รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

แผนการวิจัยเรื่อง

การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

(Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness)

หัวหน้าโครงการ

รศ.นพ.ดร.อิศรางค์ นุชประยูร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550

ชื่อแผนการวิจัย (Research Program)

(ภาษาไทย) การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

(ภาษาอังกฤษ) Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness

ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

รศ.นพ.ดร.อิศรางค์ นุชประยูร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้ร่วมวิจัย

นายอาคม ใสงาม หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น.ส.มณฑน์มาศ สุนทรวัฒน์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายพัทธดนย์ สุขพันธุ์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น.ส.สุนทรีย์ อ่อนดี หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น.ส.อุมาภรณ์ เมธเมาลี หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2550 ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. กวี รัตนบรรณากูร ที่ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์แก่โครงการ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ สภานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดเก็บต่อมพิษงู และรีดพิษงูแมวเซา และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยพิษงูและงูพิษกัด และศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ (CHULA-MRC) ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 013607
วัน, เดือน, ปี 20 พ.ค. 51

บทคัดย่อ

ปัญหางูพิษกัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย หนึ่งในงูพิษที่สำคัญในไทย คืองูแมวเซา (*Daboia russellii siamensis*) งูชนิดนี้พบมากในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกของไทย ผู้ที่ถูกงูชนิดนี้กัด มักมีอาการทางระบบเลือด และภาวะไตวายเฉียบพลัน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ที่ถูกงูแมวเซากัดเสียชีวิต ในปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับกลไกการเกิดพิษหลังถูกงูแมวเซากัด รวมทั้งโปรตีนสำคัญในพิษงูแมวเซาที่อาจมีประโยชน์ทางการแพทย์ ยังไม่มีการศึกษาอย่างแน่ชัด การศึกษาองค์ประกอบของพิษงูแมวเซาในเชิงลึก จะช่วยให้เข้าใจกลไกการเกิดพิษ นำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น พร้อมทั้งอาจนำความรู้ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป จากผลงานที่ผ่านมา ทางกลุ่มผู้วิจัยได้สร้างห้องสมุดยีน (cDNA library) จากต่อมพิษงูแมวเซาได้สำเร็จ และได้มีการศึกษาองค์ประกอบของพิษงูเบื้องต้นด้วยเทคนิค Expressed Sequence Tags Analysis พบว่าในพิษงูมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ haematostasis เป็นจำนวนมาก ซึ่งสัมพันธ์กับความเป็นพิษของงูแมวเซาที่มีผลโดยตรงต่อระบบเลือดของเหยื่อที่ถูกกัด โปรตีนที่พบมาก คือ phospholipase A2, factor X activating enzyme (RVV-X), factor V activating enzyme (RVV-V) และโปรตีนอื่นๆ อีกหลายชนิด จากการทบทวนวรรณกรรม โปรตีนพิษงูแมวเซาที่น่าสนใจ คือ RVV-X และ PLA_2 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการแยกโปรตีนพิษงูชนิด RVV-X และ PLA_2 จากพิษงูแมวเซาของไทยก่อน โดยใช้วิธี Gel filtration column chromatography และ Anion exchange column chromatography จากนั้นทำการยืนยันผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X และ PLA_2 และหาขนาดของโปรตีนพิษงูทั้ง 2 ชนิด โดยใช้วิธี MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าโปรตีนพิษงูแมวเซาทั้งชนิด RVV-X และ PLA_2 มีความบริสุทธิ์สูง และมีขนาดโปรตีนประมาณ 90 และ 14 Kb ใน non-reducing condition ตามลำดับ จากนั้นได้ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ RVV-X และ PLA_2 ที่แยกบริสุทธิ์ได้ พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดมี enzymatic activity สูง โครงการนี้เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี (พ.ศ. 2550-2552) ซึ่งในขณะนี้อยู่ในระหว่างการโคลนยีนต่างๆ ที่สำคัญในพิษงูแมวเซาไทยจากห้องสมุดยีน และทำการ express ยีนเหล่านี้ เพื่อสร้าง recombinant proteins ที่คาดว่าจะมีความสามารถในการทำงานได้เหมือน native protein รวมทั้งทำการศึกษาโปรตีนชนิดต่างๆ ในพิษงูที่ได้จากทั้งวิธีแยกโปรตีนในพิษงูโดยเทคนิคทางชีวเคมี หรือจาก recombinant proteins เพื่อหาโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญต่อการกลไกการเกิดพิษหลังถูกงูแมวเซากัด และอาจนำความรู้ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

Abstract

Venomous snake bite is an important medical problem in Thailand. The subspecies found in Thailand is *Daboia russellii siamensis* that is abundant in Eastern and Central of Thailand. Envenomation presents predominately with hematologic manifestations and acute renal failure (ARF) which are cause of death in Russell's viper bite victims. However, the exact pathogenesis following *Daboia russellii siamensis* envenomation is not well established. Since Russell's viper venom contains several active proteins that present different biological activities, the main toxin in Russell's viper venom involving pathogenesis remains unclear. Moreover, snake venom proteins are source of interested biomedical compounds which may useful for medical applications. Therefore, this research focuses on snake venom component identification to understand the role of toxins involving the pathogenesis for potential treatment in snake-bite patients and investigate the potential snake proteins for use in medical application. In preliminary study, we have previously constructed a cDNA library from Russell's viper venom gland and generated expressed sequence tags (ESTs), resulting in sequences with similarity to phospholipase A2 (PLA_2), factor X activating enzyme (RVV-X), factor V activating enzyme (RVV-V), and other proteins. We then focused on PLA_2, RVV-X genes that make proteins causing many of hematologic manifestations. In this study, we purified native PLA_2, RVV-X from crude venom by gel filtration on Sephadex G-100 and anion exchange column chromatography on Q-sepharose. The molecular mass for purified PLA_2 and RVV-X proteins were, respectively, 14 kDa and 90 kDa determining by MALDI-TOF. PLA_2 and RVV-X showed high specific enzymatic activity. The further studies, we will clone cDNAs encoding intereted genes and express these proteins using recombinant technology. The recombinant or purified native proteins will be identified for particular toxins involved in pathogenesis after Russell's viper envenomation or characterized the biomedically relevant snake venom proteins for practical use and potential.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญ	5
สารบัญภาพ	6
คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	7
บทนำ	8
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	8
วัตถุประสงค์	9
ขอบเขตการวิจัย	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
วิธีดำเนินการวิจัย	10
รูปแบบการวิจัย	10
ขั้นตอนการดำเนินงาน	10
ผลการวิจัย	12
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
บรรณานุกรม	21
ประวัตินักวิจัยและคณะ	22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงผล Gel filtration chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาหลังจากผ่าน Sephadex G-100 chromatography column	12
รูปที่ 2	แสดงผล Anion exchange column chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X	13
รูปที่ 3	แสดงผล Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-50 column ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2 ครั้งที่ 1	14
รูปที่ 4	แสดงผล Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-50 column ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2 ครั้งที่ 2	15
รูปที่ 5	แสดงผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 12% เจล ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X	16
รูปที่ 6	แสดงผล MALDI-TOF mass spectrum ของโปรตีนพิษงูเมาเซาชนิด RVV-X	17
รูปที่ 7	แสดงผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 15% เจล ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2	18
รูปที่ 8	แสดงผล MALDI-TOF mass spectrum ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2	19

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

cDNA library	=	complementary DNA
ESTs	=	Expressed Sequence Tags
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
kDa	=	kilodalton
MALDI-TOF	=	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Fligh
ml	=	Milliliter
nm	=	nanometre
PLA_2	=	phospholipase A2
pNA	=	p-nitroaniline
RVV-V	=	factor V activating enzyme
RVV-X	=	factor X activating enzyme

