละมุง จ.ชลบุรี ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือดช้างเป็นอย่างดี ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง และขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

1. Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5th ed., San Diego, Calif: Academic Press; 1997.
2. Rocco RM. Joachim Kohn (1912-1987) and the origin of cellulose acetate electrophoresis. *Clin Chem.* 2005;51(10):1896-1901.
3. Brown IRF, White PT, Malpas RC. Protein and other nitrogenous constituents in the blood serum of the African elephant (*Loxodonta africana*). *Comp Biochem Physiol*. 1978;(5):267-270.
4. Gromadzka-Ostrowska J, Jakubow K, Zalewska B, Krzywicki Z. Haematological and blood biochemical studies in female domesticated Indian elephants (*Elaphas maximus* L.). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1988;89(3):313-315.
5. Kelly PJ, Carter SD, Azwai SM, Cadman HF. Isolation and characteristic of immunoglobulin G and IgG subclasses of African elephant (*Loxodonta africana*). *Immunol Microbiol Infect Dis.* 1998;21(1): 65-73.
6. Silva ID, Kuruwita VY. Hematology, plasma, and serum biochemistry values in free- ranging elephants (*Elephas Maximus Ceylonicus*) in Sri Lanka. *J Zoo Wildlife Med*. 1993;24(4): 434-439.

7. Physiological Reference Value. International Species Information System. 12101 Johnny Cake Ridge Road Apple Valley, MN 55124 U.S.A. 2002. Available from http://www.isis.org
8. Mikota SK. Hemolymhatic system. In: Fowler ME, Mikota SK, editors. *Biology, medicine and surgery of elephants*. Iowa: Blackwell Publishing; 2006. p. 325-345.
9. Tuntasuvan D, Theeraphan A, Phoengpong N, Jitnupong W and Lungka G. Comparison of serum chemistry values and serum mineral values between captive and free-ranging elephants in Thailand. FAO. 2001.
10. Helena Laboratories, USA. *Serum protein Electrophoresis Procedure.* Instruction manual. 2001.