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

❑ ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัญหางูพิษกัดยังจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของไทยและอีกหลายๆ ประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพ จึงมีงูพิษอาศัยอยู่หลายชนิด หนึ่งในงูพิษที่สำคัญของประเทศไทยคืองูแมวเซา (Russell's viper) โดยจะพบมากในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกของไทย มีรายงานการถูกงูแมวเซากัดในประเทศไทย 44 ราย ในปี พ.ศ. 2546 หรือคิดเป็นร้อยละ 3.9 ของงูพิษกัด ทั้งหมดในประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ค่านี้อาจต่ำกว่าความเป็นจริงมาก เนื่องจากผู้ป่วยหลายรายไม่ได้ไปพบแพทย์ที่โรงพยาบาลและทำการรักษากันเองตามวิธีพื้นบ้าน

ในปัจจุบันความรู้ของกลไกการเกิดพิษหลังถูกงูแมวเซากัด ยังไม่ทราบแน่ชัดนัก การรักษาจึงเป็นการรักษาตามอาการ และการให้เซรุ่มแก้พิษงู เซรุ่มดังกล่าวผลิตจากการกระตุ้นม้าด้วยพิษงูแมวเซารวม ทำให้เซรุ่มที่ได้มีความจำเพาะต่อการกำจัดพิษต่ำ ในการรักษาจึงต้องให้เซรุ่มแก้พิษงูในปริมาณมาก อาจนำไปสู่ความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแพ้ในผู้ป่วยได้ ดังนั้นหากเราสามารถเข้าใจองค์ประกอบของพิษงูที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพิษ ย่อมเป็นประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซากัดอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การพัฒนาสร้าง toxin-specific antivenom รวมทั้งสามารถดัดแปลงใช้ประโยชน์จากโปรตีนบางชนิดที่มีในพิษงูแมวเซา เพื่อนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปรกติของ factor ต่างๆ ทางระบบเลือดของผู้ป่วยต่อไป

โดยผลงานที่ผ่านมา หน่วยวิจัยพิษงูและงูพิษกัดได้รับทุนวิจัยจาก สวทช. เพื่อทำการศึกษาองค์ประกอบของพิษงูแมวเซา ด้วยความร่วมมือจากสวนงู สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ในการจัดหาต่อมพิษงูแมวเซาและน้ำพิษงู ทางกลุ่มผู้วิจัยได้สร้างห้องสมุดยีน (cDNA library) จากต่อมพิษงูแมวเซาได้สำเร็จและได้มีการศึกษาองค์ประกอบของพิษงูเบื้องต้นด้วยเทคนิค Expressed Sequence Tags Analysis พบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ haematostasis เป็นจำนวนมากในพิษงู ซึ่งสัมพันธ์กับความเป็นพิษของงูแมวเซาที่มีผลโดยตรงต่อระบบเลือดของเหยื่อที่ถูกกัด โปรตีนที่พบมากคือ phospholipase A2 (PLA_2), factor X activating enzyme (RVV-X), factor V activating enzyme (RVV-V) และโปรตีนอื่นๆ อีกหลายชนิด ดังนั้นการโคลนยีน และ express ยีนเหล่านี้ เพื่อสร้าง recombinant proteins ที่มีสามารถทำงานได้เหมือน native protein สำหรับนำไปศึกษากลไกการเกิดพิษหลังถูกงูแมวเซากัด รวมทั้งยังทำให้มีโอกาสศึกษา protein-structure function relationship เช่น การทำ mutagenesis หรือการหา functional domain ของ enzyme เป็นต้น ในขณะเดียวกันการแยกโปรตีนต่างๆ ที่สำคัญในพิษงูโดยเทคนิคทางชีวเคมีนั้น เป็นอีกทางหนึ่งที่ใช้แยกโปรตีนพิษงูที่สำคัญออกมาศึกษาได้ง่ายขึ้น พร้อมทั้งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

❑ วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของพิษงูแมวเซาในเชิงลึก ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเข้าใจกลไกการ เกิดพิษ และนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น
2. สามารถดัดแปลงใช้ประโยชน์จากโปรตีนบางชนิดที่มีในพิษงูแมวเซา เพื่อนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วย ที่มีความผิดปรกติทางระบบเลือด

❑ ขอบเขตการวิจัย

งูแมวเซาสามารถพบได้ในหลายประเทศ และในแต่ละประเทศ เราอาจพบความเป็นพิษที่แตกต่าง กันเนื่องจากพิษงูมีองค์ประกอบแตกต่างกันอยู่บ้าง งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาพิษงูแมวเซาที่ได้จากประเทศไทย ซึ่งจะทำให้เรามีความเข้าใจถึงองค์ประกอบของพิษงูในบ้านเราดีขึ้น ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาในการรักษางูพิษกัดในไทยได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบหลายส่วนที่สำคัญในพิษงู ยังมีความคล้ายคลึงกับงูแมวเซาในภูมิภาคอื่น ทำให้มีโอกาสที่จะพัฒนาใช้ร่วมกันกับการรักษาในประเทศอื่นได้เช่นกัน

❑ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจองค์ประกอบของพิษงูแมวเซามากขึ้น และสามารถอธิบายกลไกการเกิดพิษ หลังถูกงูกัดได้
2. สามารถนำโปรตีนพิษงูไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ เช่น การใช้ในงาน diagnosis, การใช้โปรตีนพิษงูรักษาโรคเฉพาะทางบางชนิด หรือการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูที่มี ประสิทธิภาพสูงขึ้น
3. สามารถผลิตโปรตีนที่มีความสามารถในการผลิตขายและจดสิทธิบัตรแข่งขันในตลาดได้
4. ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย

❑ รูปแบบการวิจัย (Research design)

รูปแบบการศึกษาเป็นแบบ Descriptive Research

❑ ขั้นตอนการดำเนินงาน

งานวิจัยได้เริ่มดำเนินการ โดยได้รับความร่วมมือจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ทำการเก็บพิษงูแมวเซา ปริมาณ 2 กรัม และทำให้แห้ง (lyophilized form) โดยสัตวแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ เนื่องจากในพิษงูแมวเซามีโปรตีนหลายชนิด และมีการทำงานที่หลากหลาย เช่น RVV-X, PLA_2 และยังมีโปรตีนพิษงูแมวเซาอื่นที่ยังไม่ทราบชนิด ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะ identify โปรตีนเหล่านี้ โดยเริ่มจากการแยกโปรตีนพิษงู RVV-X และ PLA_2 จากพิษงูแมวเซาของไทยก่อน การแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาแต่ละชนิด มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 การแยกโปรตีนพิษงูจากพิษงูแมวเซาให้บริสุทธิ์

- วิธี Gel filtration column chromatography

นำพิษงูแมวเซาแห้งที่ได้จากสถานเสาวภามาละลายในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และปั่นเก็บเอาเฉพาะส่วนน้ำมาใส่ Gel filtration column เพื่อแยกโปรตีนพิษงูออกเป็นกลุ่มกว้างๆ โดยใช้ขนาดโมเลกุลของโปรตีนเป็นตัวแยก หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีนในแต่ละ fraction โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ ของโปรตีนที่สนใจในแต่ละ fraction

- วิธี Ion-exchange column chromatography

นำแต่ละ fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะที่ต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ต่อ อาศัยหลักการความแตกต่างกันของประจุของโปรตีนที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ และประจุบน bead ของ column โปรตีนจะถูกจับ บน column ด้วยประจุที่ต่างกัน จากนั้นไล่โปรตีนออกด้วยเกลือ (linear salt gradient) หลังจากนั้นนำโปรตีนที่ได้ มาทำการวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีน ที่สนใจในแต่ละ fraction

ขั้นที่ 2 ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนพิษงูแต่ละชนิด

- การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ RVV-X โดยการใช้ chromogenic substrate: S-2765 ซึ่งอาศัยคุณสมบัติของ RVV-X ในการกระตุ้น coagulation factor X ในพลาสมาคนปกติ กลายเป็น factor X activator นำไปสู่การปล่อย chromogenic group pNA (p-nitroaniline) จาก chromogenic substrate Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765) สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 405 nm

- **การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ PLA_2** ในการทำลายเม็ดเลือดแดงแกะทางอ้อม (indirect hemolytic assay) โดย PLA_2 สามารถย่อย lecithin ใน egg yolk ทำให้เกิด lysolecithin ซึ่งเป็น lysine agent นำไปสู่การแตกของเม็ดเลือดแดง และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 540 nm

ขั้นที่ 3 ทำการทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนพิษงูแต่ละชนิด

โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้ นำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และทดสอบความบริสุทธิ์โดย run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis หลังจากนั้นย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue และทำการยืนยันผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X และ PLA_2 และหาขนาดของโปรตีนพิษงูทั้ง 2 ชนิด โดยใช้วิธี MALDI-TOF mass spectrometry

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

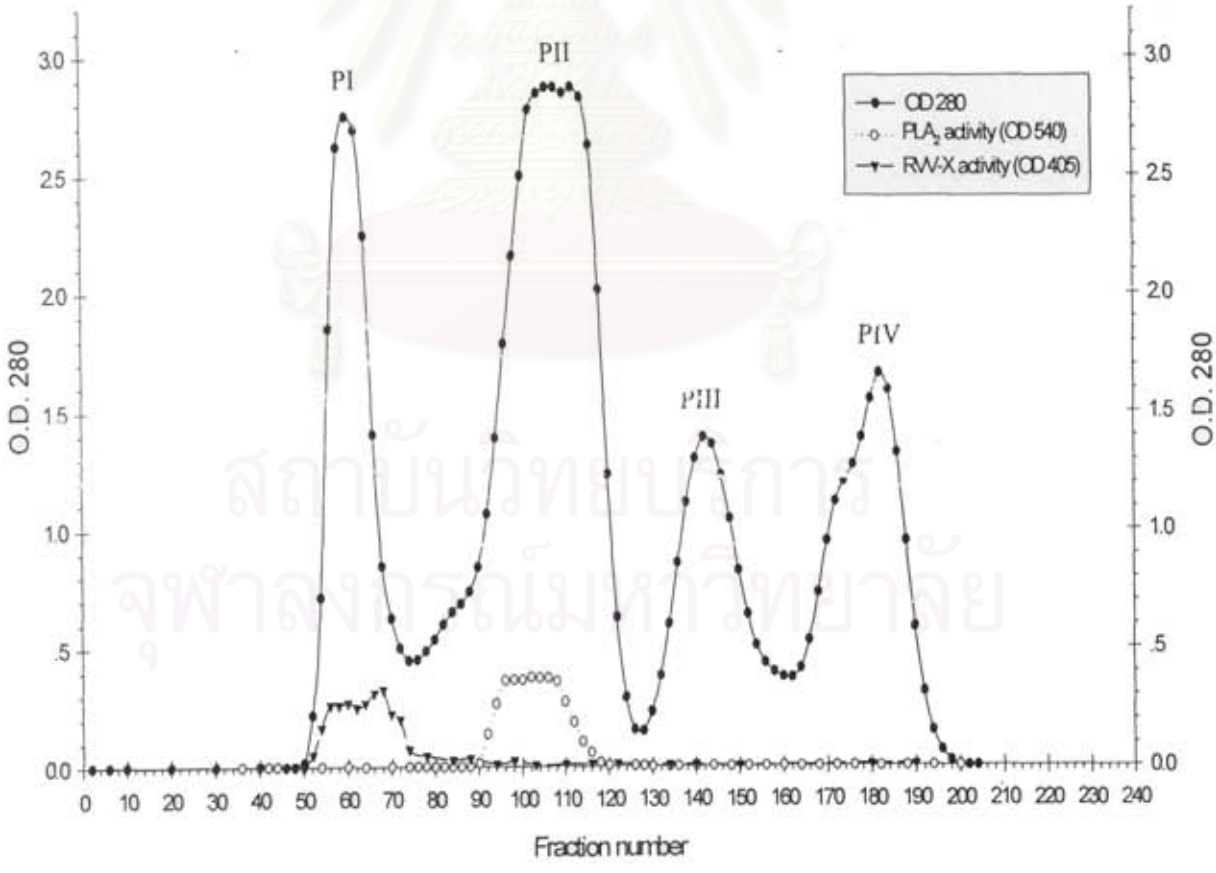
- **การแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาให้บริสุทธิ์**

ได้ทำการแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาจากพิษงูแมวเซาแห้งที่ได้จากสถานเสาวภา โดยใช้วิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-100 พบว่าสามารถแยกโปรตีนพิษงูออกเป็น 4 กลุ่ม fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีของ RVV-X อยู่ในกลุ่มแรก (PI) ส่วน PLA_2 อยู่ในกลุ่มที่ 2 (PII) (ดังรูปที่ 1)

Crude venom (400 mg protein) in 4.0 ml of 0.05M Tris-phosphate buffer containing 1mM benzamidine-HCl, pH 7.5

Flow rate = 10 ml/hr fractions collected = 2 ml

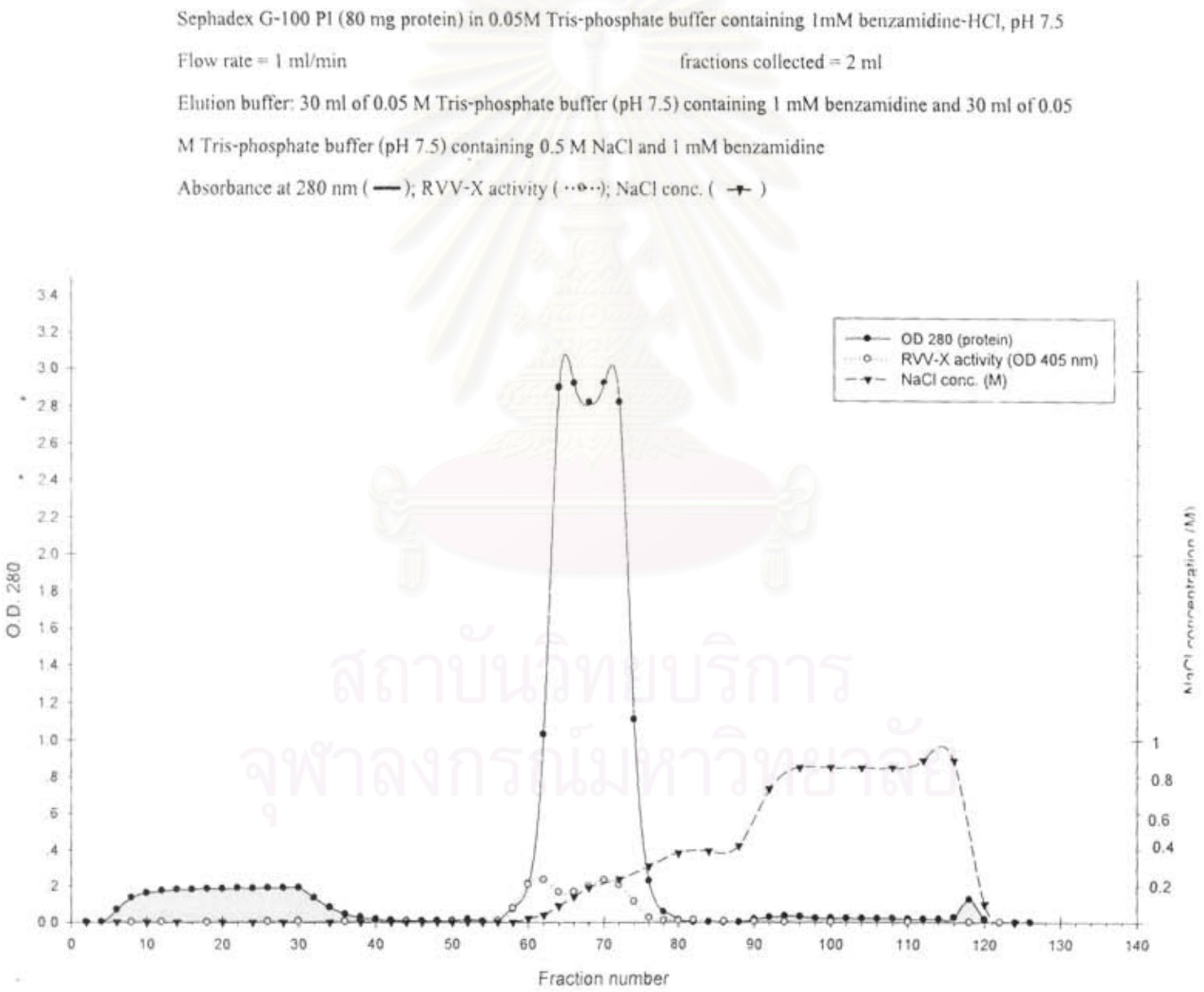
Absorbance at 280 nm (—); RVV-X activity (-▼-); PLA_2 activity (·····)



รูปที่ 1 แสดงผล Gel filtration chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาหลังจากผ่าน Sephadex G-100 chromatography column (2.6 × 70 cm)

การแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X

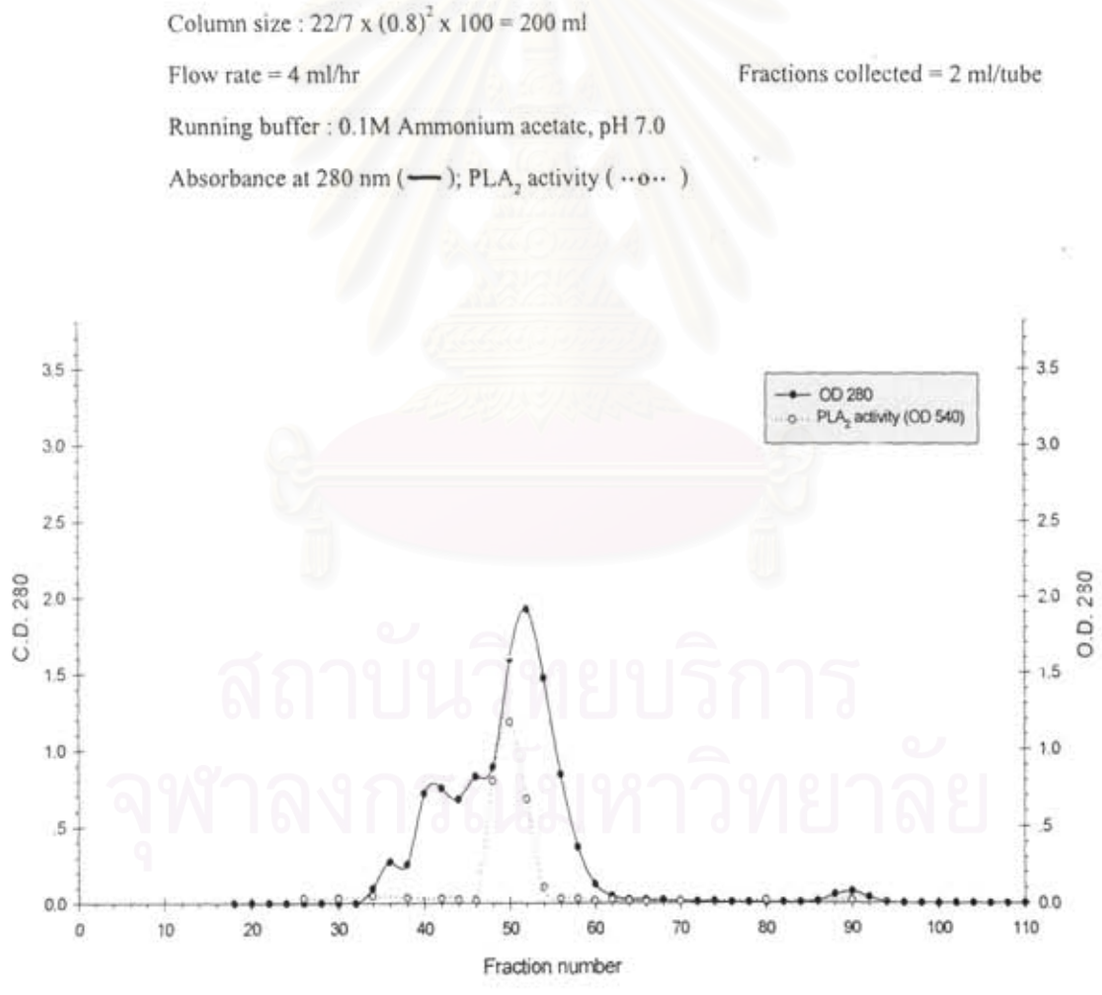
หลังจากรวบรวม fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีของ RVV-X และทำการแยกให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Q-sepharose anion exchange column chromatography พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X ออกมาได้ โดยโปรตีนที่แยกได้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของ RVV-X (ดังรูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงผล Anion exchange column chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Gel filtration chromatography (PI) และนำมาแยกต่อด้วยวิธี Anion exchange column chromatography ผ่าน Q-Sepharose column

การแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2

หลังจากรวบรวม fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีของ PLA_2 ซึ่งพบว่าอยู่ในกลุ่มที่ 2 (PII) (ดังรูปที่ 1) และทำการแยกโปรตีนพิษงูให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-50 column พบว่าสามารถแยกโปรตีนพิษงูชนิด PLA_2 ออกมาได้ อย่างไรก็ตามยังพบโปรตีนพิษงูอื่นปนมาด้วย (ดังรูปที่ 3) จึงทำการรวบรวมแต่ละ fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของโปรตีนชนิด PLA_2 และทำการแยกโปรตีนพิษงูชนิด PLA_2 ให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Sephadex G-50 column column chromatography อีกครั้ง (ดังรูปที่ 4) พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูชนิด PLA_2 ออกมาได้ โดยโปรตีนที่แยกได้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของ PLA_2



รูปที่ 3 แสดงผล Gel filtration column chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2 ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Gel filtration chromatography (PII) และนำมาแยกต่อด้วยวิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-50 column

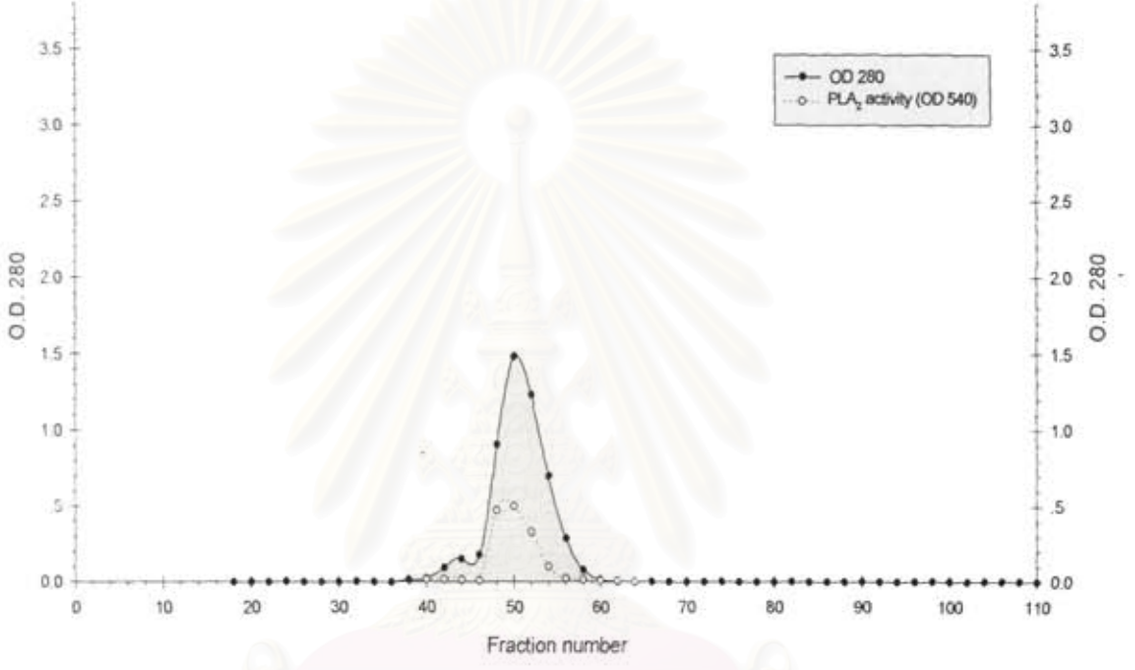
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Column size : 22/7 x $(0.8)^2$ x 100 = 200 ml

Flow rate = 4 ml/hr *Fractions collected* = 2 ml/tube

Running buffer : 0.1M Ammonium acetate, pH 7.0

Absorbance at 280 nm (—); PLA_2 activity (··o··)



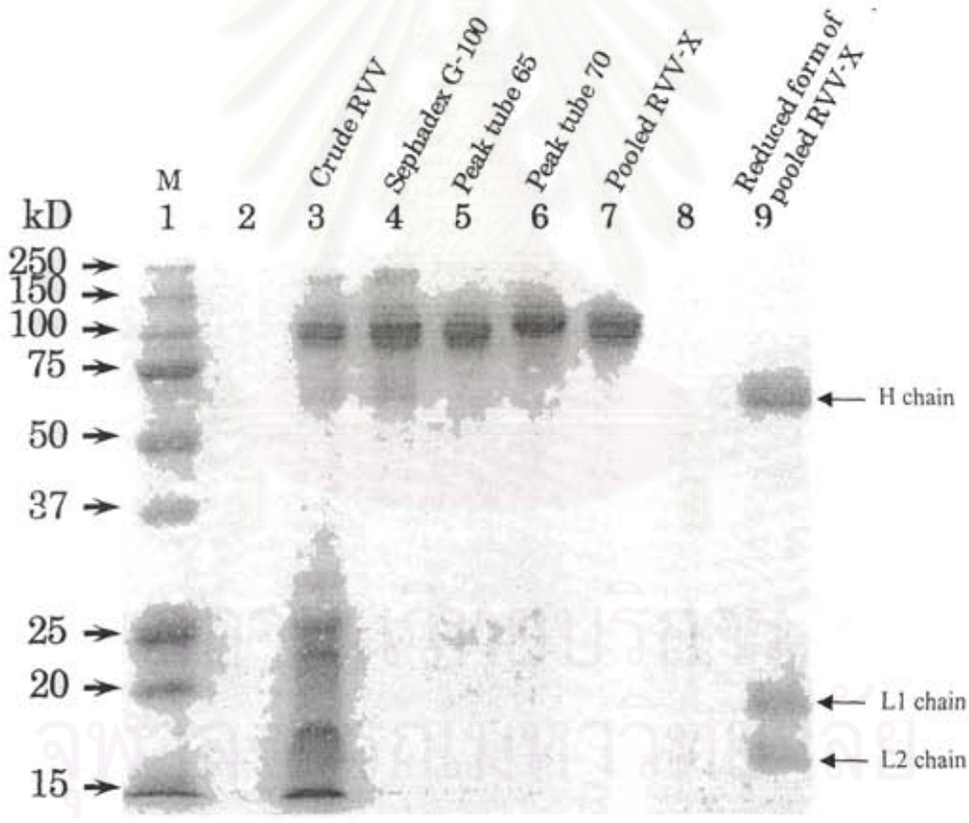
รูปที่ 4 แสดงผล Gel filtration column chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2 ผ่าน Sephadex G-50 column อีกครั้ง หลังจากผ่านการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Gel filtration chromatography ผ่าน Sephadex G-50 column

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- **ทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนพิษงูแต่ละชนิด**

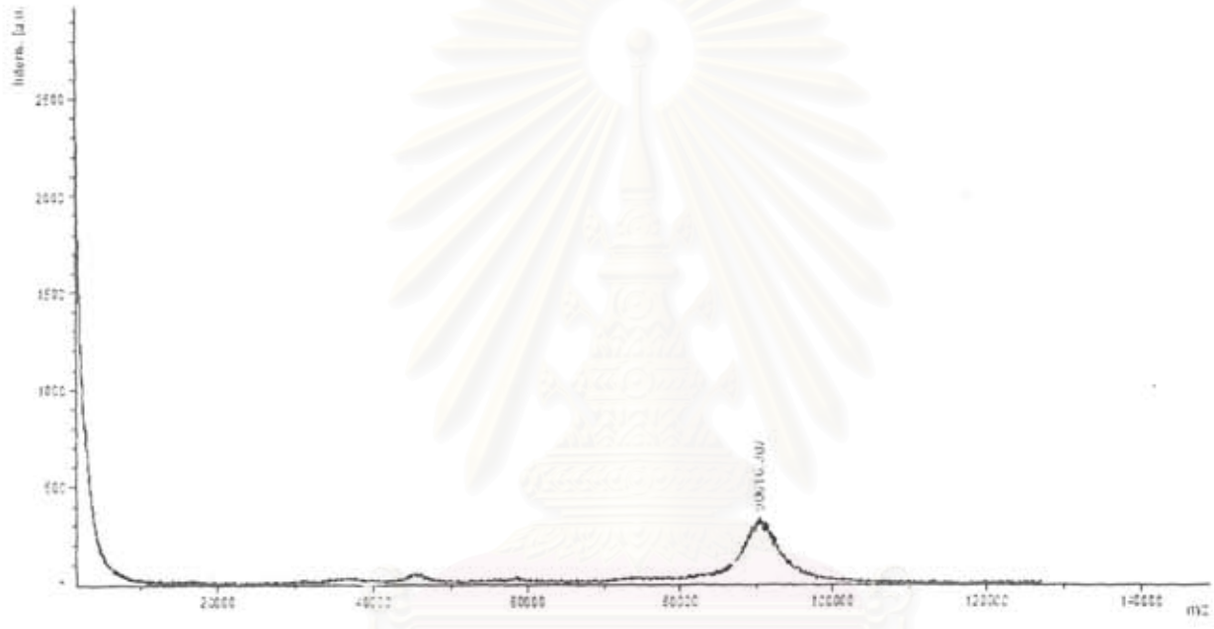
  <u>โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X</u>

หลังจากรวบรวมแต่ละ fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของโปรตีนชนิด RVV-X และทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ใน 12% เจล จากนั้นย้อมด้วย Coomassie brilliant blue พบว่าโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X มีความบริสุทธิ์สูง และมีขนาดโปรตีนประมาณ 90 kDa ใน non-reducing condition เมื่อนำมา run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ใน reducing condition พบว่าสามารถตัดโปรตีนออกเป็น heavy chain 1 สาย และ light chain 2 สาย ซึ่งผลเป็นไปดังที่คาดไว้ (ดังรูปที่ 5)



รูปที่ 5 แสดงผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 12% เจล ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X : M = protein marker, lane 3 = crude RVV, lane 4 = fraction ที่รวบรวมจาก Sephadex G-100 (PI), lane 5-7 = purified RVV-X, lane 3-7 = non-reducing condition, lane 8 = reducing condition

จากการยืนยันผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X และขนาดของโปรตีนพิษงู โดยใช้วิธี MALDI-TOF mass spectrometry (ดังรูปที่ 6) พบว่า โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X มีความบริสุทธิ์สูง และมีขนาดโปรตีน 90 kDa

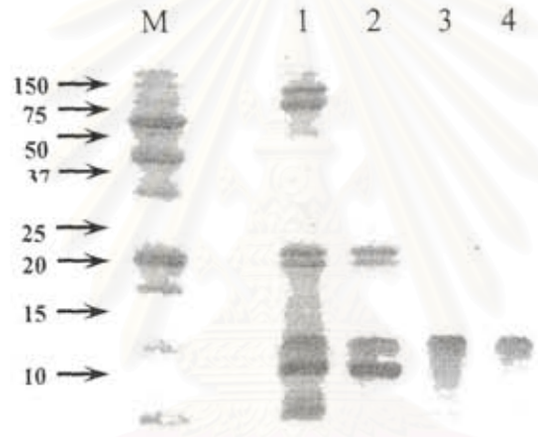


รูปที่ 6 แสดงผล MALDI-TOF mass spectrum ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2

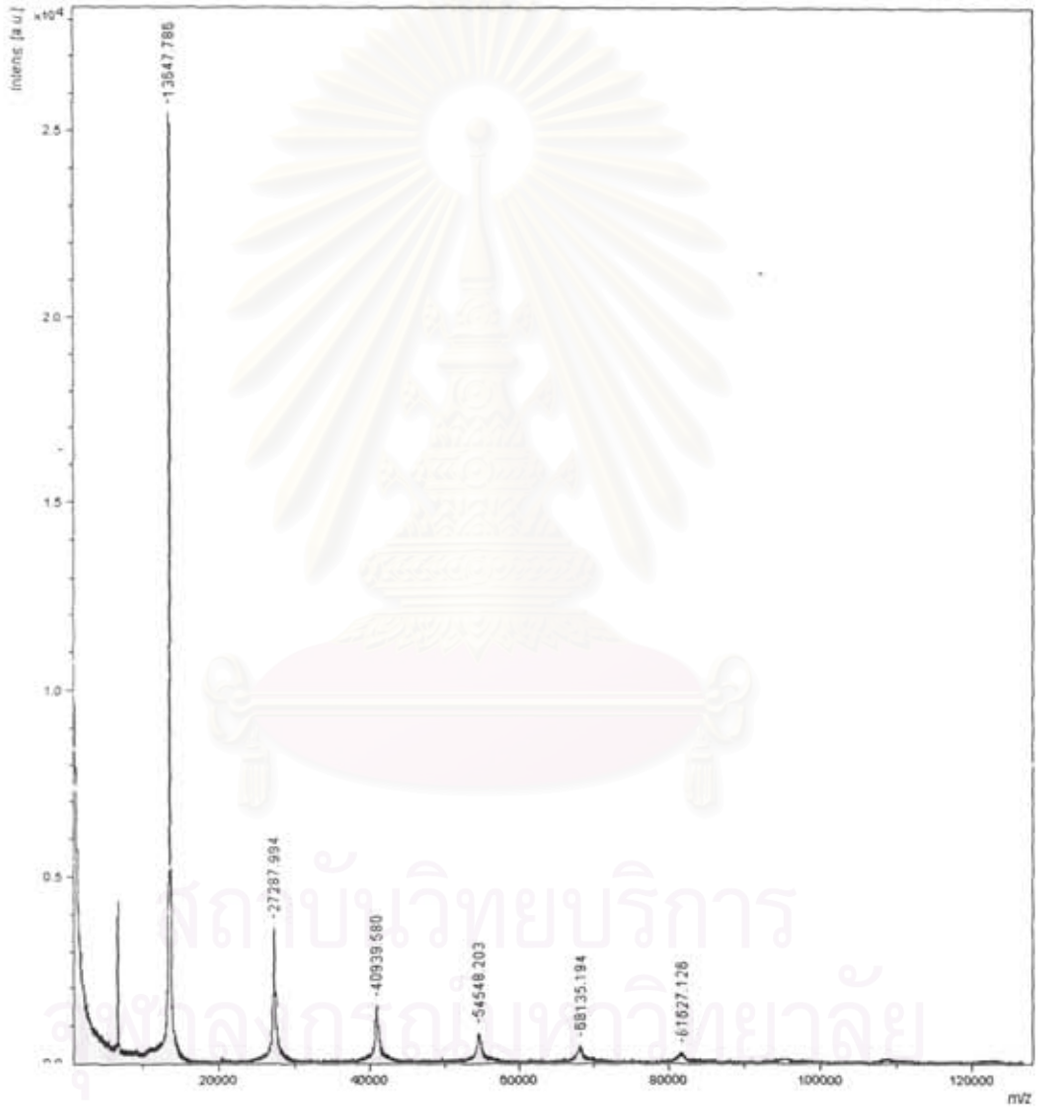
จากนั้นจึงทำการรวบรวมแต่ละ fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของโปรตีนชนิด PLA_2 และทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ใน 15% เจล ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue เพื่อทดสอบดูความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ได้อย่างคร่าวๆ (ดังรูปที่ 7) พบว่าโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2 มีความบริสุทธิ์สูง และมีขนาดโปรตีนประมาณ 14 kDa ใน non-reducing condition



รูปที่ 7 แสดงผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 15% เจล (non-reducing condition) ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2 : M = protein marker, lane 1 = crude RVV, lane 2 = fraction ที่รวบรวมจาก Sephadex G-100 (PII), lane 3 = fraction ที่รวบรวมจาก Sephadex G-50 ครั้งที่ 1, lane 4 = purified PLA_2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการยืนยันผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูชนิด PLA_2 และขนาดของโปรตีนพิษงู โดยใช้วิธี MALDI-TOF mass spectrometry (ดังรูปที่ 8) พบว่า โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X มีความบริสุทธิ์และมีขนาดโปรตีน 14 kDa



รูปที่ 8 แสดงผล MALDI-TOF mass spectrum ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยสามารถแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X และ PLA_2 ในพิษงูแมวเซาของไทยให้มีความบริสุทธิ์สูงได้ โดยทำการแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X ด้วยวิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-100 column และแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Anion exchange column chromatography โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X ที่แยกได้มีขนาดประมาณ 90 kDa และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สามารถกระตุ้น coagulation factor X ได้ ตรงตามดังที่คาดไว้

สำหรับการแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2 ใช้วิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-100 column ในครั้งแรก และแยกบริสุทธิ์ต่อผ่าน Sephadex G-50 column จำนวน 2 ครั้ง โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA_2 ที่แยกได้มีขนาดประมาณ 14 kDa และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่มีความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงแกะท่างอ้อมได้ ตรงตามดังที่คาดไว้

โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้ จะนำไปศึกษาจะทำการหาลำดับ amino acid sequnece และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล เมื่อทราบชนิดและลำดับ amino acid จะทำการเปรียบเทียบกับ clone ที่มีใน cDNA library หรือทำการ screen clone ใหม่โดยการทำ plaque lift hybridization หรือใช้ degenerate primers เพื่อนำไปสร้าง recombinant protein ที่สามารถทำงานได้เหมือนกับโปรตีนพิษงูตามธรรมชาติต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

1. กระทรวงสาธารณสุข รายงานเฝ้าระวังโรค ปี 2546
2. Nuchprayoon I, Sai-Ngam A, Suntrarachun S, Noiphrom J, Pakmanee N, Chanhome L, Nuchprayoon S, Sitprija V. (2001) Molecular cloning of phospholipase A2 from a Thai Russell's viper venom gland cDNA library. J Med Assoc Thai.;84 Suppl 1:S99-105.
3. Funk C, Gmur J, Herold R, Straub PW. (1971) Reptilase-R: a new reagent in blood coagulaton. British Journal of Haematology. 21: 43-52.
4. Matsuda M, Saeki E, Kasamatsu A, Nakamikawa C, Manabe S, Samejima Y. (1985) Fibrinogen characterized by defective release of fibrinopeptide A. Thrombosis Research. 37: 379-390.
5. Sharp AA, Esnouf Mp. (1968) A new approach to anticoagulant therapy? Lancet. 1: 859.
6. Stocker K, Fischer H, Meier J, Brogli M, Svendsen L. (1987) Characterization of the protein C activator Protac from the venom of the southern copperhead (*Agkistrodon contortrix*) snake. Toxicon. 25: 239-252.
7. Brettler DB. (1995) Inhibitors of factor VII and IX. Haemophilia. 1: 35-9.
8. Hutton RA, Warrell DA. (1993) Action of snake venom components on the haemostatic system. Blood Reviews. 7:176-89.
9. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. (1986) The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood. 68: 869-74.
10. Quick AJ. (1971) Thromboplastin generation: effect of the Bell-Alton reagent and Russell viper venom on prothrombin consumption. American Journal of Clinical Pathology. 55: 555-60.
11. Mammen EF. (1983) Seminars in Thrombosis and Hemostasis. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 9:1-72.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย) รศ.นพ.ดร. อิศรางค์ นุชประยูร

(ภาษาอังกฤษ) Issarang Nuchprayoon M.D., Ph.D., FAAP.

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน

3 1009 00931 69 1

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

หน่วยปฏิบัติการวิจัยพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 0-2256-4949 โทรสาร 02-256-4949

E-mail: fmedinp@md2.md.chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)		2531
Children's Hospital of Michigan, USA	Diplomate of the American Board of Pediatrics	General Pediatrics	2534
Johns Hopkins University Hospital, USA	Diplomate of the American Board of Pediatrics	Pediatric Hematology-Oncology	2539
Johns Hopkins University, USA	Doctor of Philosophy (Ph.D.)	Human Genetics and Molecular Biology	2540
แพทยสภา	หนังสืออนุมัติแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม	สาขากุมารเวชศาสตร์	2540
แพทยสภา	หนังสืออนุมัติแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม	สาขากุมารเวชศาสตร์โรคเลือด	2541
University of Adelaide, South Australia	Certificate, Short course in Clinical Toxinology	Toxinology	2544

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

6.2.1 "Molecular cloning and characterization of medically useful proteins from Russell's viper venom gland cDNA library" ได้รับทุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ (พ.ศ. 2544-2546)

6.2.2 "Mutations and haplotype analysis of the *G6PD* locus in the Southeast Asia population" ได้รับทุนจากทบวงมหาวิทยาลัย (2545)

6.2.3 "TEL-AMLI Translocation in Pediatric acute lymphoblastic leukemia: A study of target gene activation" ได้รับทุนจากทบวงมหาวิทยาลัย (2546)

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- **Nuchprayoon I**, Suktavee B, Nuchprayoon T. Red cell indices and therapeutic trial of iron in diagnostic work-up for anemia Thai females. J Med Assoc Thai. 2003; 86 suppl 2: S160-169.
- Pancharoen C, Mekmullica J, Buranachonapa J, Trongjit D, **Nuchprayoon I**, Vanichseiakul P, Seksarn P, Thisyakorn U. "Efficacy and Safety of Meropenem as an Empirical Treatment for Febrile Neutropenia in Children with Cancer". J Med Assoc Thai. 86 suppl 2: S174-178.
- Wananukul S, **Nuchprayoon I**, Seksarn P. Treatment of Kasabach-Merritt syndrome - a stepwise regimen of prednisolone dipyridamole and interferon. Int J Dermatol. 2003, In press.
- **Nuchprayoon I**, Jantaradsamee P, Tangkijvanich P, Suwanagool P, Kullavanijaya P, Janchai A, Hirsch P, Poovorawan Y. HBV DNA in serum and PBMC of patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis. Hepato-gastroenterology. 2003. (submitted)

- **Nuchprayoon I**, Sahasittiwat S, Kittikalayawong A, Chantanakafung, A. Lyophilized cryoprecipitate for bleeding children with hemophilia A. J Med Assoc Thai. 2002; 85 suppl 1: S5-8.
- **Nuchprayoon I**, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. Hum Mutat. 2002; 19(2): 185.
- Bhokaisawan N, Paritpokee N, Wiwanitkit V, Boonchlermvichian C, **Nuchprayoon I**. Serum concentrations of transferrin receptor among paediatric patients with transfusion-dependent beta-thalassaemia/haemoglobin E. Ann Trop Med Parasitol. 2002; 96(4): 427-9.
- Nuchprayoon S, Siriyasatien P, Kraivichian K, Porksakorn C, **Nuchprayoon I**. Prevalence of parasitic infections among Thai patients at the King Chulalonkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand. J Med Assoc Thai. 2002; 85 suppl 1: S415-423.
- Boonchlermvichian C, Paritpokee N, Bhokaisawan N, **Nuchprayoon I**, Wiwanitkit V. Marked increase in serum transferrin receptor Thai children with Hb-E- beta-thalassaemia. J Paediatr child Health. 2002; 38(6): 601-3.
- **Nuchprayoon I**, Wongyala W, Apawongse T, Ungbumnet W, Vacharasikorn A. Response to iron therapy in children with microcytic erythrocytes. Thai J Hematol Transfusion Med. 2002; 12(1): 2-10.
- Sosothikul D, Shotelersuk V, Chongsrisawat V, **Nuchprayoon I**, Seksarn P. Food cobalamin malabsorption presenting with microcytic anemia – a case report. Thai J Hematol Transfusion Med. 2002; 12(3): 227-33.
- **Nuchprayoon I**. Population genetics of blood group (editorial). Thai J Hematol Transfusion Med. 2002; 12(4): 275-6.
- Fongsaran J, **Nuchprayoon I**, Yod-in S, Kupatawintu P, Kidprasirt C. Blood group in Thai blood donors. Thai J Hematol Transfusion Med. 2002; 12(4): 277-86.
- Sosothikul D, **Nuchprayoon I**, Mahayosnond A, Wannakrairot P, Seksarn P. Massive thymic hyperplasia mimicking lymphoma - a case report and review of literature. Thai J Hematol Transfusion Med. 2002; 12(4): 301-7.

- Lekagul K, **Nuchprayoon I**. Role of prophylactic antibiotics and steroid in the management of green pit viper bites in children. Toxicon. 2001; 39: 143.
- **Nuchprayoon I**, Sai-ngam A, Suntarachun S, Promnoi J, Pakmanee N, Chanhome L, Triteeraprapab S, Sitprija V. Molecular cloning of phospholipase A2 from a Russell's viper venom gland cDNA library. J Med Assoc Thai. 2001; 84 suppl 1: S99-S104.
- Sanpavat S, **Nuchprayoon I**, Kittikalayawong A, Ungbumnet W. The value of methemoglobin reduction test as a screening test for cord blood glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. J Med Assoc Thai. 2001; 84 suppl 1: S91-S98.
- **Nuchprayoon I**, Seksarn P, Vanichsetakul P, O-chareon R. Low dose intravenous immunoglobulin for acute idiopathic thrombocytopenic purpura in children. Asian Pacific J Allerg Immunol. 2001; 19(1): 11-16.
- Lertchawanakul A, Baimai C, Siwanuwatn R, **Nuchprayoon I**, Phudhichareonrat S. Optic glioma in infancy: a case report of the youngest patient in Thailand. J Med Assoc Thai. 2001; 84 suppl 1: S137-S140.
- Triteeraprapab S, **Nuchprayoon I**, Porksakorn C, Poovorawan Y, Scott AL. High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants in Thailand. Ann Trop Med Parasitol. 2001; 95(5): 535-8.
- Wiangnon S, Chen AR, Dome J, **Nuchprayoon I**, Schmeckpeper B, Bias WB, Civin CI. Treatment of advanced retinoblastoma with syngeneic bone marrow transplantation. Thai J Hematol Transfusion Med. 2001; 11(1): 47-60.
- Triteeraprapab S, Thammapanyawat B, **Nuchprayoon I**, Tanamun B. Eosinophilia with low prevalence of parasitism in a rural area of Maha Sarakham province after annual mass treatment with mebendazole and albendazole. Chula Med J. 2000; 44 (6): 423-32.
- Hirunwitatkul P, Tulvatana W, Kasetsuwan N, **Nuchprayoon I**. Eosinophilic granuloma presenting as periorbital cellulitis. Chula. Med J. 2000; 44(8): 607-13.

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

6.4.1 "Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness" ได้รับทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2550-2551 ทำงานวิจัยเสร็จแล้ว ร้อยละ 20

6.4.2 "Origins of Southeast Asian *G6PD* mutations" ได้รับทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ปี 2550 ทำงานวิจัยเสร็จแล้วร้อยละ 20

6.4.3 "Interaction between *GSTM1, GSTT1, CYP1A1* and *NQO1* genetic polymorphisms and pesticides exposure as risk factors for acute lymphoblastic leukemia in Thai children" ได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 2 ปี 2550 ทำงานวิจัยเสร็จแล้วร้อยละ 45

6.4.4 "Molecular cloning and expression of Daboistatin a Novel RTS-disintegrin from Russell's viper venom (*Daboia russellii siamensis*)" ได้รับทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 3 ปี 2550 ทำงานวิจัยเสร็จแล้วร้อยละ 30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Triteeraprapab S, Karnjanopas K, Porksakorn C, **Sai-Ngam A**, Yentakam S, Loymak S. Lymphatic filariasis caused by Brugia malayi in an endemic area of Narathiwat Province, southern of Thailand. J Med Assoc Thai. 2001 Jun;84 Suppl 1:S182-8.
- **Sai-ngam A**, Nuchprayoon I. cDNA library construction of Russell's viper venom glands and gene expression analysis by expressed sequence tags. Poster presentation, RGJ seminar series. Mahidol University. 2004. (Poster presentation-awarded)
- **Sai-ngam A**, Phongtananant S, Nuchprayoon I. Study of phospholipase A2 genes and their expressions in Russell's viper venom glands. (In submission)
- **Sai-ngam A**, Nuchprayoon I. Expressed Sequence Tags Analysis of Thai Russell's Viper Venom Glands, Daboia siamensis. (Manuscript preparation)

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- "การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness)" เป็นผู้วิจัยร่วม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 2

1. **ชื่อผู้วิจัย** (ภาษาไทย) นางสาวมณฑน์มาศ สุนทราวัฒน์

(ภาษาอังกฤษ) Montamas Suntravat, B.Sc.

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน**

-

3. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**

หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567 โทรสาร -

E-mail: montamas@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วิทยาศาสตรบัณฑิต	เทคนิคการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2544
วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2544-ปัจจุบัน

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

-

6. ประสบการณ์วิจัย

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

-

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Nuchprayoon S, Sanprasert V, **Suntravat M**, Kraivichian K, Saksirisampant W, Nuchprayoon I. 2003 Study of specific IgG subclass antibodies for diagnosis of *Gnathostoma spinigerum*. Parasitology Research. 91: 137–143.

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- "การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness)" เป็นผู้วิจัยร่วม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 3

1. ชื่อผู้วิจัย (ภาษาไทย) นายพัทธดนย์ สุขพันธุ์

   (ภาษาอังกฤษ) Pattadon Sukkapun, B.Sc.

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

   -

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

   หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567 โทรสาร -

   E-mail: pattadons@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วิทยาศาสตรบัณฑิต	เทคนิคการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2546
วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	ชีวเวชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2544-ปัจจุบัน

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

   -

6. ประสบการณ์วิจัย

   6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

   -

   6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

   -

   6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

   -

   6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

   - "การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness)" เป็นผู้วิจัยร่วม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 4

1. **ชื่อผู้วิจัย** (ภาษาไทย) นางสาวธัญณิชา อ่อนดี

   (ภาษาอังกฤษ) Thunnicha ondee, B.Sc.

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน**

   -

3. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**

   หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567 โทรสาร -

   E-mail: kun9soon@yahoo.com@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร	2547
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	อณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2548-ปัจจุบัน

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ**

   -

6. ประสบการณ์วิจัย

   6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

   -

   6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

   -

   6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

   -

   6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

   - "การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness)" เป็นผู้วิจัยร่วม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 5

1. **ชื่อผู้วิจัย** (ภาษาไทย) นางสาวอุมาภรณ์ เมธเมาลี

(ภาษาอังกฤษ) Umaporn Methmaolee, B.Sc.

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

-

3. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**

หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567 โทรสาร -

E-mail: ying_ja1981@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วิทยาศาสตรบัณฑิต	วิทยาศาสตร์สุขภาพ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	2546
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	วิทยาศาสตร์การแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2550

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

-

6. ประสบการณ์วิจัย

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

-

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

-

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- "การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness)" เป็นผู้วิจัยร่วม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญาเลขที่ GRB_๐๕_๕๐_๓๐_๐๓

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

รายงานการรับ-จ่ายเงิน

	ประมาณการ	งบที่เกิดขึ้นจริง
รายได้		
เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน	1,200,000.00	3,200,000.00
รวมรายได้	1,200,000.00	3,200,000.00
รายจ่าย		
หมวดค่าจ้างชั่วคราว		
1) ผู้ช่วยวิจัยทางห้องปฏิบัติการ	120,000.00	120,000.00
2) ผู้ช่วยวิจัยทางห้องปฏิบัติการ	96,000.00	96,000.00
3) ผู้ช่วยวิจัยทางห้องปฏิบัติการ	96,000.00	96,000.00
4) เจ้าหน้าที่บัญชี และการเงิน	96,000.00	96,000.00
5) เจ้าหน้าที่ธุรการ	72,000.00	72,000.00
หมวดค่าตอบแทน		
1) ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000.00	120,000.00
หมวดค่าใช้สอย		
1) ค่าใช้จ่ายในการจัดเตรียมพิษงูแมวเซา	60,000.00	0.00
2) ค่าถ่ายสำเนา	20,000.00	600.00
3) ค่าจ้างเหมาจ่ายดูแลและซ่อมแซมวัสดุอุปกรณ์การวิจัย	20,000.00	0.00
4) ค่าใช้สอยทั่วไป		
- ค่าไปรษณีย์ ค่าโทรศัพท์ ค่าโทรสาร		14,263.98
หมวดค่าวัสดุ		
- ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	480,000.00	190,772.35
- ค่าวัสดุสำนักงาน และค่าวัสดุเบ็ดเตล็ด	20,000.00	10,136.14
หมวดค่าครุภัณฑ์		
-	0.00	0.00
รวมรายจ่าย	1,200,000.00	815,772.47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย