



สัญญาเลขที่ งป 009/2549

แผนงานวิจัยเรื่อง

การพัฒนาจากพิษงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก

**DRUG DEVELOPMENT FROM THE VENOM OF KING COBRA**

**(*OPHIOPHAGUS HANNAH*) : THE PRECLINICAL STUDIES**

รายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงานแผนงานวิจัยปีที่ 2  
(รวมระยะเวลาทำวิจัยตั้งแต่ 1 เมษายน 2550 ถึง 30 กันยายน 2550)



โดย

**รองศาสตราจารย์โสภิต ธรรมอาร์ และคณะผู้วิจัย**

**คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

**คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

**สถานเสาวภา สภากาชาดไทย**

**31 ตุลาคม 2550**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์

และเทคโนโลยีจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

และผลงานวิจัยนี้เป็นความรับผิดชอบของคณะผู้วิจัยแต่เพียงผู้เดียว



# โครงการที่ 1

การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของ  
พืชงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สัญญาเลขที่ GBR\_12\_50\_30\_10

### การรายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงาน

#### โครงการที่ 1

##### ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน  
(ภาษาอังกฤษ) Study of Quality Specification of King Cobra (*Ophiophagus hannah*)  
venom for Standardization

รายงานช่วงระยะตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2548 ถึง วันที่ 31 มีนาคม 2550

(โครงการวิจัยเสร็จสมบูรณ์ ระยะเวลาวิจัย 1 ปี 6 เดือน)

##### ชื่อหัวหน้าโครงการ

นางนฤมล พัทธมณี

##### หน่วยงาน

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

##### 1. การดำเนินงาน :

[ / ] ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ

[ ] ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

1.1 การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของพิษงูจงอาง ได้แก่ ลักษณะผงพิษงู สี โดยการสังเกต และบันทึกผล ตามแผนงานเดิมวางไว้ว่าจะได้พิษงูจงอางทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ในลักษณะพิษแห้ง แต่พิษงูจงอางแห้งมีไม่เพียงพอที่จะจำหน่ายให้ เนื่องจากทางสถานเสาวภาจะต้องเก็บเป็น stock สำหรับใช้ในงานผลิตเซรุ่มแก้พิษงู จึงรวบรวมพิษงูจงอาง โดยรีดพิษสดจากงูจงอางในโครงการเพาะเลี้ยงงู และในสวนงู ของสถานเสาวภา แยกพิษงูเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 พิษของงูที่กักจากไข่ที่ได้มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ อายุ 3 ปี (3 ขวด) และ 9 ปี (4 ขวด) กลุ่มที่ 2 พิษของงูที่กักจากไข่ที่ได้มาจากภาคใต้ อายุ 5 ปี (6 ขวด) และกลุ่มที่ 3 พิษของงูจงอางในสวนงู (3 ขวด) ได้มาจากภาคใต้ แล้วทำเป็นผงแห้งโดยวิธี lyophilization ทั้งหมด 16 ขวด จำนวน 9 lots ดังตารางที่ 1 จึงนำพิษงูจากแต่ละ lot มาทำการศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพ และนำตัวอย่างพิษงูจากแต่ละกลุ่มมาศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมี ตามแผนงานวิจัย

1.2 ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของพิษงูจงอาง นำตัวอย่างพิษงูจงอาง lot ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีดังนี้

1.2.1 ปริมาณ โปรตีน (Protein content) โดยใช้วิธีของ Bradford

1.2.2 รูปแบบโปรตีน โดยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีของ Laemmli และเทคนิค 2-Dimensional electrophoresis

1.2.3 วัด activity ของเอนไซม์ เหล่านี้ ในพิษงูจงอาง

1. L-amino acid oxidase ตามวิธีของ Tan และคณะ
2. Phospholipase A ตามวิธีของ Tan และคณะ
3. Phosphomonoesterase ตามวิธีของ Tan และคณะ
4. 5' Nucleotidase ตามวิธีของ Heppel และ Hilmore
5. Acetylcholinesterase ตามวิธีของ Ellman และ คณะ
6. Proteolytic activity ตามวิธีของ Kunitz

1.2.4 ศึกษา biological activities ของพิษงูจงอาง โดยศึกษา activities ดังต่อไปนี้

1. Hemolysis ตามวิธีของ Karlson และคณะ
2. Neurotoxicity
3. Coagulation ตามวิธีของ WHO Collaborating Center
4. Cytotoxicity โดยทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์และ cell lines

2. สรุปผลการดำเนินงาน

2.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของพิษงูจงอาง

รวบรวมพิษงูจงอาง โดยรีดพิษสดจากงูจงอางในโครงการเพาะเลี้ยงงู และในสวนงู ของสถานเสาวภา แยกพิษงูเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 พิษของงูที่กักจากไข่ที่ได้มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ อายุ 3 ปี ( 3 ขวด) และ 9 ปี ( 4 ขวด) กลุ่มที่ 2 พิษของงูที่กักจากไข่ที่ได้มาจากภาคใต้ อายุ 5 ปี( 6 ขวด) และกลุ่มที่ 3 พิษของงูจงอางในสวนงู (3 ขวด) ได้มาจากภาคใต้ แล้วทำเป็นผงแห้งโดยวิธี lyophilization ทั้งหมด 16 ขวด จำนวน 9 lots และบันทึกน้ำหนักของพิษงูแห้งดังกล่าวในตารางที่ 1 สังเกตลักษณะเฉพาะทางกายภาพของพิษงูจงอางคือลักษณะของผงพิษงูแห้ง สีของพิษงูแห้ง และบันทึก ดังแสดงผลในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดง Lot และที่มาของพิษงู

พิษงูตัวอย่างที่	Lot No.	จำนวน (ขวด)	น้ำหนักรวม (กรัม)	ที่มาของงูจงอาง	สถานที่เลี้ยงงู	อายุของงู (ปี)
1	OH250142(1)	2	3.8212	เพชรบูรณ์	โครงการเพาะเลี้ยงงู	3
2	OH260142(2)	3	6.5777	เพชรบูรณ์	โครงการเพาะเลี้ยงงู	3
3	OH150948-39/1	1	0.5217	เพชรบูรณ์	โครงการเพาะเลี้ยงงู	9
4	OH150948-39/2	2	0.6034	เพชรบูรณ์	โครงการเพาะเลี้ยงงู	9
5	OH150948-43/1	2	1.7383	ภาคใต้	โครงการเพาะเลี้ยงงู	5
6	OH150948-43/2	2	1.8563	ภาคใต้	โครงการเพาะเลี้ยงงู	5
7	OH150948-43/3	2	1.7886	ภาคใต้	โครงการเพาะเลี้ยงงู	5
8	OHFARM031048/1	1	1.1820	ภาคใต้	สวนงู	-
9	OHFARM031048/2	1	1.3159	ภาคใต้	สวนงู	-

ตารางที่ 2 ลักษณะเฉพาะทางกายภาพของพินูจององและปริมาณ โปรตีนในพินูจององ

Sample No.	Lot	Physical appearance		Protein content (BSA* equivalent) %
		General appearance	Colour	
1	OH 250142(1)	Fine powder	Yellow	24.99
2	OH 260542(2)	Fine powder	Yellow	24.56
3	OH 150948-39/1	Cake (effervesced)	Creamy	28.21
4	OH 150948-39/2	Cake (effervesced)	Creamy	26.55
5	OH 150948-43/1	Cake (effervesced)	Creamy	20.24
6	OH 150948-43/2	Cake (effervesced)	Yellow	19.39
7	OH 150948-43/3	Cake (effervesced)	Creamy	20.36
8	OHFARM 031048/1	Cake (effervesced)	Creamy	23.35
9	OHFARM 031048/2	Cake (effervesced)	Creamy	23.36

BSA \* Bovine serum albumin

ผลในตารางที่ 2 พบว่า ลักษณะพินูจององ lot 1 และ lot 2 เป็นผงละเอียด ส่วนพินูจององ lots อื่นๆ มีลักษณะเป็น cake และมีการเกิดเป็นฟองในขั้นตอนการทำแห้ง พินูจององมีสีครีมและสีเหลือง นอกจากนี้พบว่าปริมาณ โปรตีนกับสีของพินูจององไม่มีความสัมพันธ์กัน

## 2.2 ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของพินูจององ

นำพินูจององทุก lot วัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยใช้ Bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 และวัด activities ของเอนไซม์ Phosphomonoesterase, Phosphodiesterase, Proteolytic activity, Phospholipase A2 ,L-amino acid oxidase และ Acetylcholinesterase ดังแสดงผลในตารางที่ 3 สำหรับการวัด ความเป็นพิษของพินูจององที่นำมาศึกษานี้ได้นำ Lot ที่ 2,6 และ 9 เป็นตัวแทนของพินูจององ 3 กลุ่มมาหาความเป็นพิษ (lethal toxicity, LD<sub>50</sub>) จากผลการวัด activities ของ enzymes ทั้ง 5 พบว่า

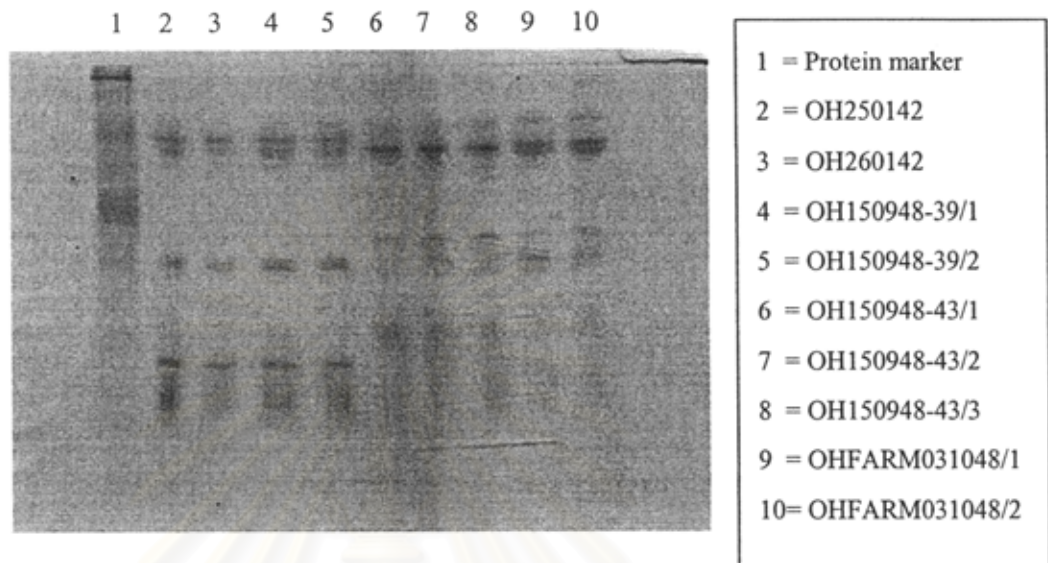
1. พินูจององที่ได้มาจากเพชรบูรณ์มีความเป็นพิษมากกว่าพินูจององที่ได้มาจากภาคใต้
2. พินูจององที่ได้จากธรรมชาติพบว่ามี activity ของเอนไซม์ Phosphomonoesterase และ proteolytic activity สูงกว่าพินูจององที่ได้จากพินูจององที่เลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยง
3. พินูจององที่ได้จากธรรมชาติพบว่ามี activity ของเอนไซม์ L-amino acid oxidase ต่ำกว่าพินูจององที่ได้จากพินูจององที่เลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยง

### 2.2.1 ศึกษาารูปแบบโปรตีนของพินูจององ

โดยเทคนิค SDS-PAGE

ได้นำพินูจององทั้ง 9 lots มาศึกษารูปแบบโปรตีน โดยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate

polyadrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าพิษงูที่ได้มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ มีรูปแบบโปรตีนแตกต่างจากพิษงูจางที่ได้มาจากภาคใต้ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงรูปแบบโปรตีนของพิษงูจางที่ได้มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ (2-5) และภาคใต้ (6-10) ของประเทศไทย โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

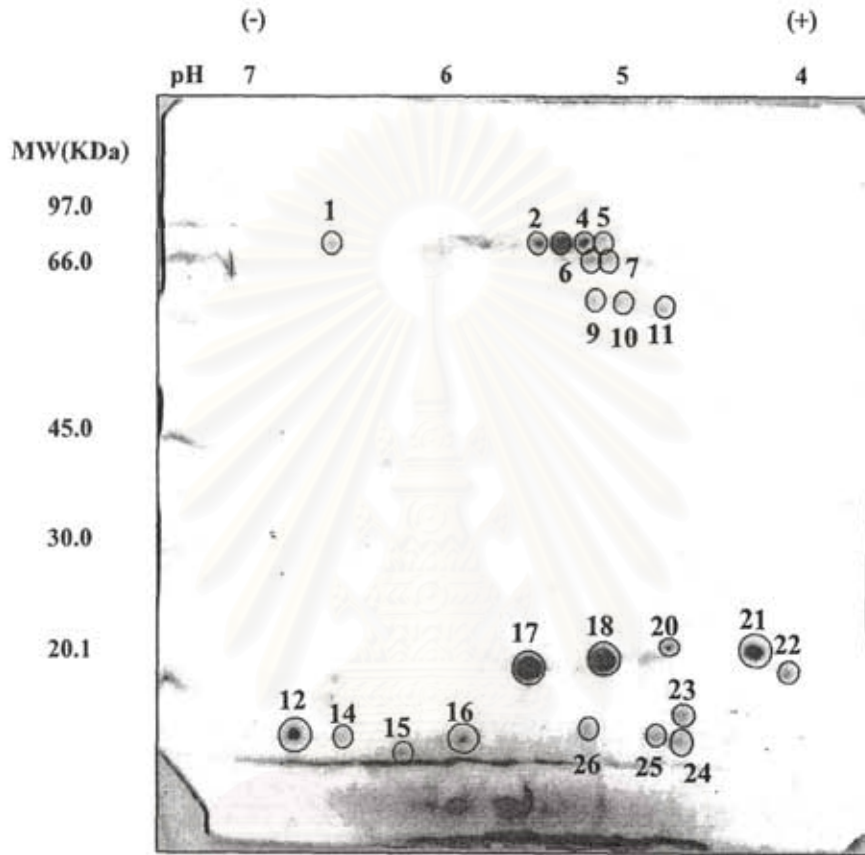
ตารางที่ 3 ค่าความเป็นพิษและ enzymatic activities ของพิษงูจาง

Sample No.	Lot	LD <sub>50</sub> ug/mouse	Phosphomono- esterase (u)	Phosphodi- esterase (u)	Proteolytic activity (u)	PLA2 (u)	L-amino acid oxidase (u)	Acetylcholin- Esterase <sup>(a)</sup> mmol/min/g
1	OH 250142(1)		23.43	14.93	0.25	51.62	250.85	0.0112
2	OH 260542(2)	32.96	21.74	12.93	0.29	44.57	202.60	0.0064
3	OH 150948-39/1		28.56	12.4	0.32	59.87	190.30	0.0156
4	OH 150948-39/2		26.31	12.93	0.30	56.90	180.37	0.0123
5	OH 150948-43/1		30.57	15.00	0.55	44.08	229.05	0.0297
6	OH 150948-43/2	88.29	29.36	13.6	0.52	47.19	220.70	0.0327
7	OH 150948-43/3		28.08	15.77	0.54	44.35	241.25	0.0270
8	OHFARM 031048/1		57.04	10.85	0.75	35.93	140.40	0.0280
9	OHFARM 031048/2	77.82	56.15	12.75	0.75	42.59	140.00	0.0243

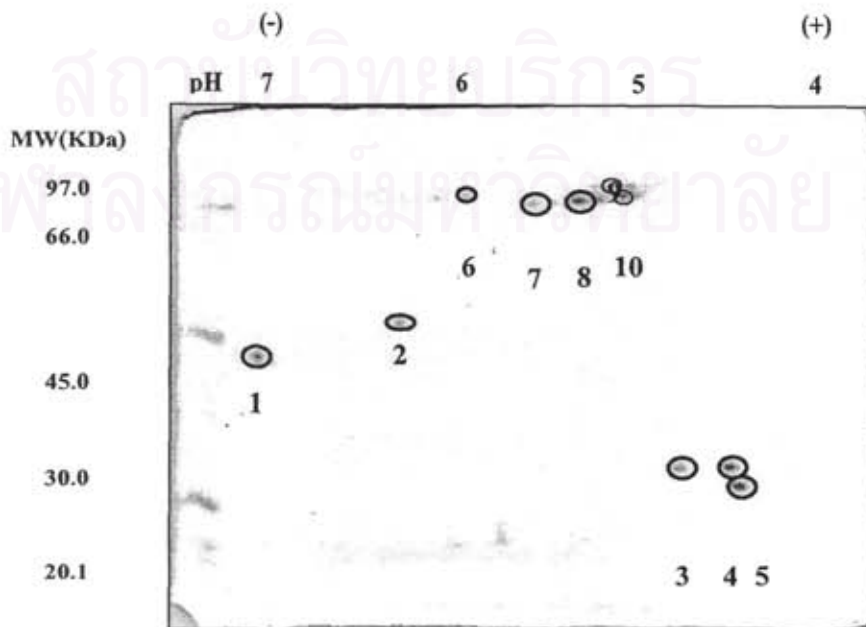
<sup>(a)</sup> venom preparation 0.1 mg/ml

ศึกษารูปแบบโปรตีนของพิษงูจงอาง โดยเทคนิค 2-dimension electrophoresis

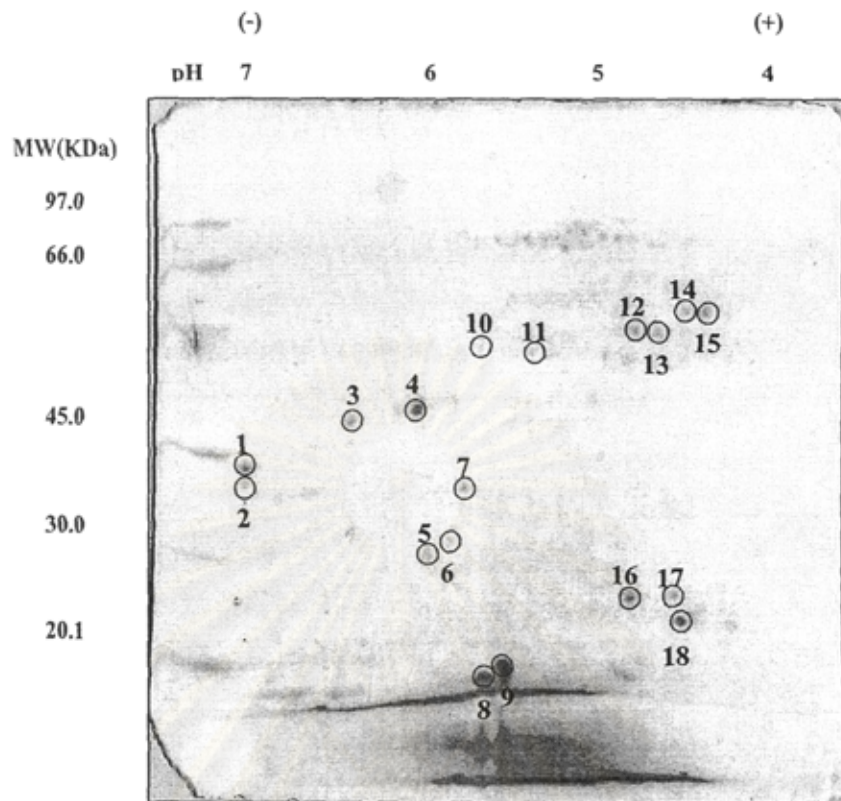
นำพิษงูจงอาง lot 2 (OH 260542) , lot6(OH 150948-43) และ lot9 (OHFARM 031048) มาศึกษา  
รูปแบบโปรตีนโดยใช้เทคนิค 2-dimension electrophoresis เพื่อให้เห็นรูปแบบโปรตีนชัดเจนมากขึ้นดังผล  
ในภาพที่ 2,3 และ 4



ภาพที่ 2 รูปแบบโปรตีน 2-DE gel ของพิษงูจงอาง lot 2 (OH 260542) ที่ช่วง pH 4-7



ภาพที่ 3 รูปแบบโปรตีน 2-DE gel ของพิษงูจงอาง lot 6 (OH 150948-43) ที่ช่วง pH 4-7



ภาพที่ 4 รูปแบบโปรตีน 2-DE gel ของพิษงูจงอาง lot 9 (OHFARM 031048) ที่ช่วง pH 4-7

### 2.2.2 การศึกษา biological activities ของพิษงูจงอาง

ได้นำพิษงูจงอางทั้ง 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 พิษของงูที่กจากไข่ที่ได้มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ กลุ่มที่ 2 พิษของงูที่กจากไข่ที่ได้มาจากภาคใต้ และกลุ่มที่ 3 พิษของงูจงอางได้มาจากภาคใต้และเลี้ยงในสวนงู มาศึกษา hemolytic activity, neurotoxicity, coagulation activity ตามวิธีของ Theakston and Reid; 1983 และ cytotoxicity โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เทียบกับยาค้านมะเร็ง Doxorubicine โดยพิจารณาจากค่า IC<sub>50</sub> (Inhibition concentration 50) คือ ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 50% เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม(BT 474) เซลล์มะเร็งปอด (Chago) เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) เซลล์มะเร็งกระเพาะ(KATO-III) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW 620) ผลการศึกษาได้สรุปไว้ในตารางที่ 4 และ 5 ซึ่งพบว่า พิษงูทุก lots ไม่มี coagulation activities neurotoxicity ของพิษงูจงอาง มีความสอดคล้องกับค่าความเป็นพิษ (LD<sub>50</sub>) จะเห็นว่า ความเป็นพิษของพิษงูจงอางกลุ่มที่ 1 ที่มาจากเพชรบูรณ์ มีความเป็นพิษสูงที่สุด รองลงมาคือพิษงูกลุ่มที่ 3 มาจากภาคใต้และเลี้ยงในสวนงู และพิษงูจงอางจากภาคใต้และเลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยงงูมีความเป็นพิษต่ำสุด ผลของ neurotoxicity ได้ผลทำนองเดียวกันคือ พิษงูจงอางกลุ่มที่ 1 มี neurotoxicity มากกว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ตามลำดับ (กลุ่มที่ 1 > กลุ่มที่ 2 > กลุ่มที่ 3) ผลการศึกษา hemolytic activity พบว่า พิษงูกลุ่มที่ 3 มี hemolytic activity สูงกว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 1

ส่วนการศึกษา cytotoxicity โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เทียบกับยาค้านมะเร็ง Doxorubicine พบว่าพิษงูจงอางกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นงูจากภาคใต้และนำมาเลี้ยงในสวนงู (แบบ



ธรรมชาติ) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม ปอด ตับ กระเพาะอาหาร ต่ำกว่า พิษงูจงอางกลุ่มอื่น และขาดันมะเร็ง แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ได้เทียบเท่า พิษงูอื่นๆ พิษงูจงอางกลุ่มที่ 1 และ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม ปอด ตับ ได้ใกล้เคียงกับขาดัน มะเร็ง พิษงูจงอางกลุ่มที่ 1 และ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร ได้ดีกว่าขาดัน มะเร็ง Doxorubicine (ตารางที่5)

ตารางที่ 4 Biological activity ของพิษงูจงอาง

Vial No.	Sample No.	Lot	Protein content (BSA*equivalent) %	Coagulation		Hemolytic (DW Equi.) %	Neurotoxic. 50%inhibit. <sup>(a)</sup> min.
				MCD-P** mg/L	MCD-F*** mg/L		
1	1	OH 250142(1)	24.99	No	No	1.94	
3	2	OH 260542(2)	24.56	No	No	-	4.20
6	3	OH 150948-39/1	28.21	No	No	0.80	
7	4	OH 150948-39/2	26.55	No	No	0.91	
9	5	OH 150948-43/1	20.24	No	No	10.39	
11	6	OH 150948-43/2	19.39	No	No	8.68	7.74
13	7	OH 150948-43/3	20.36	No	No	0.91	
15	8	OHFARM031048/1	23.35	No	No	-	
16	9	OHFARM031048/2	23.36	No	No	11.53	6.44

Venom preparation for testing 1 mg/ml

Protein content

Bradford 1976

Coagulation

Theakston & Reid 1983

BSA \*

Bovine seruma albumin

MCD-P \*\*

Minimum coagulant dose of bovine fibrinogen

MCD-F \*\*\*

Minimum coagulant dose of standard human plasma

Hemolytic activity

Karlson E. et al.,1971

Neurotoxic activity (<sup>(a)</sup> venom preparation 2 mg/ml)

ตารางที่ 5 การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ โดยพิษงูจงอาง Lot 2,6 และ 9

IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )

สาร	BT 474	Chago	Hep-G <sub>2</sub>	KATO-III	SW620
OH 2	0.88	0.67	0.79	0.63	0.62
OH 6	0.94	0.72	0.67	0.85	0.68
OH 9	6.30	6.60	6.52	6.28	0.67
Doxorubicine	0.70	0.55	0.61	> 10	0.10

BT 474 (เซลล์มะเร็งเต้านม), Chago (เซลล์มะเร็งปอด), Hep-G<sub>2</sub> (เซลล์มะเร็งตับ), KATO-III (เซลล์มะเร็งกระเพาะ) และ SW 620 (เซลล์มะเร็งลำไส้)

### 3. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

โครงการที่ 1 ได้ดำเนินการเสร็จตามแผนงานวิจัย

### 4. อุปสรรคในการดำเนินงานและแนวทางแก้ไข

ไม่มี

สถาบันนวัตกรรมการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางนฤมล พัทธมณี  
(หัวหน้าโครงการที่ 1)

30 กันยายน 2550

ตารางที่ 5 การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ โดยพินิจงอง Lot 2,6 และ 9

IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )

สาร	BT 474	Chago	Hep-G <sub>2</sub>	KATO-III	SW620
OH 2	0.88	0.67	0.79	0.63	0.62
OH 6	0.94	0.72	0.67	0.85	0.68
OH 9	6.30	6.60	6.52	6.28	0.67
Doxorubicine	0.70	0.55	0.61	> 10	0.10

BT 474 (เซลล์มะเร็งเต้านม), Chago (เซลล์มะเร็งปอด), Hep-G<sub>2</sub> (เซลล์มะเร็งตับ), KATO-III (เซลล์มะเร็งกระเพาะ) และ SW 620 (เซลล์มะเร็งลำไส้)

### 3. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

โครงการที่ 1 ได้ดำเนินการเสร็จตามแผนงานวิจัย

### 4. อุปสรรคในการดำเนินงานและแนวทางแก้ไข

ไม่มี

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางนฤมล พักมณี  
(หัวหน้าโครงการที่ 1)

30 กันยายน 2550



## โครงการที่ 2

การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาสารประกอบ  
ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาท  
ที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญาเลขที่ GBR\_12\_50\_30\_10

การรายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงาน  
โครงการที่ 2

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การแยกส่วนพิษงูจงอาง เพื่อหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

(ภาษาอังกฤษ) Fractionation of neuromuscular blocking activity compound from King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom

รายงานช่วงระยะตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2548 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2550  
(โครงการวิจัยเสร็จสมบูรณ์ ระยะเวลาวิจัย 2 ปี)

ชื่อหัวหน้าโครงการ

รศ. โสภิต ธรรมอารี

หน่วยงาน

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การดำเนินงาน :

ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ

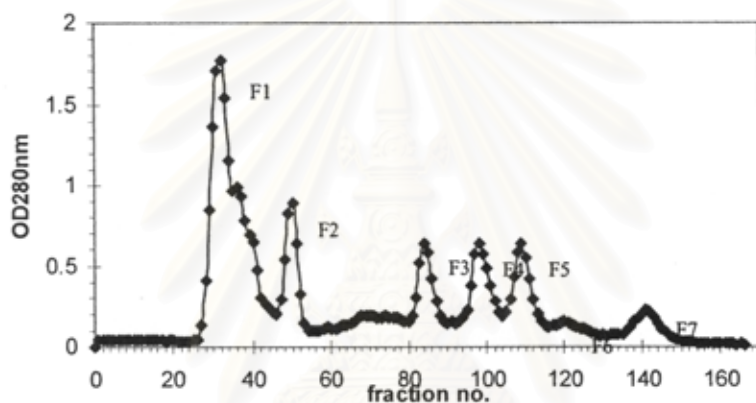
ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

1.1 การแยกส่วนพิษงูจงอาง

การแยกส่วนพิษงูจงอางจะต้องทำโดยใช้ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อใน phrenic nerve-diaphragm preparation ที่แยกจากกายนูเมาส์ เป็นตัวชี้นำ และเปรียบเทียบกับการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของพิษงูจงอาง หรือส่วยย่อยของพิษงูจงอางที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (Lethality) ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นจึงได้ทำการแยกองค์ประกอบของพิษงูจงอางโดยใช้ความเป็นพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (โครงการวิจัยที่ 4) เป็นตัวบ่งชี้วิธีหนึ่ง

1.1.1 จากการแยกพิษงูจงอางด้วยวิธี ion exchange chromatography โดยนำสารละลายพิษงูจงอาง 100 มิลลิกรัม ที่ละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.4 ผ่านลงในคอลัมน์ Q-Sepharose

(28x3 cm) ชะด้วย linear gradient ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 โมลาร์ เก็บแยก ส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละ หลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างสารละลายแต่ละหลอดกับค่า ดูดกลืนแสง พบว่า สามารถแยกพิษได้ 7 พีก (F1-F7) ผลการแยกดังแสดงในภาพที่ 1 นำแต่ละพีกไป ทดสอบความเป็นพิษในหนู mouse โดยใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่แยกได้ในแต่ละพีกปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำที่หางหนู mouse พบว่าโปรตีนในพีกที่ 1(F1) เท่านั้นที่มีความเป็น พิษ จากนั้นจึงทำการเจือจางปริมาณ โปรตีนในพีกที่ 1 (F1) เพื่อหาค่าความเป็นพิษ (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 การแยกพิษขององคางด้วยเทคนิค ion exchange chromatography (คอลัมน์ Q-Sepharose)

เมื่อกำหนดค่าความเป็นพิษ (LD<sub>50</sub>) มีค่าเท่ากับ 12.4 ไมโครกรัม ต่อ หนูถีบจักรน้ำหนัก 18 – 20 กรัม

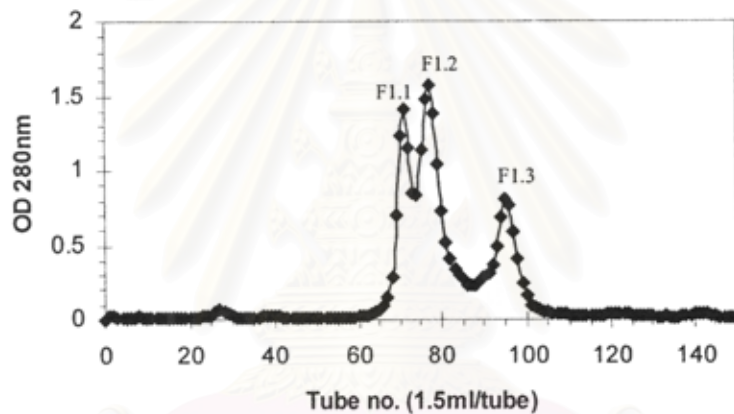
ตารางที่ 1 การหาค่าความเป็นพิษของพิษขององคางที่ผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose

ug/mouse			total		% mortality
	S	D	S	D	
9.64	3	0	4	0	0
13.5	1	2	1	2	67
18.9	0	3	0	5	100
26.5	0	3	0	8	100

1.1.2 นำโปรตีนในพีกที่ 1(F1) ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Collodion bag ได้ส่วนที่เข้มข้น ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรมีปริมาณ โปรตีน 40 มิลลิกรัม

1.1.3 แยกส่วนพีคที่ 1 (F1) โดยวิธี gel filtration chromatography โดยนำโปรตีนของพีคที่ 1(F1) ที่เข้มข้นไปผ่านลงในคอลัมน์ Cellulofine GCL-1000 sf (29x2.8 cm) ละเอียดด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ผสมกับ 0.05 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ pH 8.0 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายทุกหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ผลการแยกดังแสดงในภาพที่ 2

1.1.4 รวมส่วนประกอบย่อยที่แยกได้ตามโครมาโตแกรม (chromatogram) ได้ 3 พีค (F1.1, F1.2, F1.3) นำแต่ละพีคไปทดสอบความเป็นพิษในหนู mouse โดยในขั้นแรกได้ทำการเจือจางพิษให้มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมในทุกพีค



ภาพที่ 2 การแยกพิษงูจงอางด้วยเทคนิค gel filtration chromatography

และฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำที่หางหนู mouse พบว่ามีเพียงพีคที่ 2 (F1.2) เท่านั้นที่ทำให้หนูทดลองตาย จากนั้นจึงได้เจือจางพิษในพีคที่ 2 (F1.2) ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่าความเป็นพิษ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจงอางที่ผ่านคอลัมน์ Cellulofine GCL-1000 sf

ug/mouse			total		% mortality
	S	D	S	D	
5.6	2	1	3	1	25
8	1	2	1	3	75
11.2	0	3	0	6	100
15.6	0	3	0	9	100

เมื่อกำหนดค่าความเป็นพิษ ( $LD_{50}$ ) มีค่าเท่ากับ 6.63 ไมโครกรัม ต่อ หนูถีบจักรน้ำหนัก 18 – 20 กรัม

#### 1.1.5 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของส่วนประกอบที่แยกได้ด้วยวิธี

1) SDS-PAGE โดยใช้เจลที่มีความเข้มข้น 15% โปรตีนจากพีคที่ 2 พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว แต่มีลักษณะกว้าง น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 คาลตัน

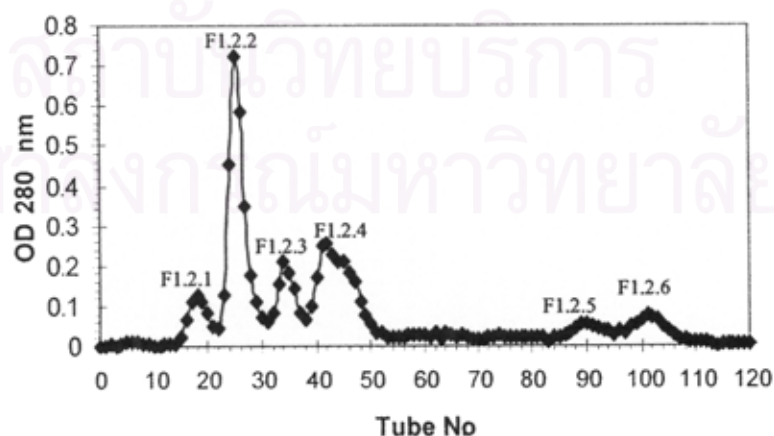
2) Disc-PAGE พบแถบโปรตีน 3 แถบ

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่แยกได้สรุปว่า โปรตีนจากพีคที่ 2 หลังการแยกด้วยวิธี gel filtration chromatography ประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 3 ชนิดที่มีประจุต่างกัน แต่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน

1.1.6 รวมส่วนประกอบย่อยพีคที่ 2 (F1.2) ที่ได้จากคอลัมน์ Cellulofine GCL-1000 sf นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ collodion bag ได้ส่วนที่เข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรมีปริมาณโปรตีน 13 มิลลิกรัม

1.1.7 นำส่วนประกอบที่เข้มข้นนี้ไปทำการกำจัดเกลือด้วยวิธี dialysis ใน 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.25

1.1.8 โปรตีนที่ได้หลังการกำจัดเกลือ นำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Ion-exchange chromatography โดยผ่านลงในคอลัมน์ SP-sepharose (5.7x2.5 cm) ทำการชะด้วย เกรเดียนความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-0.2 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.25 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายทุกหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ผลการแยกได้ 6 พีค (F1.2.1, F1.2.2, F1.2.3, F1.2.4, F1.2.5, F1.2.6) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การแยกพิษงูของางด้วยเทคนิค ion exchange chromatography (คอลัมน์ SP-Sepharese)



1.1.9 ส่วนประกอบย่อยที่แยกได้ตาม chromatogram ได้ 6 พีค (F1.2.1, F1.2.2, F1.2.3, F1.2.4, F1.2.5, F1.2.6) นำแต่ละพีคไปทดสอบความเป็นพิษในหนูเมาส์ (โครงการวิจัยที่ 4) พบว่าหนูทดลองที่ได้รับพิษในพีคที่ 1 ถึง 4 เท่านั้นที่ตาย ส่วนพีคที่ 5-6 แม้ว่าจะใช้พิษปริมาณสูงสุดที่แยกได้ก็ไม่สามารถทำให้สัตว์ทดลองตายได้ สรุปผลการแยกพิษงูจงอางไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สรุปผลการแยกพิษงูจงอาง

ขั้นตอนการแยก	โปรตีน (มิลลิกรัม)	LD <sub>50</sub> (มิลลิกรัม)	ผลรวมของ LD50	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude venom	100	0.0284	3521.43	1	100
Q-Sepharose column F 1	40	0.0124	3225.8	2.3	90.8
Cellulofine GCL- 1000 sf column F 1.2	13	0.0066	1969.7	4.3	57.8
SP-Sepharose column					
F 1.2.1	0.76	0.0072	105.55	3.9	3.0
F 1.2.2	3.47	0.0048	722.91	5.9	20.5
F 1.2.3	1.19	0.0049	242.86	5.8	6.9
F 1.2.4	2.6	0.0040	650.00	7.1	18.5

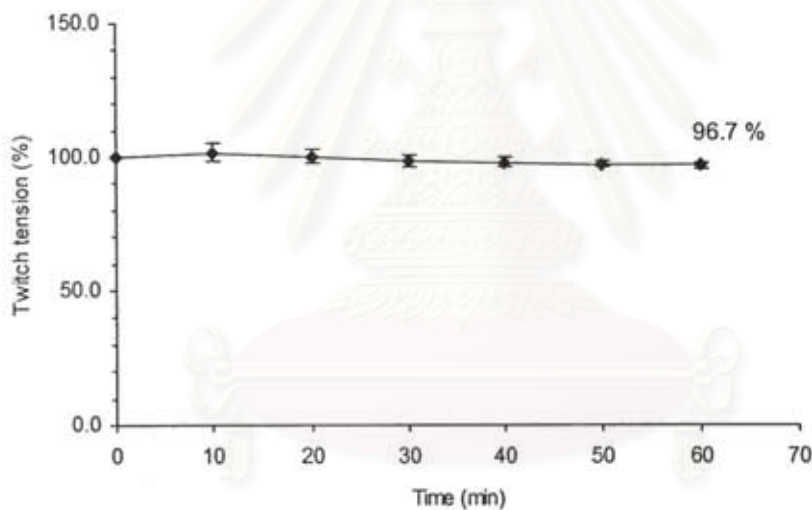
### 1.2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

นำพิษงูจงอาง และแต่ละ fraction ที่แยกได้ในขั้นตอนที่ 1 คือ F1 – F7 ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อโดยใช้ phrenic nerve-diaphragm preparation ที่แยกจากกายหนูเมาส์ เป็นรูปแบบการศึกษา จากผลการศึกษา F1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ จึงนำ F1 ไปแยกขั้นตอนที่ 2 ได้ F1.1, F 1.2, F1.3 นำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ จากผลการศึกษา F1.2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ จึงนำ F1.2 ไปแยกขั้นตอนที่ 3 ได้ F1.2.1, F1.2.2, F1.2.3, F1.2.4 นำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ วิธีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อขั้นตอนต่างๆ โดยละเอียด และการศึกษาตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ มีดังนี้

## 1) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของพิษงูจงอางและ fractions

### 1.1) การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าโดยใช้ suction electrode (control, n = 5)

การทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 0.2 msec) โดยใช้ suction electrode ทั้งนี้ไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage จะอยู่ในช่วง 4-10 โวลต์ พบว่ากล้ามเนื้อกระบังลมสามารถหดตัวได้มากกว่า 4 ชั่วโมง โดยการหดตัวจะค่อย ๆ ลดลงทีละน้อย ซึ่งกล้ามเนื้อเกิดการหดตัวคงที่ (ลดลงไปไม่เกิน 5%) ได้ภายใน 60 นาที พบว่าการหดตัวลดลงอยู่ที่ 96.7% ในนาทีที่ 60 ดังนั้นจึงใช้ช่วงเวลานี้สำหรับการทดลองต่อไป (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 4 การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage โดยใช้ suction electrode แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

### 1.2) ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของพิษงูจงอาง (n = 5)

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของพิษงูจงอาง (crude venom) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 160  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิด 50% inhibition ได้แก่  $23.4 \pm 0.9$ ,  $19.7 \pm 0.5$ ,  $9.1 \pm 0.4$ ,  $6.9 \pm 0.3$ ,  $4.2 \pm 0.1$  และ  $4.0 \pm 0.1$  นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 10) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับความเข้มข้นของพิษงู พบว่าพิษงูจงอางที่ความ

เข้มข้น 80  $\mu\text{g/ml}$  เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ให้ฤทธิ์มากที่สุด และให้ฤทธิ์ยับยั้งไม่ต่างกับพิษงูจงอาง ที่ความเข้มข้น 160  $\mu\text{g/ml}$  อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 11) ดังนั้นจึงใช้พิษงูจงอางที่ความเข้มข้น 80  $\mu\text{g/ml}$  เป็นค่าตั้งต้นในการคำนวณหาความเข้มข้นของ Fraction F1 – F7 ที่จะใช้ศึกษาต่อไป

### 1.3) ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทของ Fraction F1 – F7 (n = 5)

เมื่อคำนวณความเข้มข้นของ F1 – F7 ตาม % yield ของโปรตีน ที่ได้ของแต่ละ fraction ทำให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละ fraction ที่ใช้ตามตารางที่ 1 และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทของ F1 – F7 ให้ผลดังตารางที่ 1 ซึ่ง F1 มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทดีที่สุด (ภาพที่ 12) ดังนั้นจึงทำการแยก F1 เพื่อให้ได้ส่วนที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไป

### 1.4) ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทของ F1.1 – F1.3 (n = 5)

เมื่อคำนวณความเข้มข้นของ F1.1 – F1.3 ตาม % yield ของโปรตีน ที่ได้ของแต่ละ fraction ทำให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละ fraction ที่ใช้ตามตารางที่ 2 และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทของ F1.1 – F1.3 ให้ผลดังตารางที่ 2 ซึ่ง F1.2 มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทดีที่สุด (ภาพที่ 13) ดังนั้นจึงทำการแยก F1.2 เพื่อให้ได้ส่วนที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไป

### 1.5) ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทของ semi-purified fractions (n = 5)

เมื่อคำนวณความเข้มข้นของ F1.2.1 – F1.2.4 ตาม % yield ของโปรตีน ที่ได้ของแต่ละ fraction ทำให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละ fraction ที่ใช้ตามตารางที่ 3 และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทของ F1.2.1 – F1.2.4 ให้ผลดังตารางที่ 3 และภาพที่ 14 ซึ่ง F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทที่ดี และมีฤทธิ์ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงทำการศึกษาทั่วโลกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1 – F7 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเรียบประสาท

Fraction No.	Yield (%)	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Time taken to cause 50% inhibition (min)	Twitch tension at the 50 <sup>th</sup> minute after fractions added (%)
crude	-	80	4.2 $\pm$ 0.1	-
1	38.1	30.5	4.6 $\pm$ 0.2	-
2	10.4	8.3	-	83.4 $\pm$ 2.1
3	9.3	7.4	-	70.7 $\pm$ 1.9
4	11.3	9.0	-	67.5 $\pm$ 4.5
5	11.3	9.0	-	90.1 $\pm$ 2.9
6	4.1	3.3	-	84.3 $\pm$ 2.9
7	5.4	4.3	-	83.5 $\pm$ 2.7

แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.1 – F1.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเรียบประสาท

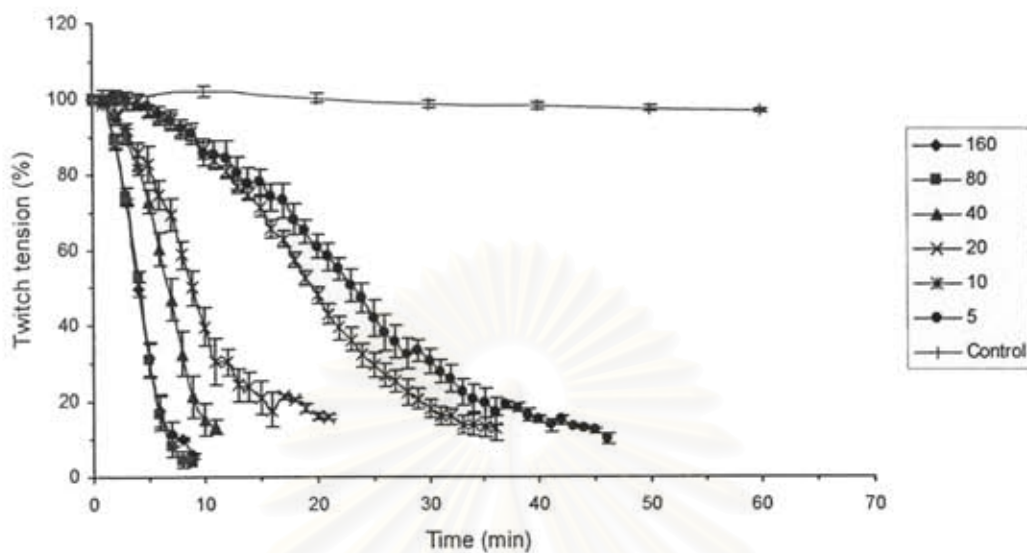
Fraction No.	Yield (%)	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Time taken to cause 50% inhibition (min)	Twitch tension at the 50 <sup>th</sup> minute after fractions added (%)
1	-	30.5	4.6 $\pm$ 0.2	-
1.1	23.9	7.3	42.8 $\pm$ 2.7	-
1.2	54.4	16.6	4.3 $\pm$ 0.3	-
1.3	29.2	8.9	-	70.5 $\pm$ 3.1

แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

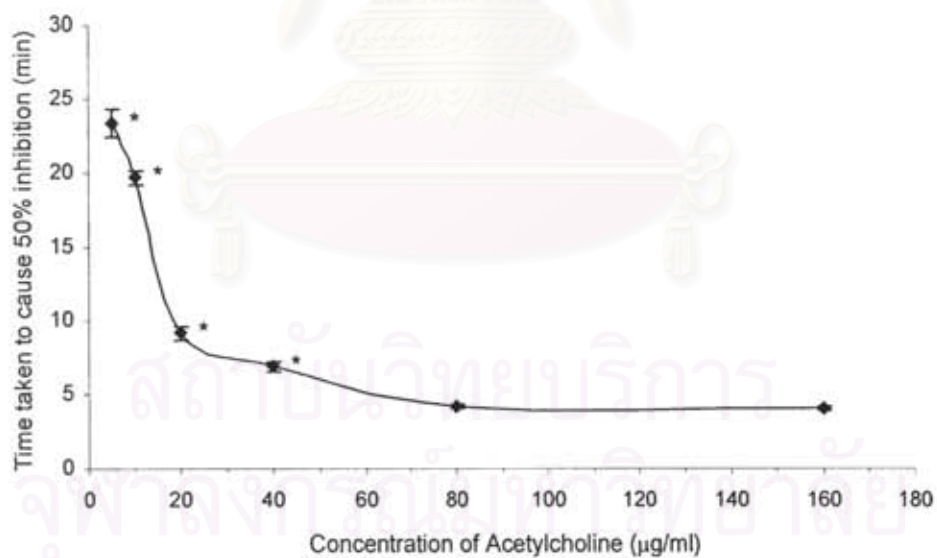
ตารางที่ 6 แสดงความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.2.1 – F1.2.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเรียบประสาท

Fraction No.	Yield (%)	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Time taken to cause 50% inhibition (min.)
1.2	-	16.6	4.3 $\pm$ 0.3
1.2.1	8.5	1.4	30.7 $\pm$ 2.0
1.2.2	26.8	4.4	7.4 $\pm$ 0.4
1.2.3	10.2	1.7	12.8 $\pm$ 0.3
1.2.4	22.2	3.7	9.5 $\pm$ 0.5

แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

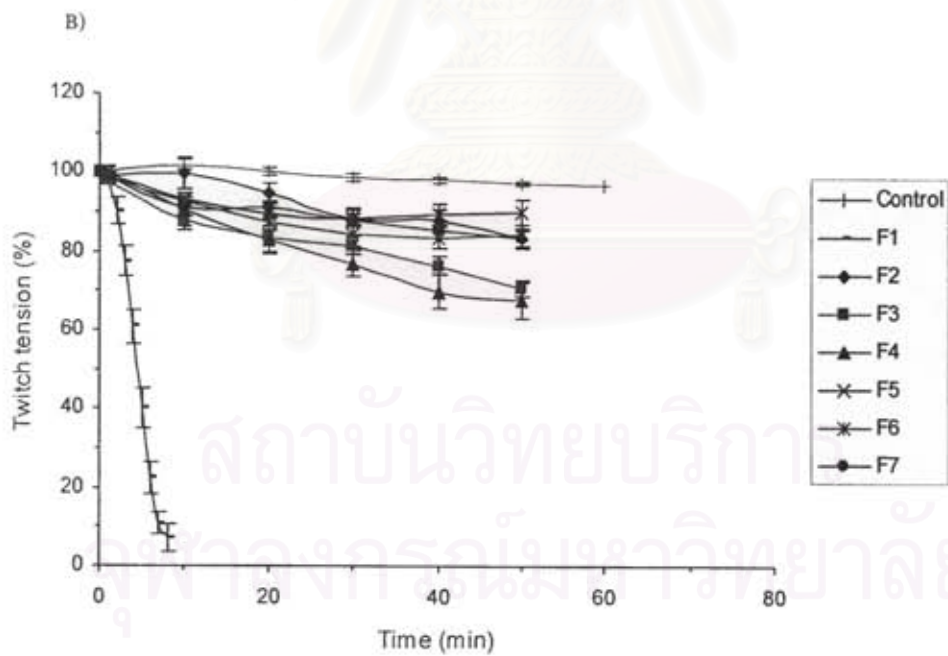
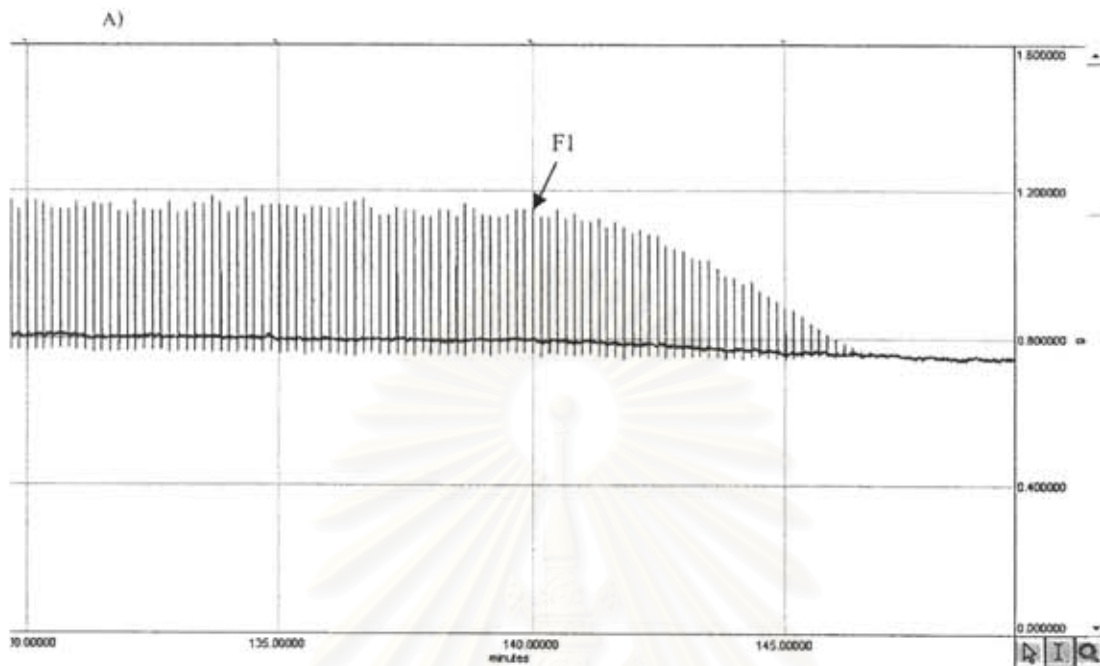


ภาพที่ 5 อฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอางที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 160  $\mu\text{g/ml}$  และกลุ่ม control แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

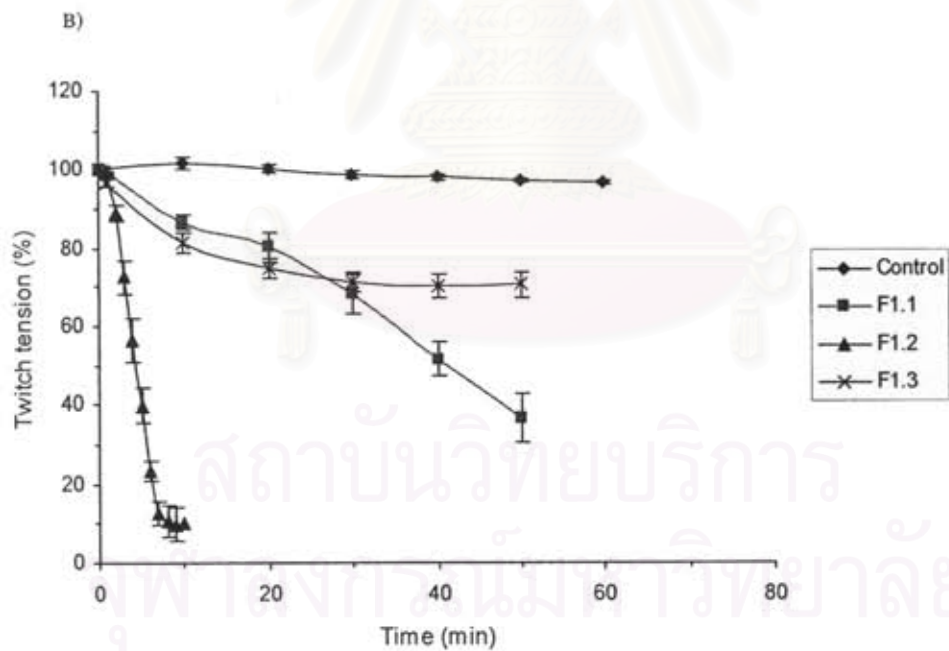
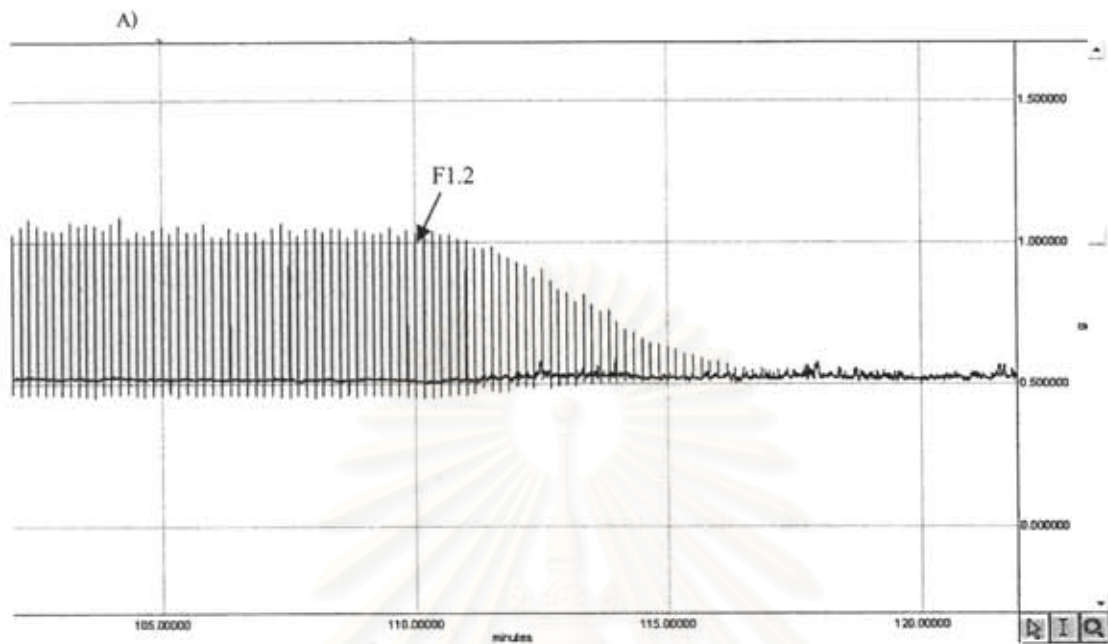


ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 50% inhibition กับความเข้มข้นของพิษงู แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

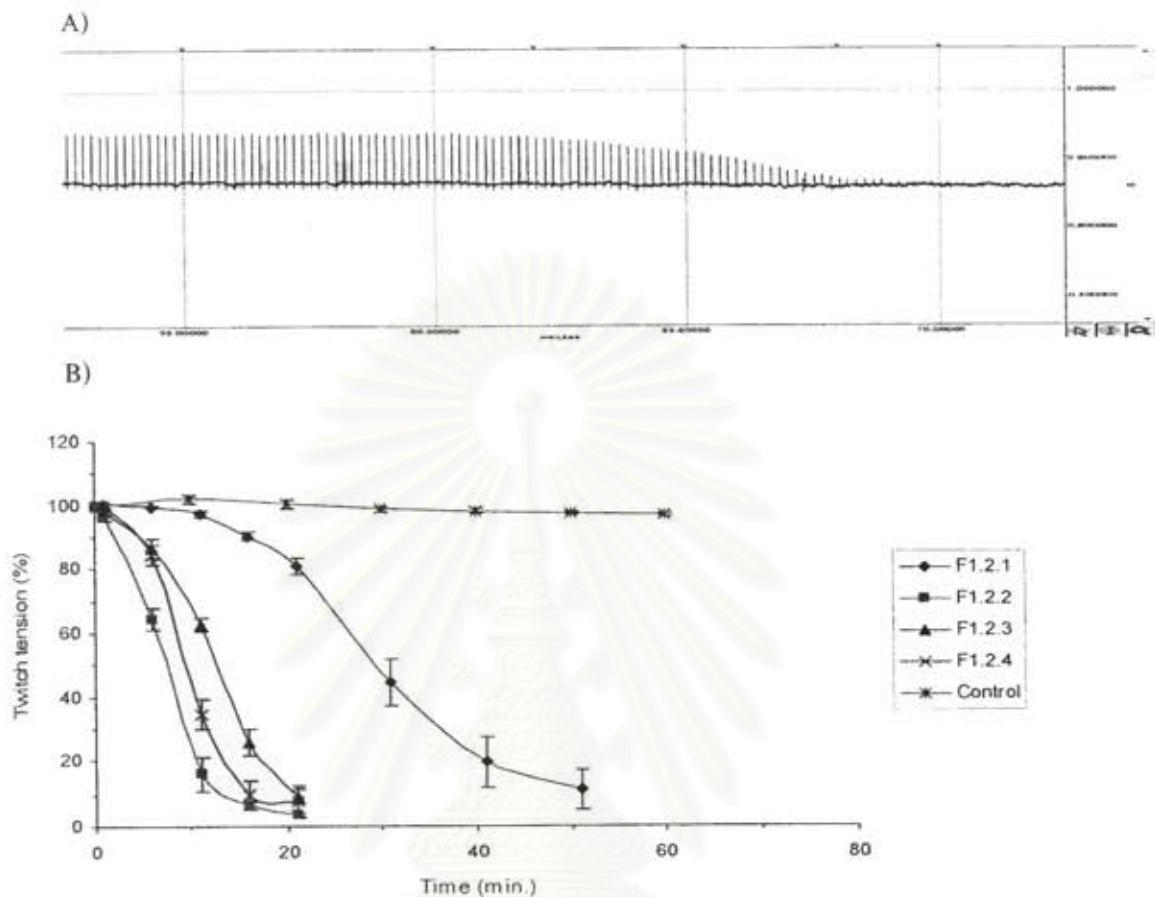
\* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 160  $\mu\text{g/ml}$  (ANOVA, Tukey,  $p < 0.05$ )



ภาพที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ F1 - F7, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ F1, B) กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ control และ F1 - F7 แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)



ภาพที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1.1 – F1.3, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1.2, B) กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ control และ F1.1 – F1.3 แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)



ภาพที่ 9 อฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ F1.2.1 – F1.2.4, A) ตัวอย่าง Tracing แสดง อฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ F1.2.2, B) กราฟแสดงอฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาท ของ control และ F1.2.1 – F1.2.4 แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

## 2) การทดสอบตำแหน่งการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิที่บริเวณ pre- หรือ postsynaptic

### 2.1) การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ก่อนและหลังการ กระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า (control, n = 5)

การกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  และ  $10^3$  M แบบสะสมที่ละความเข้มข้น ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ ทั้งก่อนและหลังการ กระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (ภาพที่ 15) จากการเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้น ด้วย acetylcholine ทั้ง 4 ความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ในกลุ่ม control พบว่า acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^6$ ,  $10^5$  และ  $10^3$  M ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น nerve ด้วยไฟฟ้า ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้น  $10^4$  M ทำให้



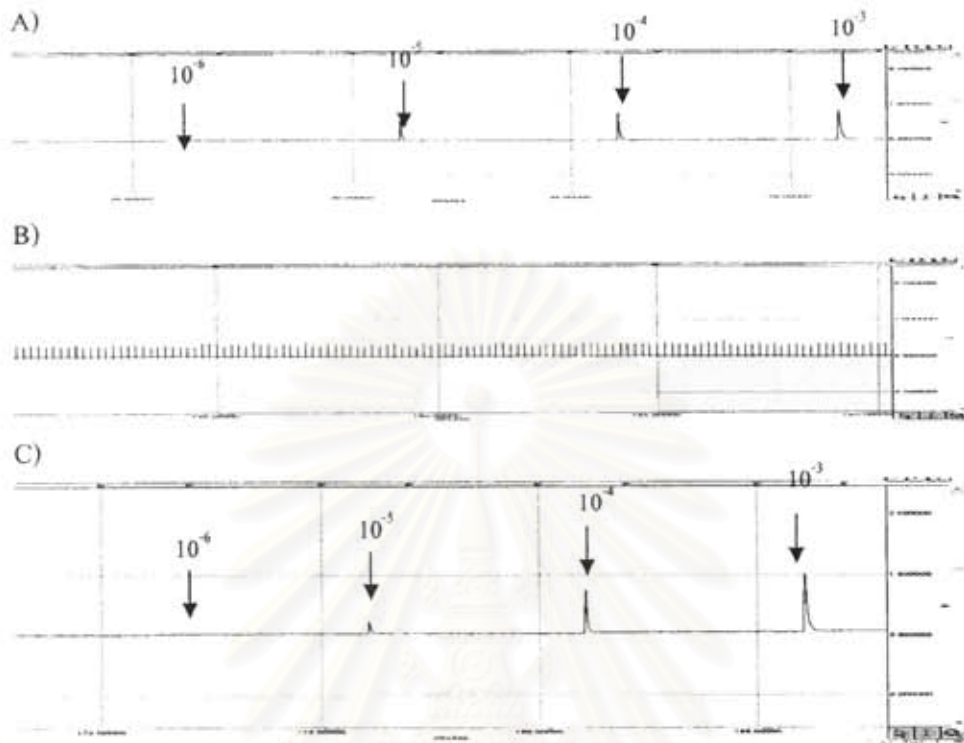
เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น nerve ด้วยไฟฟ้า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 16) ซึ่งอาจเนื่องมาจากความผันแปรของแต่ละชิ้นเนื้อที่นำมาทำการทดสอบ

2.2) การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก semi-purified fractions (n = 5)

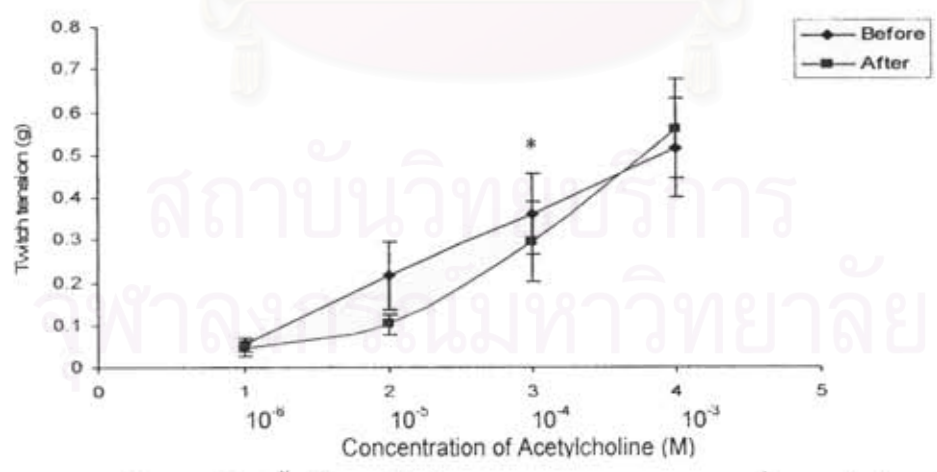
การกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  และ  $10^3$  M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าทำให้เกิดการ contraction ของกล้ามเนื้อ แต่การกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วย exogenous acetylcholine หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ทำให้เกิดหดตัวของกล้ามเนื้อเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังภาพที่ 17, 18 และ 19 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ทั้ง 4 ความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ให้ผลดังภาพที่ 20, 21 และ 22 ตามลำดับ เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่า การกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^6$  และ  $10^5$  M ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากการหดตัวของกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นไม่สูงจาก baseline มากนัก ดังนั้นจึงพิจารณาที่การกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^4$  และ  $10^3$  M ซึ่งจะเห็นได้ว่า semi-purified fraction ทั้ง 3 fractions ออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

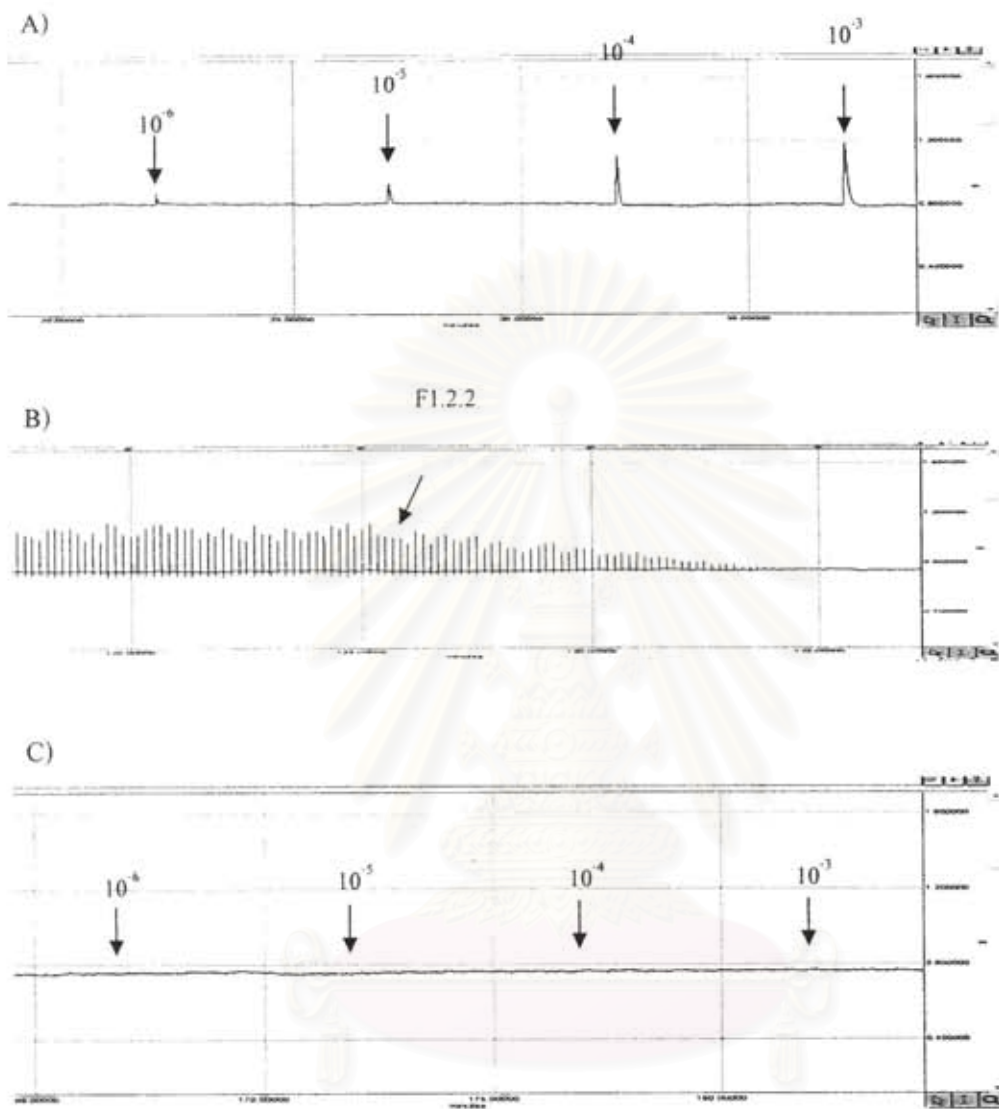


ภาพที่ 10 การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  M แบบสะสมที่ละความเข้มข้น (control) A) ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve B) การกระตุ้น phrenic nerve และ C) หลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า

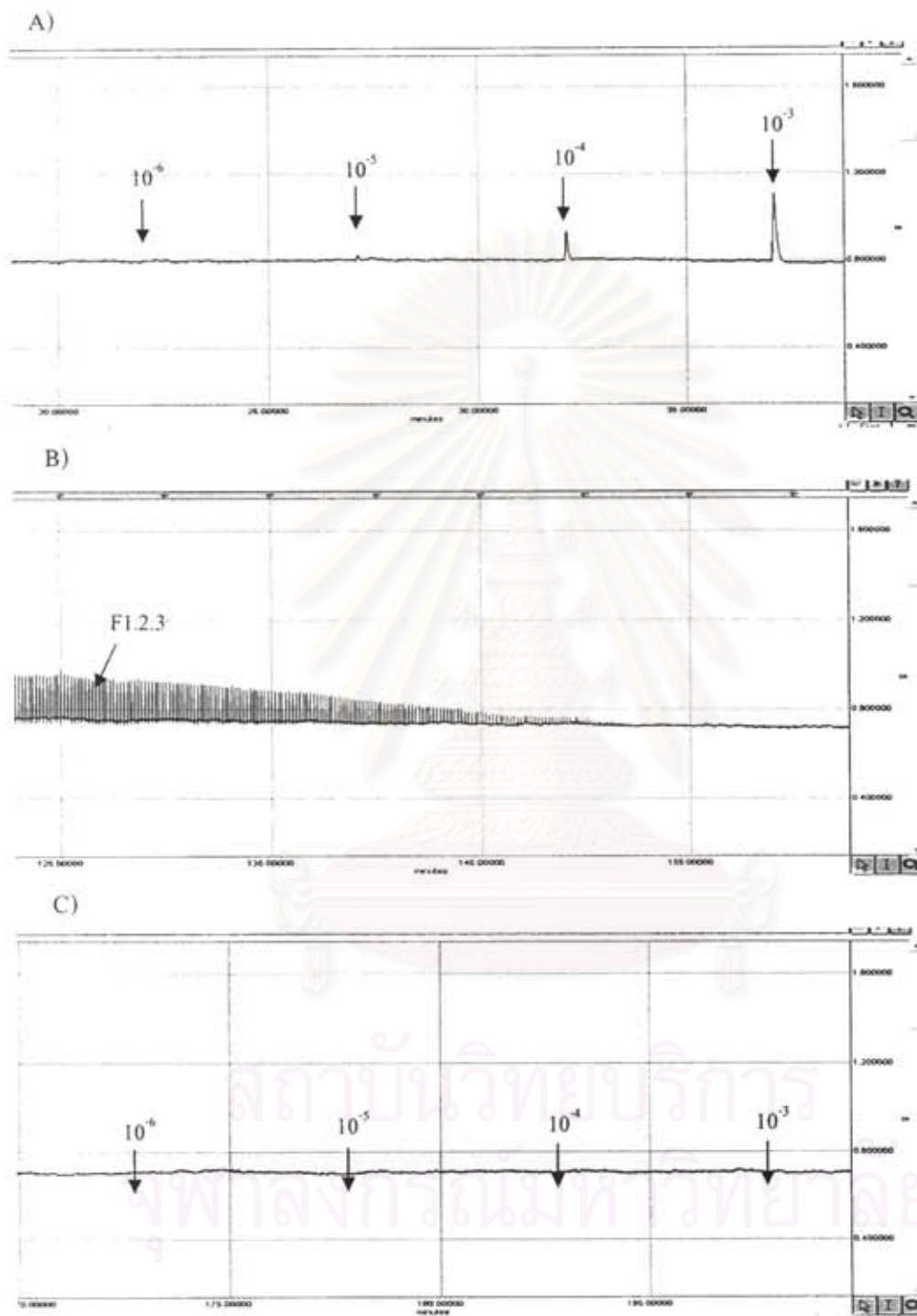


ภาพที่ 11 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  M แบบสะสมที่ละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (control) แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

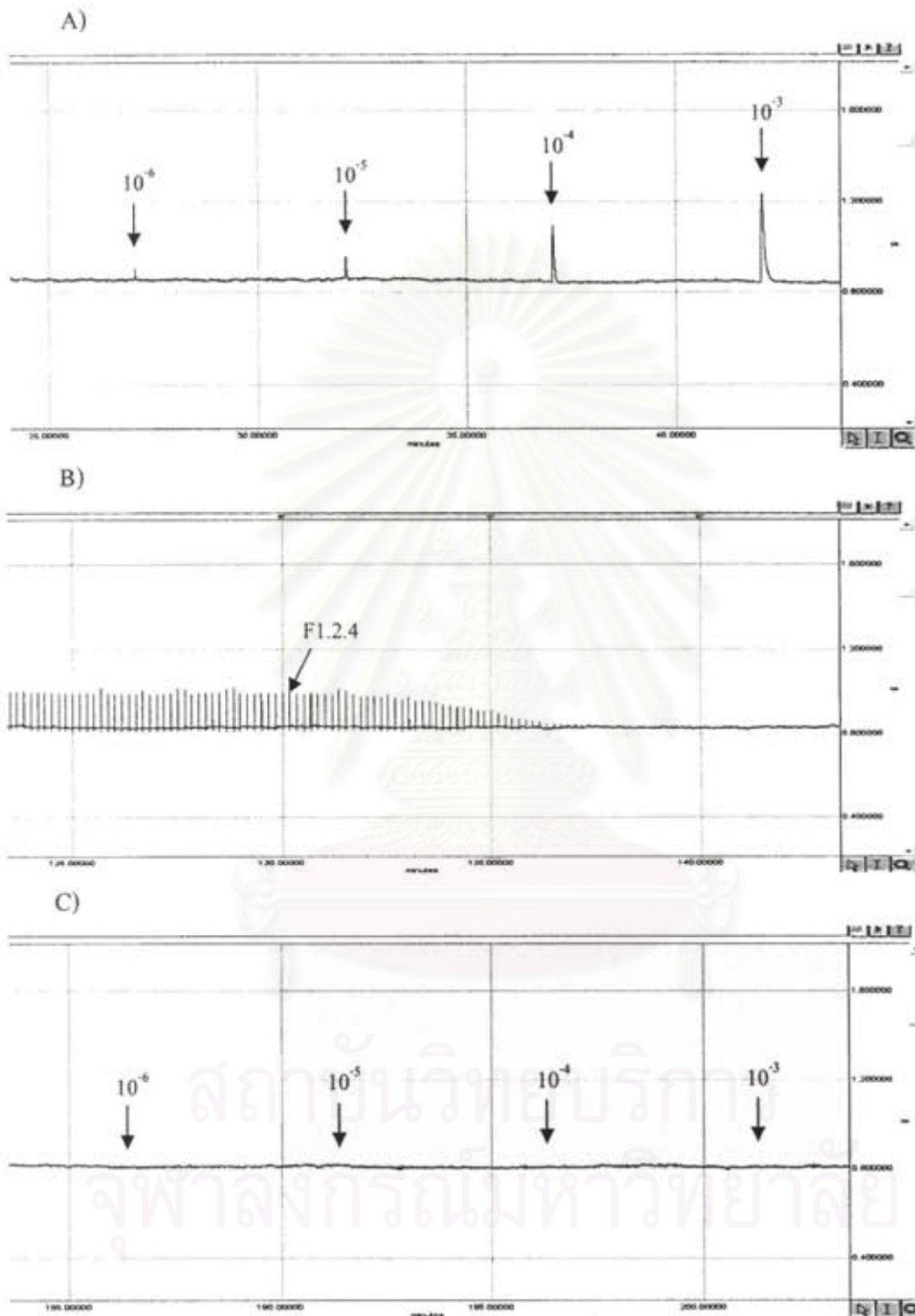
\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Before ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test,  $p < 0.05$ )



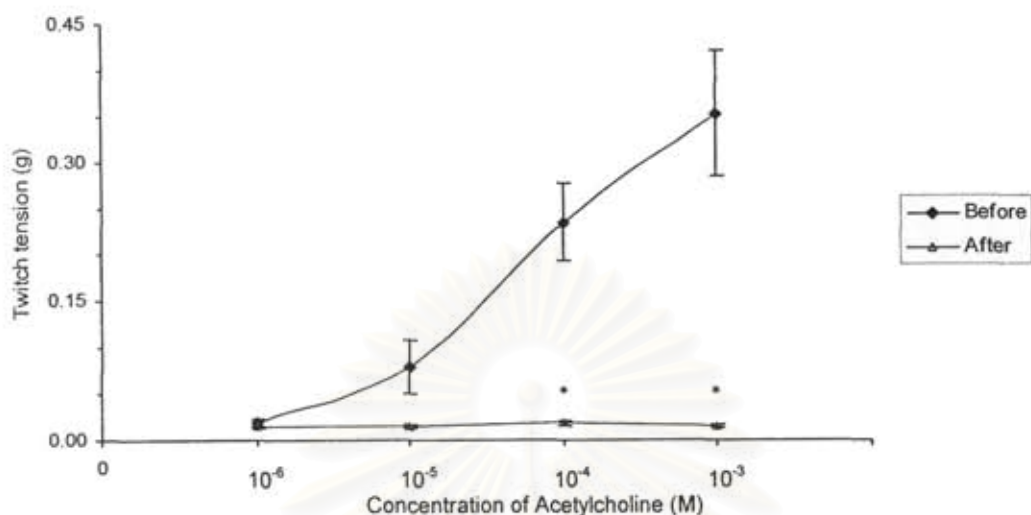
ภาพที่ 12 การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2 A) ก่อนการเกิด neuromuscular blockade B) neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2 C) หลังการเกิด neuromuscular blockade



ภาพที่ 13 การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  M แบบสะสมที่ละความเข้มข้นหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3, A) ก่อนการเกิด neuromuscular blockade, B) neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3, C) หลังการเกิด neuromuscular blockade

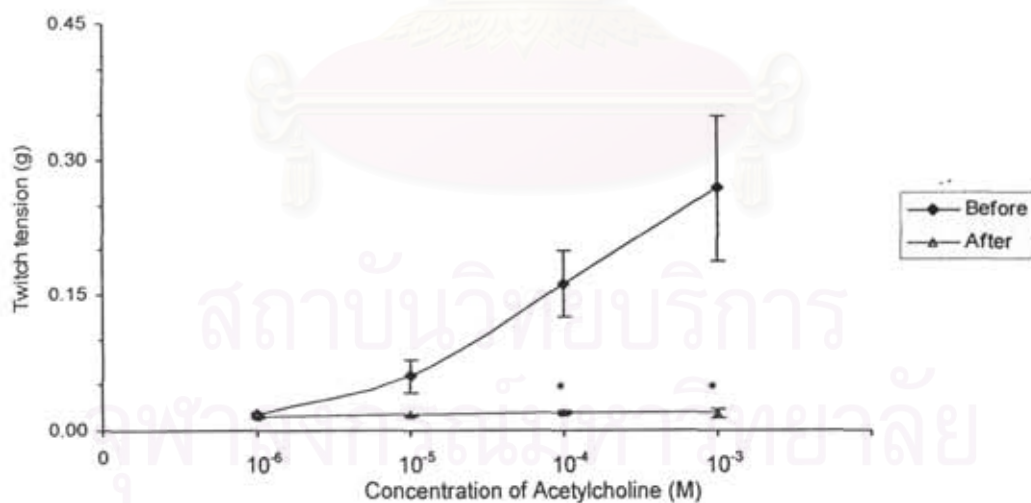


ภาพที่ 14 การหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  M แบบสะสมทีละความเข้มข้นหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4, A) ก่อนการเกิด neuromuscular blockade, B) neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4, C) หลังการเกิด neuromuscular blockade



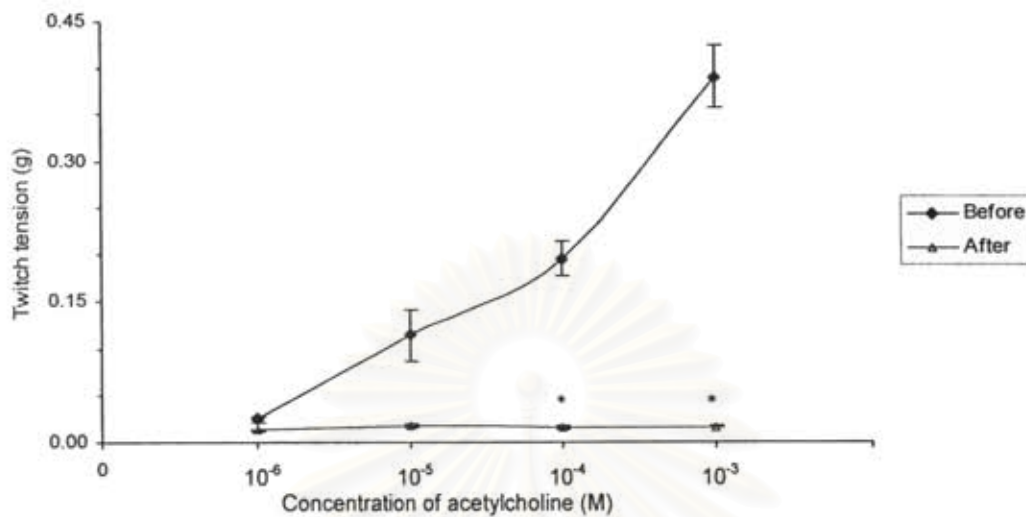
ภาพที่ 15 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2 แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Before ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test,  $p < 0.05$ )



ภาพที่ 16 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3 แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Before ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test,  $p < 0.05$ )



ภาพที่ 17 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4 แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Before ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test,  $p < 0.05$ )

### 3) การทดสอบการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลมเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

#### 3.1) ความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride (n=3)

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 20  $\mu\text{M}$  พบว่าเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิด 95% inhibition ได้แก่  $5.7 \pm 0.6$ ,  $3.4 \pm 0.3$ ,  $2.7 \pm 0.2$  และ  $2.5 \pm 0.2$  นาที ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทมากที่สุด (ภาพที่ 23) แต่เพื่อให้เกิดการปิดกั้น neuromuscular transmission อย่างแน่นอนจึงเลือกใช้ Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ในการทดลองกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า เมื่อทดลองปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  และทดลองกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าต่อไปอีกจนครบ 2 ชั่วโมง ให้ผลดังภาพที่ 24 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Tubocurarine chloride 20  $\mu\text{M}$  สามารถปิดกั้น neuromuscular transmission ได้ตลอดจนครบระยะเวลาที่ทำการทดลอง

3.2) การหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ unipolar electrode ( $n = 5$ )

การทดสอบการหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 2 msec) โดยใช้ unipolar electrode ทั้งนี้ไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage จะอยู่ในช่วง 16 - 40 โวลต์ ผลการหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ภายใน 1.5 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 25

3.3) การหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ unipolar electrode หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission (control,  $n = 5$ )

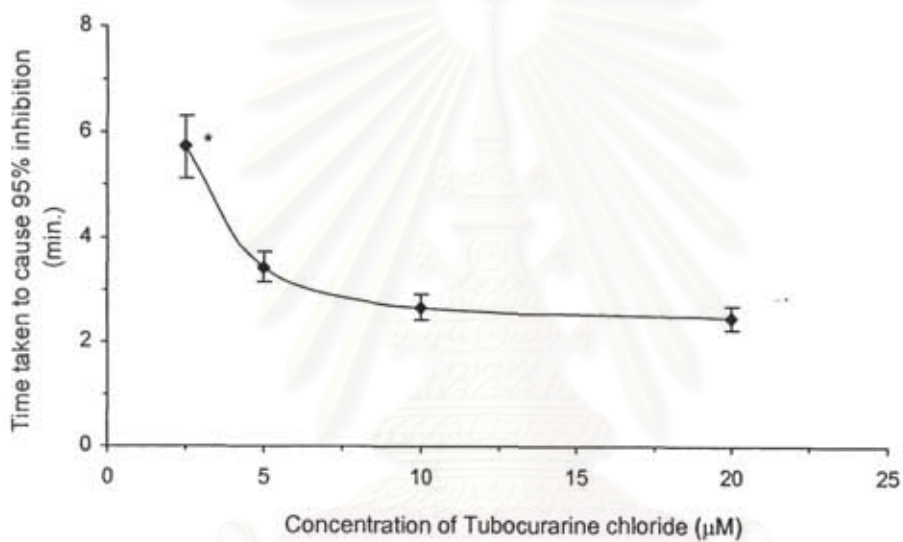
หลังจากทำการปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  จึงทดสอบการหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 2 msec) โดยใช้ unipolar electrode ผลการหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ภายใน 1.5 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 26 เมื่อทำการเปรียบเทียบการหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ปิดกั้นและปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride (20  $\mu\text{M}$ ) ให้ผลดังภาพที่ 27 ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่เวลา 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที การหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยไฟฟ้า หลังการใช้ Tubocurarine chloride ปิดกั้น neuromuscular transmission ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับที่ไม่มี Tubocurarine chloride ซึ่งการหัดตัวของกล้ามเนื้อที่ลดลงนี้อาจเป็นผลของ Tubocurarine chloride ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหัดตัวของกล้ามเนื้อของ semi-purified fraction เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า จึงจะพิจารณาการเปลี่ยนแปลงการหัดตัวของกล้ามเนื้อภายใน 30 นาที

3.4) ฤทธิ์ยับยั้งการหัดตัวของกล้ามเนื้อของ semi-purified fractions เมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ( $n = 5$ )

หลังจากปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  จึงทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ต่อการหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า พบว่าเมื่อให้การหัดตัวของกล้ามเนื้อที่ 1 นาที ก่อนใส่ fraction (เท่ากับนาทีที่ 4 หลังการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งในกลุ่ม control และกลุ่มทดลอง) เป็นการหัดตัวของกล้ามเนื้อ 100% จากนั้นจึงใส่ F1.2.2, F1.2.3 หรือ F1.2.4 ลงไปใน organ bath ณ นาทีที่ 5 หลังการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงการหัดตัวของกล้ามเนื้อหลังใส่



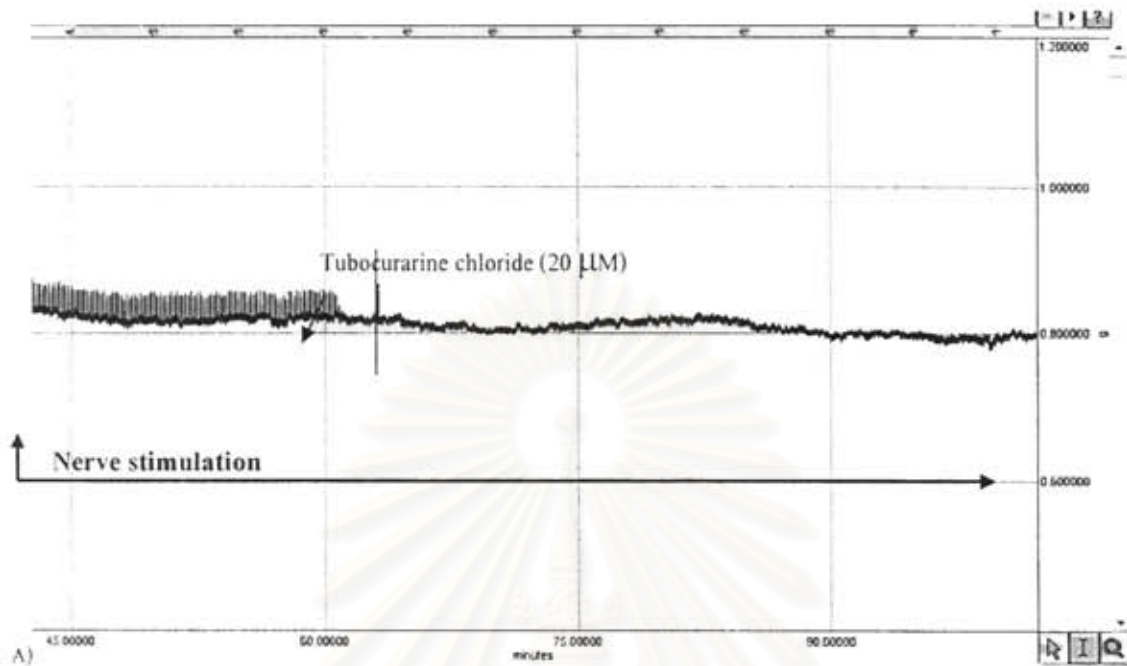
semi-purified fractions ทั้ง 3 fractions และทดสอบทางสถิติ (ANOVA, Tukey,  $p < 0.05$ ) พบว่าให้ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อไม่ต่างจากกลุ่ม control (ภาพที่ 28) แสดงว่า F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า



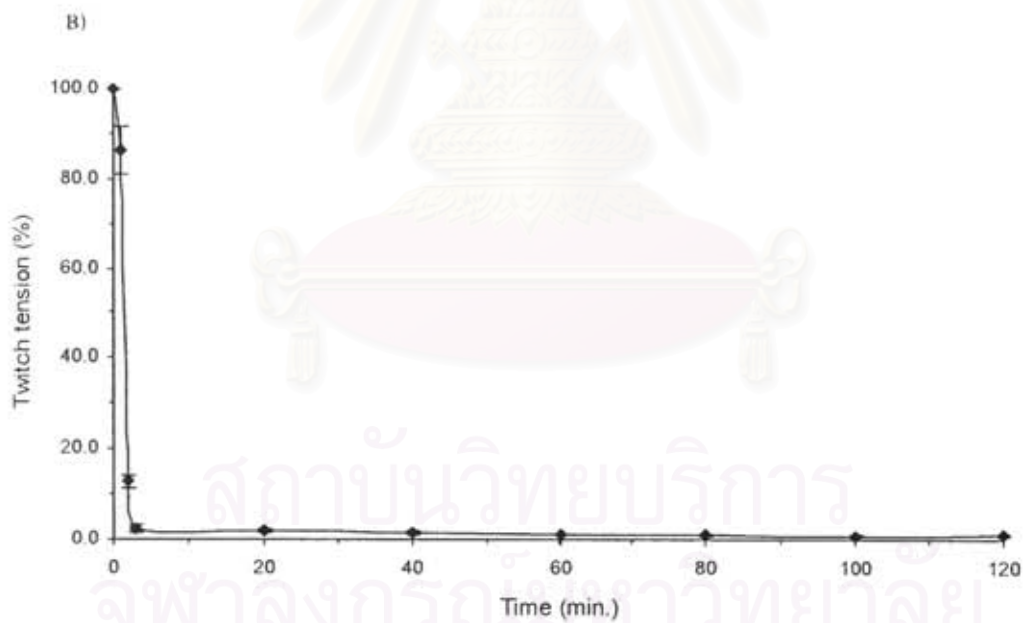
ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 95% inhibition กับความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

\* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  (ANOVA, Tukey,  $p < 0.05$ )

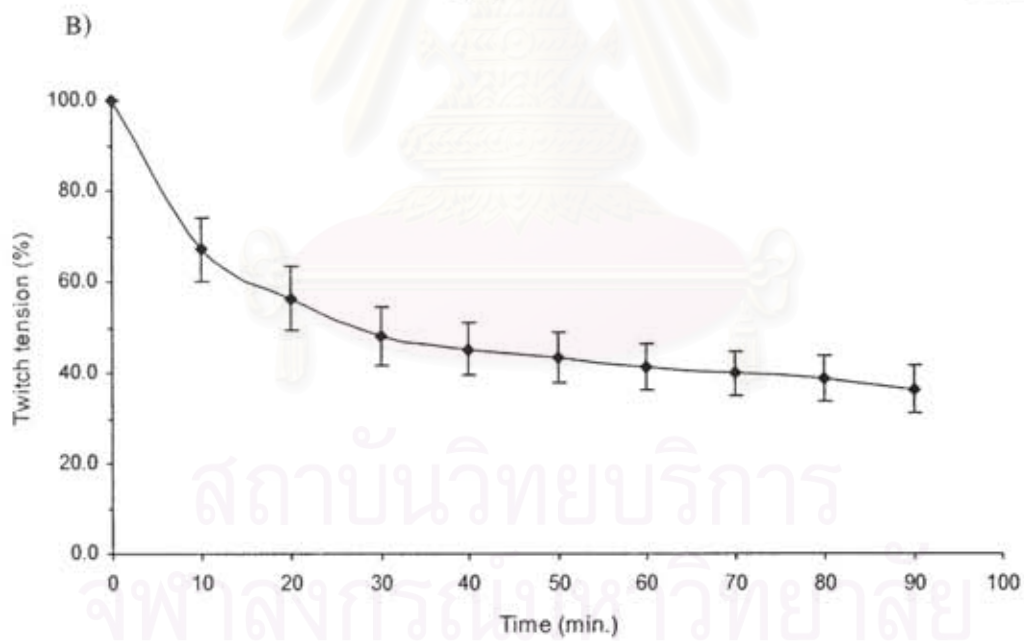
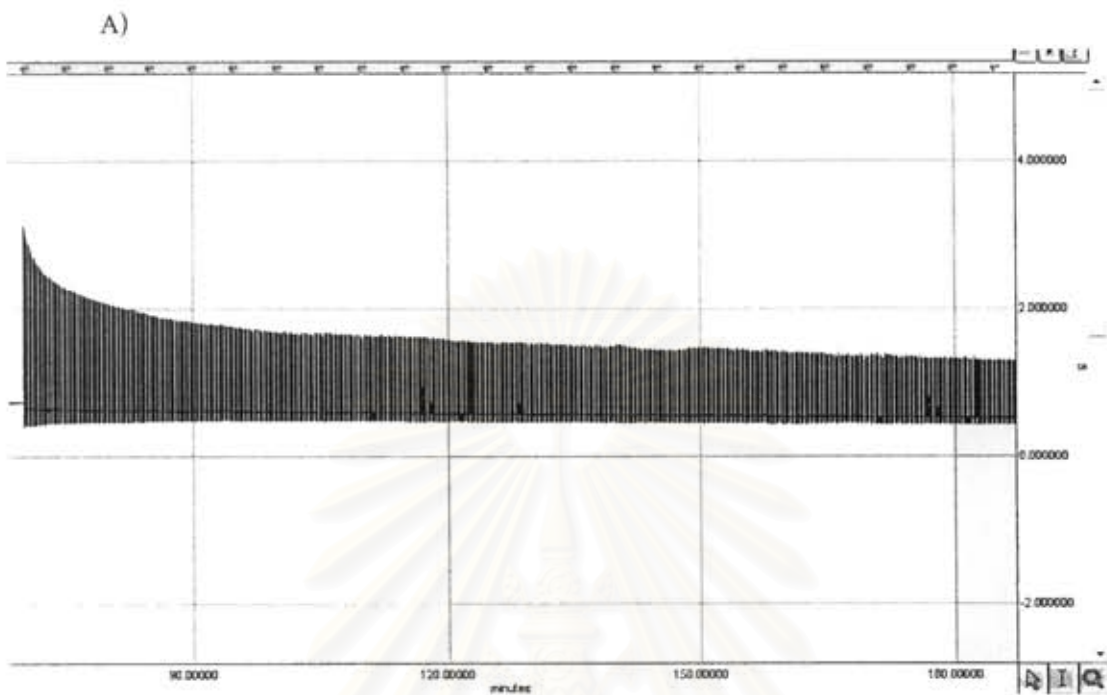
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



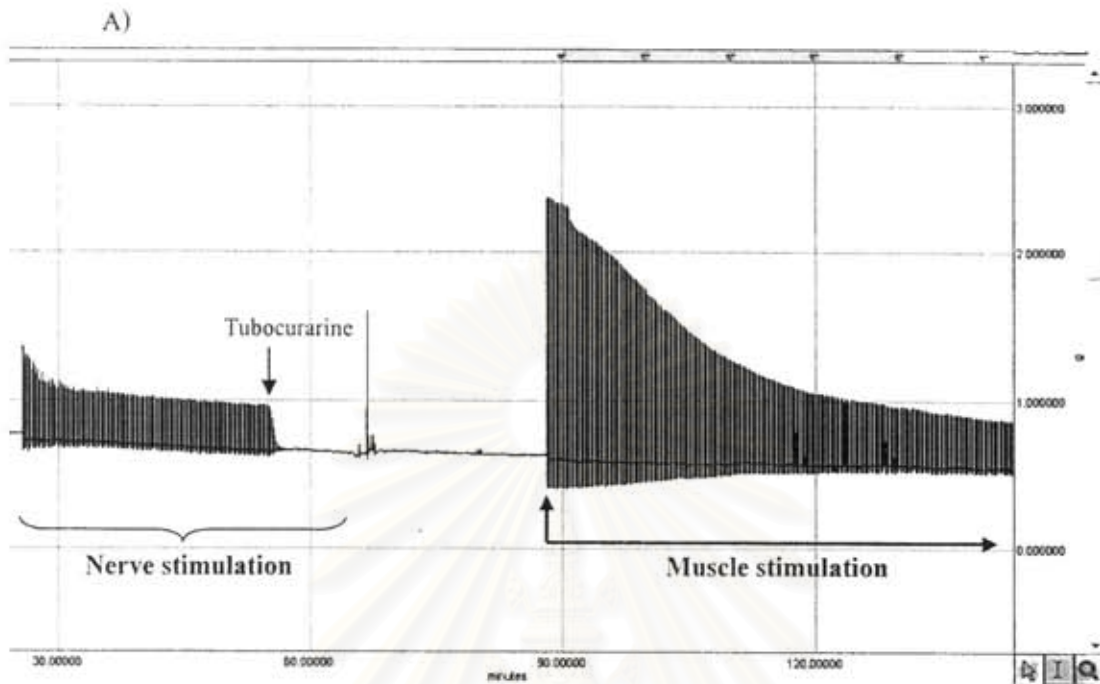
A) 45.00000 60.00000 75.00000 90.00000 minutes



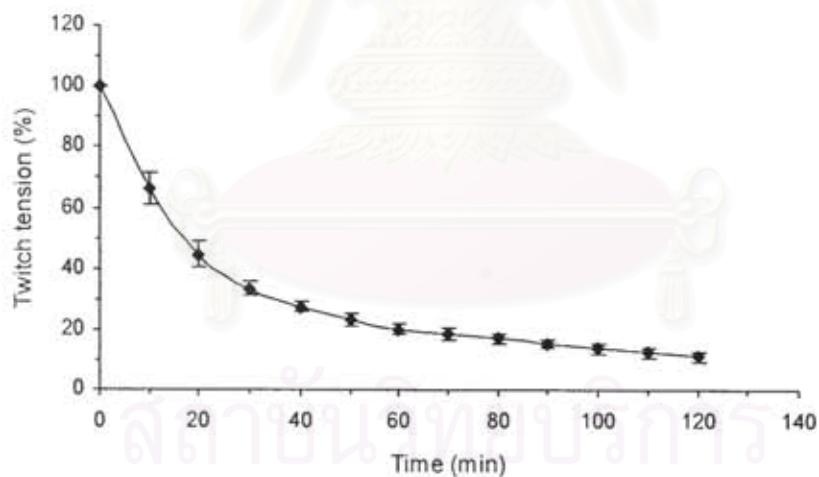
ภาพที่ 19ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ Tubocurarine chloride, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ Tubocurarine chloride (20 μM), B) กราฟแสดงการปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride (20 μM) โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือการหดตัวของกล้ามเนื้อก่อนใส่ Tubocurarine chloride จากนั้นคือการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังใส่ Tubocurarine chloride ที่เวลาต่าง ๆ แสดงค่าเป็น Mean ± S.E.M (n = 5)



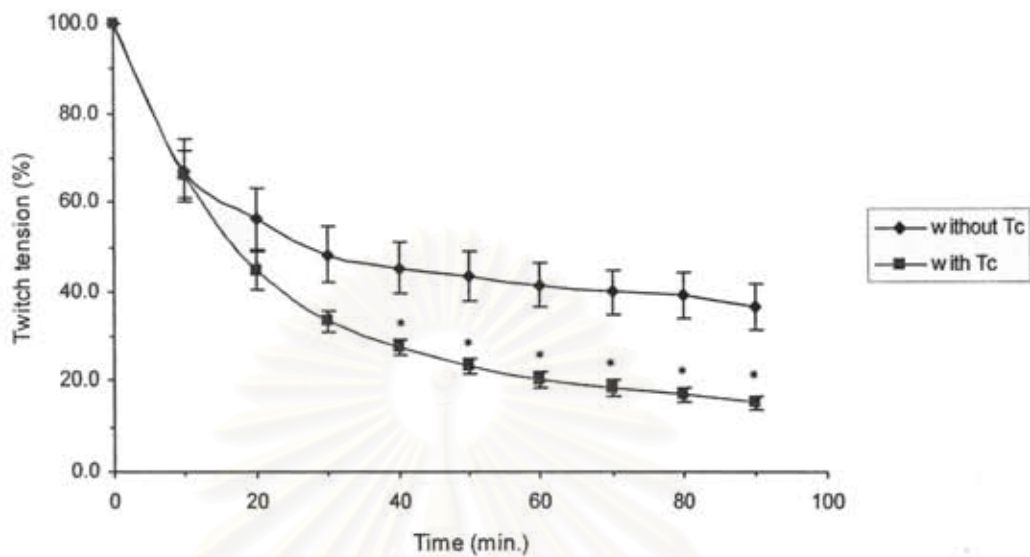
ภาพที่ 20 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, B) กราฟแสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)



B)



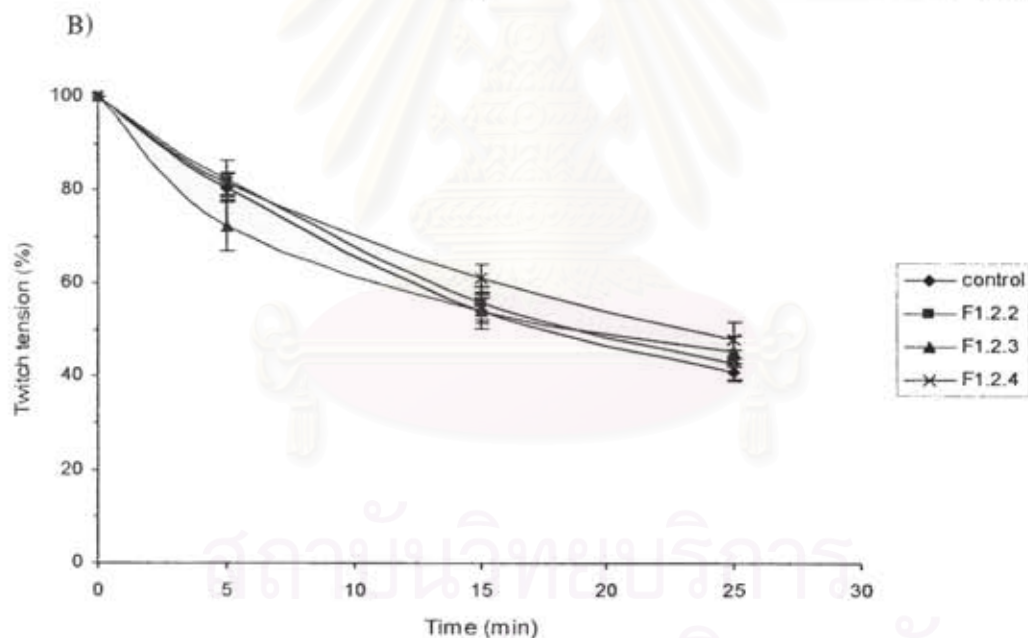
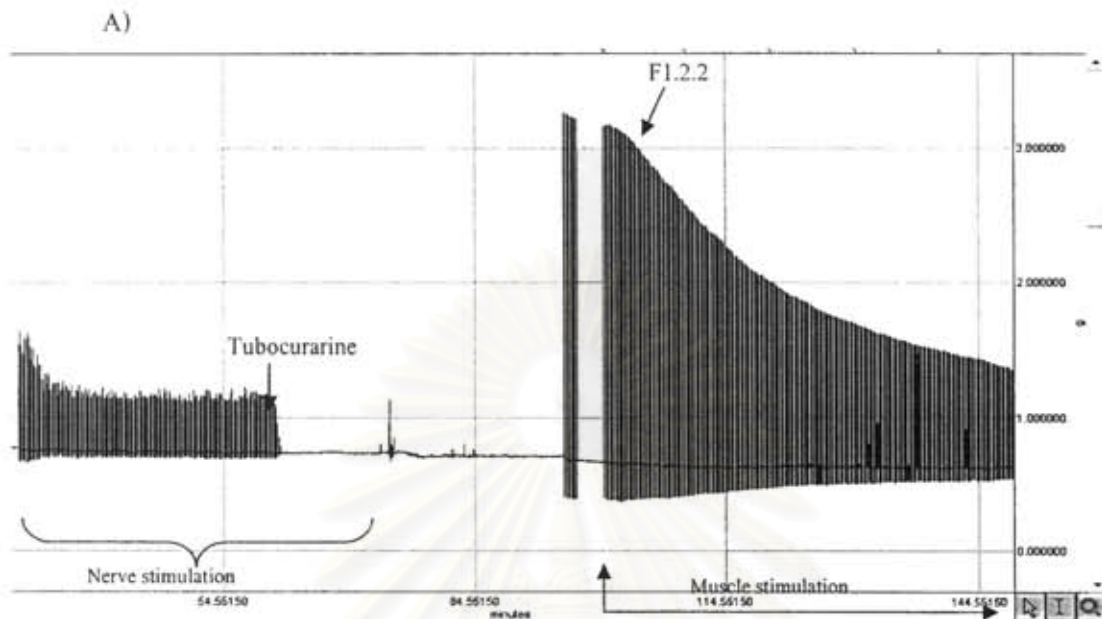
ภาพที่ 21 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าหลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, B) กราฟแสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าที่เวลาต่าง ๆ หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือการหดตัวของกล้ามเนื้อก่อนใส่ Tubocurarine chloride แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)



ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อ โดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ใช้ Tubocurarine chloride (without Tc) และใช้ Tubocurarine chloride เพื่อปิดกั้น neuromuscular transmission (with Tc) แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

\* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อ โดยตรงด้วยไฟฟ้า without Tc ที่เวลาเดียวกัน (ANOVA,  $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 23 ผลของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงผลของ F1.2.2 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, B) กราฟแสดงผลของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission และกลุ่ม control โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือการหดตัวของกล้ามเนื้อในนาทีที่ 4 หลังกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า (ก่อนใส่ fraction ในกลุ่มทดลอง) แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

## 2. สรุปผลการดำเนินงาน

การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า พิษงูจงอางมีส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท เมื่อแยกส่วนพิษงูได้ส่วนกิ่งบริสุทธิ์คือ F1.2.1 – F1.2.4 ส่วนที่มีฤทธิ์แรงที่สุด คือ F1.2.2 และ F1.2.4 รองลงมาคือ F1.2.3 และ F1.2.1 ตามลำดับ โดยกลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 คือออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic และไม่มีฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง ดังนั้นจึงน่าที่จะออกฤทธิ์โดยจับกับ acetylcholine receptor บนกล้ามเนื้อ ยับยั้งไม่ให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวได้

ในการศึกษาต่อไปจึงน่าที่จะทำการศึกษาพิษงูในความบริสุทธิ์ ศึกษาถึงโครงสร้าง และหาลำดับกรดอะมิโนของ semi-purified fractions ที่แยกได้ เพื่อนำไปเทียบชนิดกับ neurotoxin ที่แยกได้ และมีการรายงานในการศึกษาวิจัยอื่นๆ ก่อนหน้านี้ และเพื่อการ clone ส่วนที่บริสุทธิ์ที่น่าสนใจ นำไปพัฒนาเป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์หรืองานวิจัยต่อไป และอาจทำการศึกษายีนยีนการออกฤทธิ์ที่บริเวณ nicotinic acetylcholine receptor และยีนยีนตำแหน่งในการจับว่าอยู่ที่ subunits ใด และยังสามารถศึกษาถึงฤทธิ์อื่นๆ ของ semi-purified fractions ที่แยกได้ เช่น analgesic activity ซึ่งมีผู้รายงานไว้ว่าพบฤทธิ์นี้ใน neurotoxin ที่แยกได้จากพิษงูจงอาง ตลอดจนศึกษาถึง enzyme activity เช่น phospholipase A<sub>2</sub> ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่พบในพิษงู เนื่องจากพบการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ใน neurotoxin ที่แยกจากพิษงูเห่าไทยซึ่งเป็นพิษงูที่มีความคล้ายคลึงกับพิษงูจงอางมาก นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาถึงความเข้มข้นของ tubocurarine chloride ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ ปิดกั้น neuromuscular transmission เพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อการทำงานของกล้ามเนื้อในการทดลองต่อไป

## 3. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

โครงการวิจัยเสร็จสมบูรณ์

## 4. อุปสรรคในการดำเนินงานและแนวทางแก้ไข

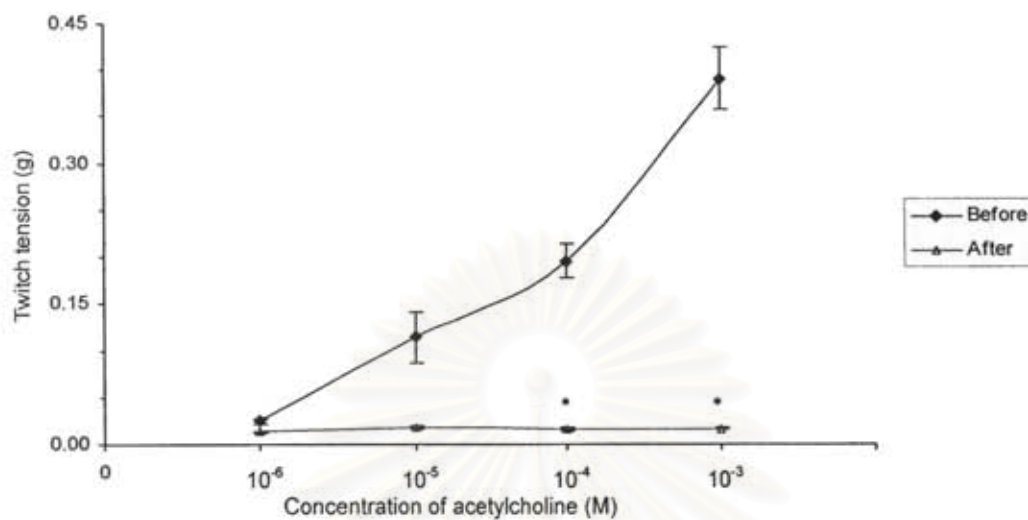
ไม่มี



(รองศาสตราจารย์โสภิต ชรรมาณี)

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 2

วันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2550



ภาพที่ 17 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-3}$  M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4 แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)  
 \* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Before ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test, p < 0.05)

### 3) การทดสอบการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลมเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

#### 3.1) ความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride (n=3)

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 20  $\mu$ M พบว่าเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิด 95% inhibition ได้แก่  $5.7 \pm 0.6$ ,  $3.4 \pm 0.3$ ,  $2.7 \pm 0.2$  และ  $2.5 \pm 0.2$  นาที ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้น 10  $\mu$ M เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทมากที่สุด (ภาพที่ 23) แต่เพื่อให้เกิดการปิดกั้น neuromuscular transmission อย่างแน่นอนจึงเลือกใช้ Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20  $\mu$ M ในการทดลองกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า เมื่อทดลองปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20  $\mu$ M และทดลองกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าต่อไปอีกจนครบ 2 ชั่วโมง ให้ผลดังภาพที่ 24 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Tubocurarine chloride 20  $\mu$ M สามารถปิดกั้น neuromuscular transmission ได้ตลอดจนครบระยะเวลาที่ทำการทดลอง



3.2) การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ unipolar electrode (n = 5)

การทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 2 msec) โดยใช้ unipolar electrode ทั้งนี้ไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage จะอยู่ในช่วง 16 - 40 โวลต์ ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ภายใน 1.5 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 25

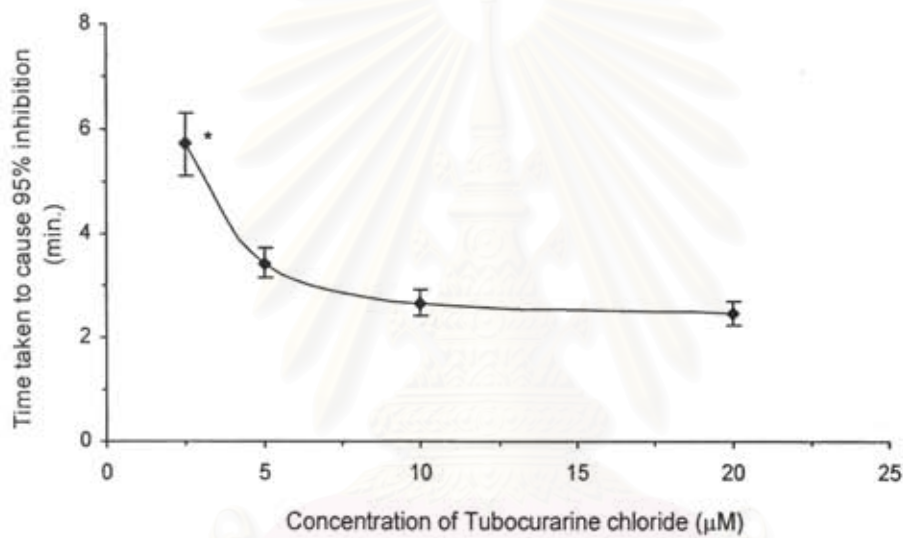
3.3) การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ unipolar electrode หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission (control, n = 5)

หลังจากทำการปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  จึงทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 2 msec) โดยใช้ unipolar electrode ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ภายใน 1.5 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 26 เมื่อทำการเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ปิดกั้นและปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride (20  $\mu\text{M}$ ) ให้ผลดังภาพที่ 27 ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่เวลา 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยไฟฟ้า หลังการใช้ Tubocurarine chloride ปิดกั้น neuromuscular transmission ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับที่ไม่มี Tubocurarine chloride ซึ่งการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ลดลงนี้อาจเป็นผลของ Tubocurarine chloride ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อของ semi-purified fraction เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า จึงจะพิจารณาการเปลี่ยนแปลงการหดตัวของกล้ามเนื้อภายใน 30 นาที

3.4) ฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อของ semi-purified fractions เมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า (n = 5)

หลังจากปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  จึงทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า พบว่าเมื่อให้การหดตัวของกล้ามเนื้อที่ 1 นาที ก่อนใส่ fraction (เท่ากับนาทีที่ 4 หลังการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งในกลุ่ม control และกลุ่มทดลอง) เป็นการหดตัวของกล้ามเนื้อ 100% จากนั้นจึงใส่ F1.2.2, F1.2.3 หรือ F1.2.4 ลงไปใน organ bath ณ นาทีที่ 5 หลังการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังใส่

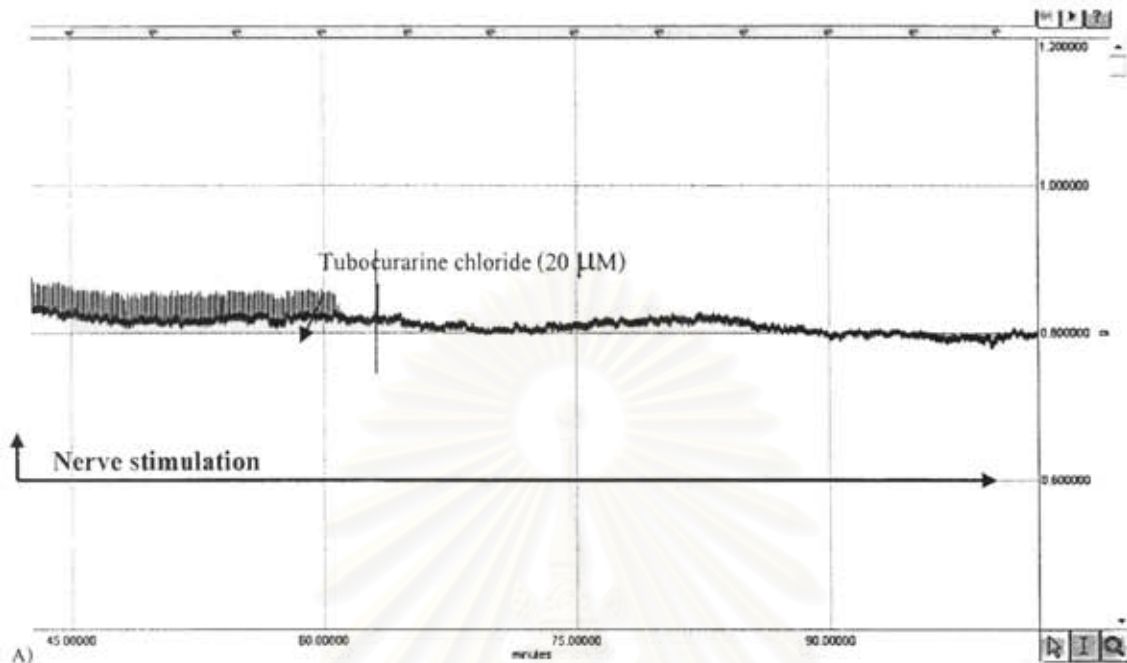
semi-purified fractions ทั้ง 3 fractions และทดสอบทางสถิติ (ANOVA, Tukey,  $p < 0.05$ ) พบว่าให้ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อไม่ต่างจากกลุ่ม control (ภาพที่ 28) แสดงว่า F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า



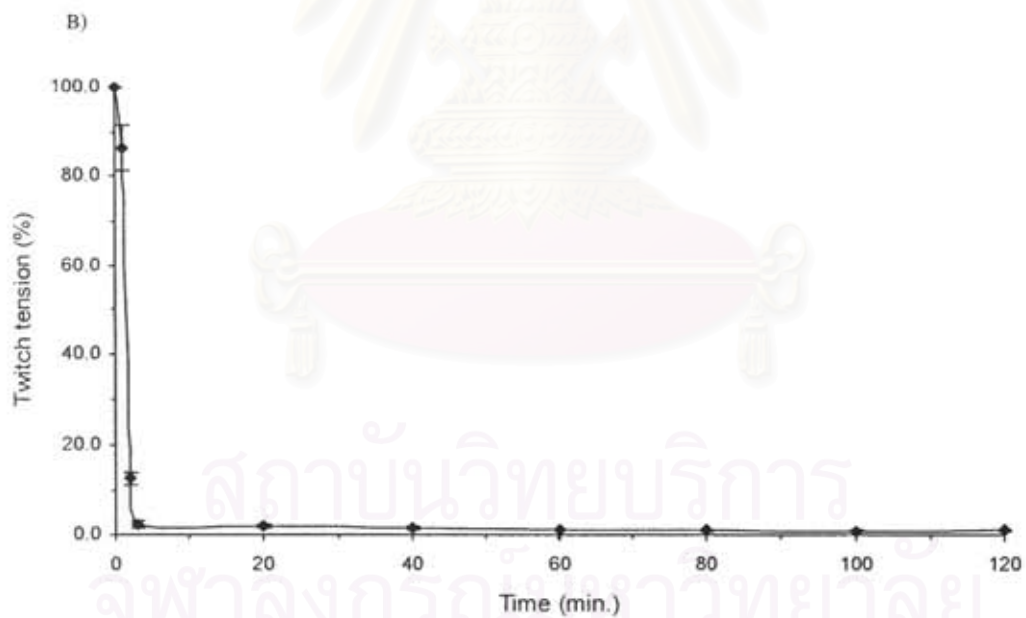
ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 95% inhibition กับความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

\* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 20 µM (ANOVA, Tukey,  $p < 0.05$ )

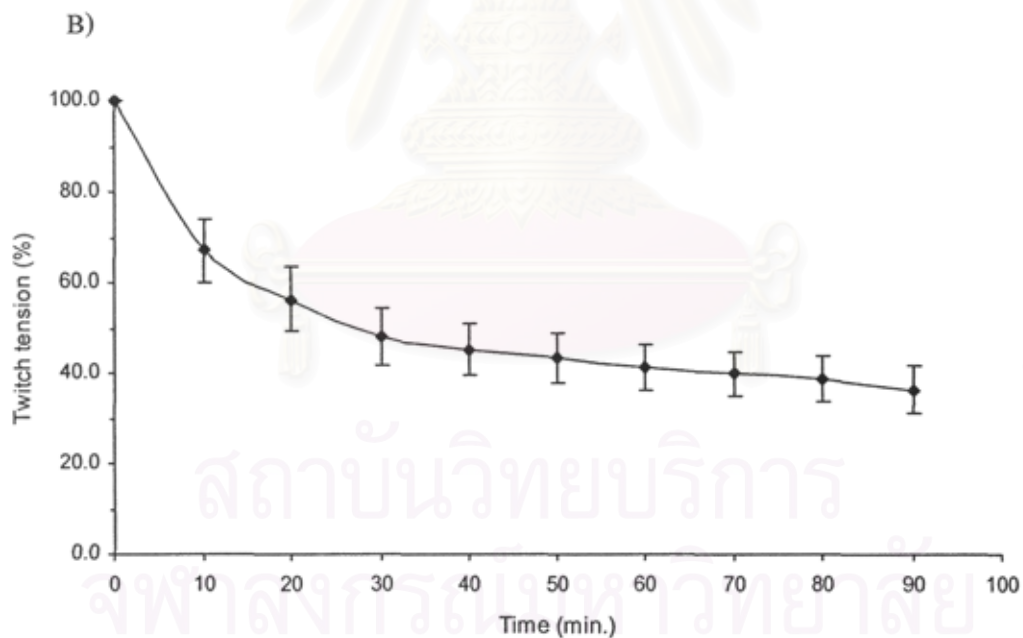
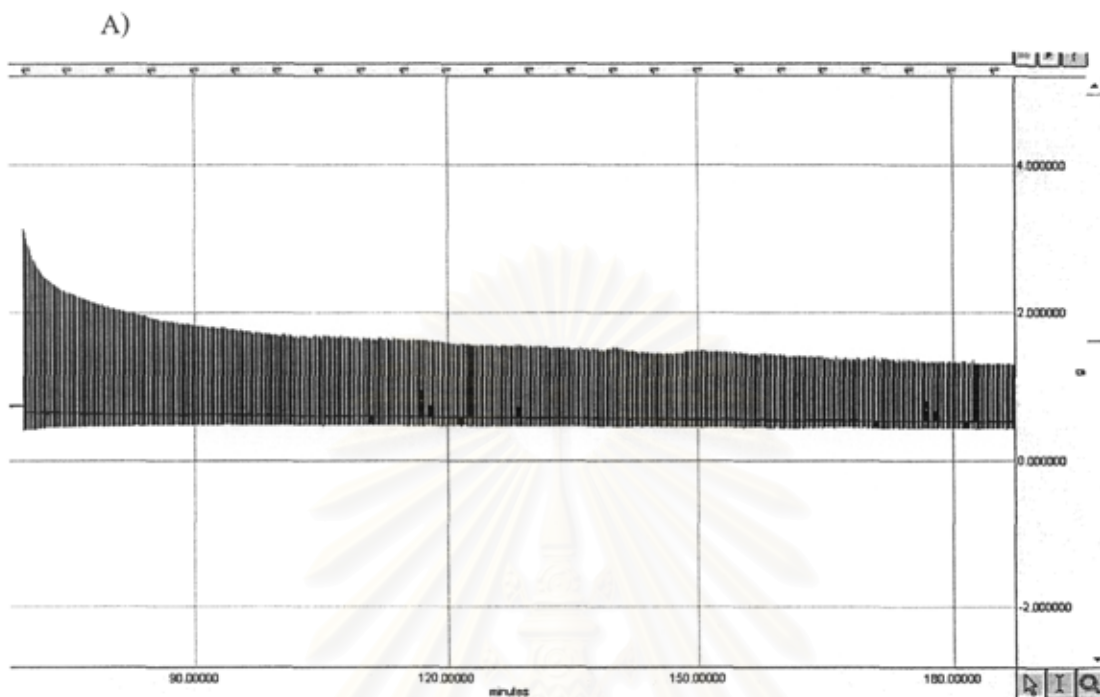
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



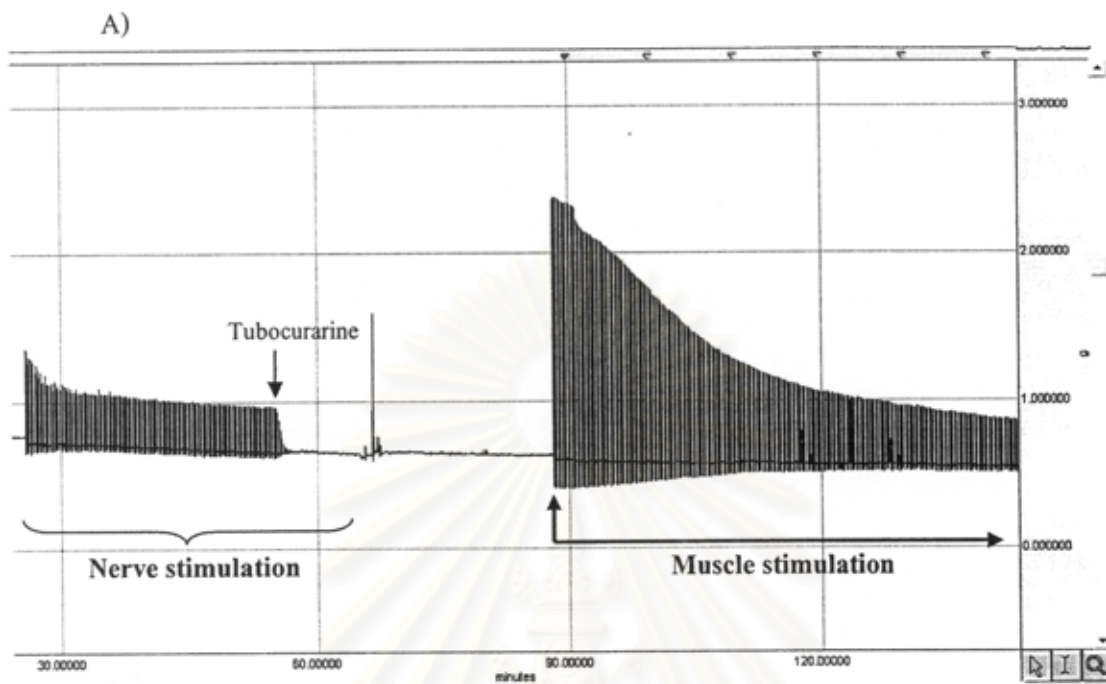
A)



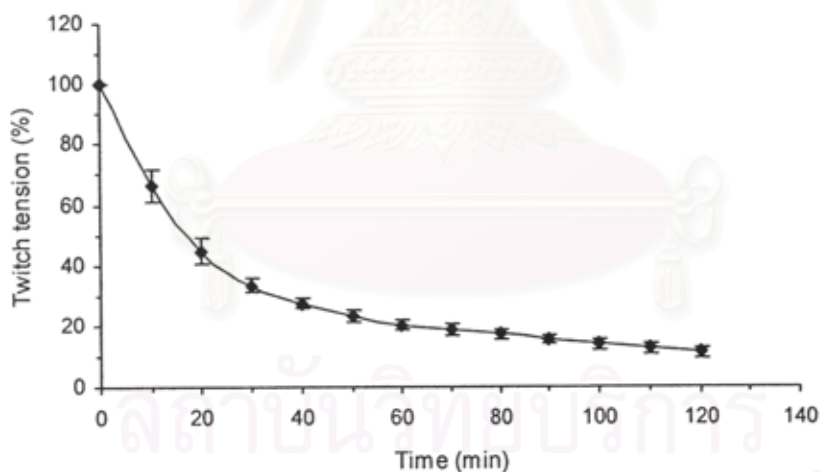
ภาพที่ 19ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ Tubocurarine chloride, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ Tubocurarine chloride (20 μM), B) กราฟแสดงการปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride (20 μM) โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือการหดตัวของกล้ามเนื้อก่อนใส่ Tubocurarine chloride จากนั้นคือการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังใส่ Tubocurarine chloride ที่เวลาต่าง ๆ แสดงค่าเป็น Mean ± S.E.M (n = 5)



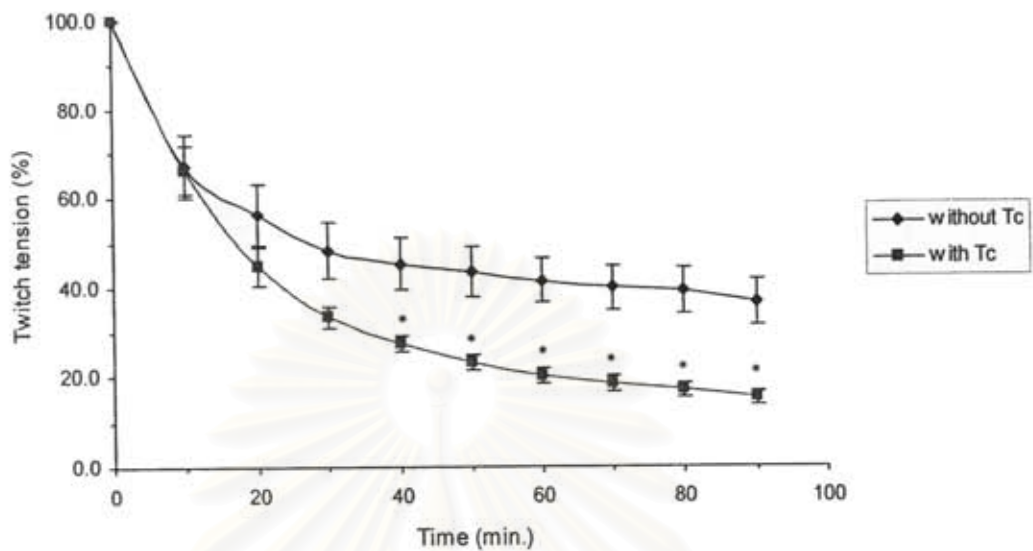
ภาพที่ 20 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, B) กราฟแสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)



B)



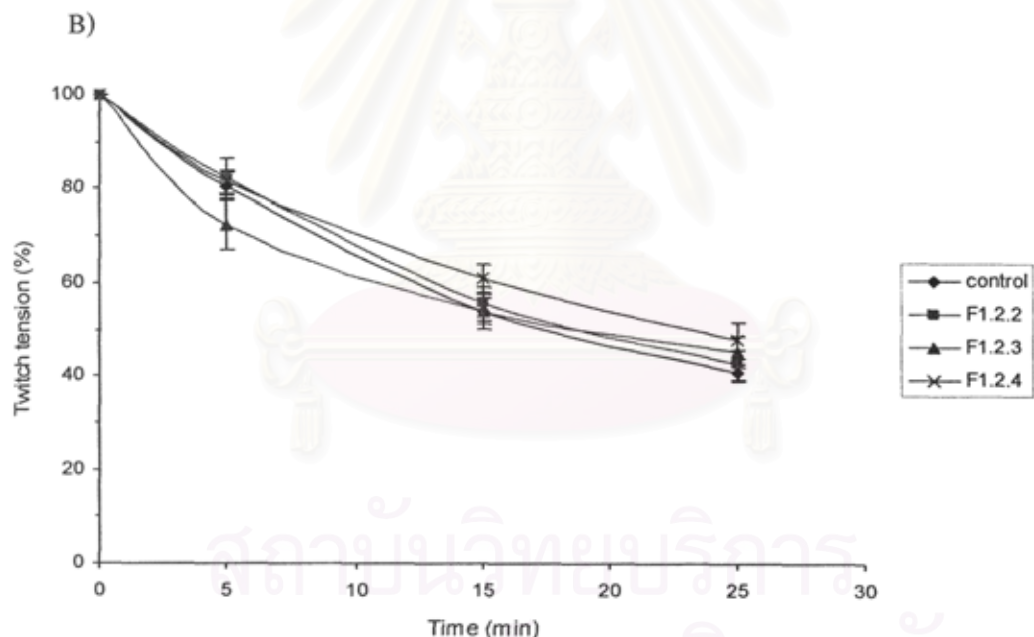
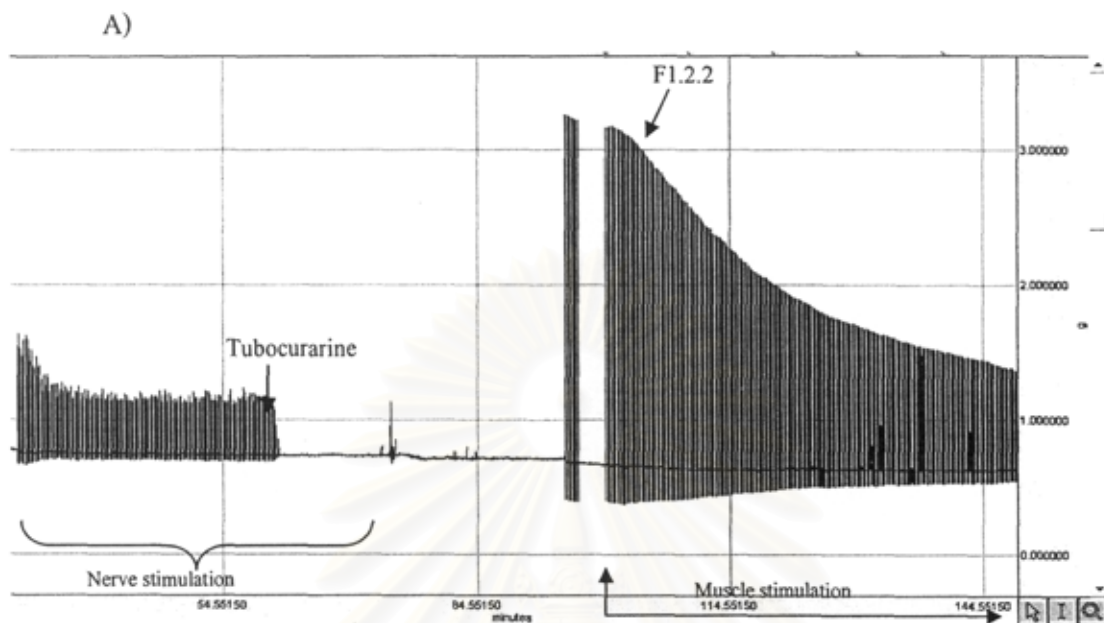
ภาพที่ 21 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าหลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, B) กราฟแสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าที่เวลาต่าง ๆ หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือการหดตัวของกล้ามเนื้อก่อนใส่ Tubocurarine chloride แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)



ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อ โดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ใช้ Tubocurarine chloride (without Tc) และใช้ Tubocurarine chloride เพื่อปิดกั้น neuromuscular transmission (with Tc) แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

\* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อ โดยตรงด้วยไฟฟ้า without Tc ที่เวลาเดียวกัน (ANOVA,  $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 23 ผลของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงผลของ F1.2.2 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, B) กราฟแสดงผลของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission และกลุ่ม control โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือการหดตัวของกล้ามเนื้อในนาทีที่ 4 หลังกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า (ก่อนใส่ fraction ในกลุ่มทดลอง) แสดงค่าเป็น Mean  $\pm$  S.E.M (n = 5)

## 2. สรุปผลการดำเนินงาน

การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า พิษงูจงอางมีส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท เมื่อแยกส่วนพิษงูได้ส่วนกิ่งบริสุทธิ์คือ F1.2.1 – F1.2.4 ส่วนที่มีฤทธิ์แรงที่สุด คือ F1.2.2 และ F1.2.4 รองลงมาคือ F1.2.3 และ F1.2.1 ตามลำดับ โดยกลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 คือออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic และไม่มีฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง ดังนั้นจึงน่าที่จะออกฤทธิ์โดยจับกับ acetylcholine receptor บนกล้ามเนื้อ ยับยั้งไม่ให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวได้

ในการศึกษาต่อไปจึงน่าที่จะทำการศึกษาพิสูจน์ความบริสุทธิ์ ศึกษาถึงโครงสร้าง และหาลำดับกรดอะมิโนของ semi-purified fractions ที่แยกได้ เพื่อนำไปเทียบชนิดกับ neurotoxin ที่แยกได้ และมีการรายงานในการศึกษาวิจัยอื่นๆ ก่อนหน้านี้ และเพื่อการ clone ส่วนที่บริสุทธิ์ที่น่าสนใจ นำไปพัฒนาเป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์หรืองานวิจัยต่อไป และอาจทำการศึกษายืนยันการออกฤทธิ์ที่บริเวณ nicotinic acetylcholine receptor และยืนยันตำแหน่งในการจับว่าอยู่ที่ subunits ใด และยังคงศึกษาถึงฤทธิ์อื่นๆ ของ semi-purified fractions ที่แยกได้ เช่น analgesic activity ซึ่งมีผู้รายงานไว้ว่าพบฤทธิ์นี้ใน neurotoxin ที่แยกได้จากพิษงูจงอาง ตลอดจนศึกษาถึง enzyme activity เช่น phospholipase A<sub>2</sub> ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่พบในพิษงู เนื่องจากพบการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ใน neurotoxin ที่แยกจากพิษงูเห่าไทยซึ่งเป็นพิษงูที่มีความคล้ายคลึงกับพิษงูจงอางมาก นอกจากนี้อาจศึกษาถึงความเข้มข้นของ tubocurarine chloride ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ ปิดกั้น neuromuscular transmission เพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อการทำงานของกล้ามเนื้อในการทดลองต่อไป

## 3. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

โครงการวิจัยเสร็จสมบูรณ์

## 4. อุปสรรคในการดำเนินงานและแนวทางแก้ไข

ไม่มี



(รองศาสตราจารย์โสภิต ธรรมอารี)

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 2

วันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2550





## โครงการที่ 3

การวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของ  
พิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาท  
ที่ต่อกล้ามเนื้อ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญาเลขที่ GBR\_12\_50\_30\_10

การรายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงาน  
โครงการที่ 3

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกล้ามเนื้อ

(ภาษาอังกฤษ) PROTEIN ANALYSIS OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING KOBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)

รายงานช่วงระยะตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2549 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2550  
(โครงการวิจัยเสร็จสมบูรณ์ ระยะเวลาวิจัย 1 ปี 6 เดือน)

ชื่อหัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช

หน่วยงาน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0-2218-8053-6 โทรสาร 0-2218-8052

E-mail : spolkit@chula.ac.th

1. การดำเนินงาน :

- ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ  
 ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

วัตถุประสงค์

เปรียบเทียบโปรตีนของพิษงูจงอางจากแหล่งต่างๆ และส่วนที่แยกของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกล้ามเนื้อ

บททวนวรรณกรรม

งูจงอาง (King Cobras) เป็นงูพิษในกลุ่ม Family *Elapidae* งูในกลุ่มนี้จะมีเขี้ยวพิษอยู่ที่กรามบนด้านหน้า เวลากัดผู้ป่วยมักจะไม่เห็นรอยเขี้ยว (fang mark) เนื่องจากเขี้ยวสั้นและเคลื่อนไหวไม่ได้ Subfamily

Bungarinae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Ophiophagus hannah* จัดเป็นงูพิษที่ยาวที่สุดในโลก โดยทั่วไปแล้ว ตัวโตเต็มที่มีมักมีความยาวอยู่ในช่วง 2.5-4 เมตร น้ำหนักงูจางขนาดใหญ่ประมาณ 6-10 กิโลกรัม เป็นงูที่มีรูปร่างเพรียวยาว งูจางอาจเป็นงูพิษที่มีนิสัยค่อนข้างดุ สามารถแผ่แม่เบี้ยได้เช่นเดียวกับงูเห่า การแผ่แม่เบี้ยจะยกตัวได้สูงประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวลำตัว แต่แม่เบี้ยจะแคบกว่างูเห่าเมื่อเทียบกันตามสัดส่วน และไม่มีดอกจันอย่างในงูเห่า แต่จะมีลายจางๆตามขวางเป็นบั้งๆแทน นอกจากนี้งูจางยังมีเกล็ด (occipitals) บนศีรษะคู่พิเศษ 1 คู่ อยู่ด้านหลังของเกล็ดกระหม่อม (parietals) ขนาดและสีสันของลำตัวจะแปรผันกันในแต่ละพื้นที่ เช่น งูจางทางภาคใต้ของไทย มักมีขนาดตัวใหญ่กว่างูจางในภาคอื่นสีตัวเป็นสีน้ำตาลอมเขียว ส่วนงูจางแถบภูเขาสูงทางภาคเหนือ มักพบว่ามีสีเข้มคล้ำจนเกือบดำ เรียกว่าจางดำ ค่อนข้างดุกว่าแบบอื่น ส่วนงูจางทางภาคกลางและอีสานมักมีสีตัวเป็นลายขั้วตามขวางเป็นบั้งๆเกือบตลอดตัว แต่ขนาดเล็กกว่าภาคอื่น งูจางอาศัยอยู่ใกล้แหล่งลำธาร ตามชอกหินหรือโพรงไม้ ขึ้นต้นไม้ได้ดี แต่ปกติแล้วจะอยู่ตามพื้นดินมากกว่า เป็นงูที่ออกหากินได้ทั้งในกลางวันแดดไม่ร้อนจัดและในเวลาพลบค่ำ อาหารหลักคือชนิดอื่นๆ แม้กระทั่งงูเหลือมที่ตัวไม่โตนัก และยังกินแม่แตงชนิดเดียวกันที่ยังเล็กอยู่ นอกจากนั้น อาจกินสัตว์จำพวกตะกวด กิ้งก่า ตุ๊กแก เป็นอาหาร การสืบพันธุ์ งูจางจะวางไข่ปีละครั้ง ครั้งละ 20-30 ฟอง ก่อนวางไข่ งูจางเพศเมียจะใช้ลำตัวกวาดใบไม้ร่วงๆมากองสุมเป็นรัง พอวางไข่แล้วก็จะคลุมด้วยใบไม้ แม่งูจะดูแลเฝ้าไข่เอง ลูกงูแรกฟักมีความยาวลำตัวกว่า 50 เซนติเมตร สีตัวเป็นสีดำ มีลายเหลืองคาดตามขวางเป็นระยะตั้งแต่หัวสุดหาง งูจางเป็นงูที่มีนิสัยดุ มีพิษทางระบบประสาท (Neurotoxins) ที่รุนแรงมาก เนื่องจากพิษมีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถถูกดูดซึมได้รวดเร็วไปตามกระแสเลือด ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาดก พูดไม้ขีด หายใจไม่สะดวก อีกทั้งยังมีขนาดตัวใหญ่ต่อมพิษใหญ่ปริมาณพิษย่อมมากตามไปด้วย ประกอบกับมีพฤติกรรมการกัดแบบกัดติดแน่น ไม่ยอมปล่อยง่ายๆ จึงจัดเป็นงูพิษที่อันตรายมาก

ส่วนประกอบของพิษงู พิษงูประกอบด้วยสารพิษต่างๆ มากกว่า 20 ชนิด เป็นโปรตีนเกิน 90% ซึ่งอยู่ในรูปของ polypeptide toxins และ enzymes ที่เหลือเป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งอยู่ในรูปของ glycoprotein ไขมันอยู่ในรูป phospholipids และมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น ธาตุสังกะสีและ riboflavin เป็นต้น polypeptide toxins ที่สำคัญคือ พิษ neurotoxin ซึ่งพบในกลุ่ม *Elapidae* เป็นส่วนใหญ่ neurotoxin นี้มีโมเลกุลขนาดเล็กจึงถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้รวดเร็ว แล้วไปจับที่ neuromuscular junction เช่น พิษจากงูสามเหลี่ยมและงูทับสมิงคลา พิษของ polypeptide toxins ตัวอื่นๆที่พบคือพิษ cardiotoxin พบในงูเห่าอินเดีย จะทำลาย cell membrane ของกล้ามเนื้อหัวใจทำให้หัวใจเต้นผิดปกติ พิษ hemorrhagin พบในกลุ่ม *Viperidae* ทำให้เกิดเลือดออกตามส่วนต่างๆ ของร่างกายเนื่องจากไปทำลายที่ vascular endothelium พิษ hemolysin มีฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดแดง แต่พบในหลอดทดลองเท่านั้น ไม่พบในผู้ป่วยที่ถูกงูกัด พิษ cytotoxin พบในกลุ่ม *Viperidae* งูเห่าและงูจาง จะทำลายเซลล์โดยตรง ทำให้บริเวณที่ถูกกัดบวมและเน่า พิษ rhabdomyosin พบในงูทะเล ทำให้กล้ามเนื้อตายและเกิด myoglobinuria เอ็นไซม์

ที่พบในพิษงูมีหลายชนิดเช่น trombinlike enzyme จะกระตุ้น factor V และ factor X ทำให้เลือดไม่แข็งตัว ส่วน enzyme protease ที่พบในงูจะปะจะทำลาย fibrinogen และ enzyme phospholipase (lecithinase) ที่พบในพิษงูหลายชนิดทำให้เกิด neurotoxicity cardiotoxicity และเพิ่ม vascular permeability ส่วน enzyme hyaluronidase จะย่อย tissue ของร่างกายทำให้พิษงูแพร่กระจายเร็วขึ้น ส่วนประกอบของสารต่างๆเหล่านี้ จะมีสารใดมากหรือน้อย ขึ้นกับชนิดของพิษแต่ละชนิด ซึ่งจะมีคุณสมบัติ เฉพาะตัวที่แตกต่างออกไปจากพิษชนิดอื่นๆ และความเป็นพิษในแต่ละชนิดนั้นเชื่อว่าอาจเกิดจากการทำงานของสารพิษ เพียงหนึ่งอย่างหรือมากกว่าหนึ่งอย่างขึ้นไปก็ได้ โดยความเป็นพิษเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารที่เป็นพิษแต่ละอย่าง ปกติงูทั่วไปจะขับพิษออกมาครั้งหนึ่งประมาณ 30-2,000 มิลลิกรัม และ 2 ใน 3 เป็นน้ำ

จากความเป็นพิษของสารเคมีในพิษงูนั้น ได้มีผู้สนใจใช้เป็นตัวยารักษาโรคต่างๆ เช่น Ancrod จากพิษงูเขียวหางไหม้และ Exanta จากพิษของงูเห่า เป็นยาที่ป้องกันการเกิดลิ่มเลือด เนื่องจากโปรตีนในพิษงูจะไปจับกับ integrin ทำให้ยับยั้งการเกิด fibrinogen ซึ่งเป็นโปรตีนในเลือดที่ทำให้เลือดแข็งตัว ซึ่งเป็นสาเหตุเกิดหัวใจวาย ช่วยให้เลือดไหลเวียนได้ดี และ โปรตีน contortrostatin ในพิษของงู Copperhead viper ช่วยในการรักษาโรคเมะเร็งได้ โปรตีนนี้จะไปยับยั้งการไหลเวียนเลือดในก้อนเนื้อร้าย ทำให้ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และมีความเฉพาะเจาะจงต่อเป้าหมายมาก นอกจากพิษของงูแล้วที่นำมาเป็นยารักษาโรคได้ เช่นน้ำลายของ Gila monster ก็นำมาทำเป็นยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด มีชื่อว่า Exennatide ซึ่งในปัจจุบันมีผู้ศึกษาการนำพิษจากธรรมชาติต่างๆมาใช้เป็นยารักษาโรคเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากว่ามีผลข้างเคียงน้อยและมีความเฉพาะเจาะจงต่อเป้าหมาย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโปรตีนจากน้ำพิษของงู ที่มีผู้ได้ศึกษามาแล้ว ก็จะมีงูแมวเซา งูเห่า งูทับสมิงคลา งูเขียวหางไหม้ตาโต และงูจงอาง แต่เนื่องจากพิษของงูแต่ละชนิดมีความเหมือนและแตกต่างของการออกฤทธิ์ จึงได้ทำการศึกษานองค์ประกอบที่สำคัญในการก่อให้เกิดอันตราย เมื่อพิษเข้าสู่ร่างกาย เพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต ซึ่งในกรณีการศึกษาโปรตีนในพิษงูจงอางได้มีผู้พบโปรตีน 66 โปรตีน ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม Long neurotoxin 20 ชนิด , Short chain neurotoxin precursor 10 ชนิด , Cardiotoxin precursor 5 ชนิด และ โปรตีนตัวอื่นๆ อีกประมาณ 23 ชนิด

การศึกษาโปรตีนโดยทั่วไปประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ วิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน และ ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนที่ได้จากพิษงู ชั้นแรกของการวิจัยในการศึกษาโปรตีนจากพิษงู คือการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ซึ่งใช้หลักการกระจายตัวของโปรตีนในเฟสเคลื่อนที่(Mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ที่แตกต่างกันโดยโปรตีนที่กระจายตัวในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าจะแยกตัวออกมาก่อนโปรตีนอื่นๆ สำหรับเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีหลายเทคนิคแต่ละเทคนิคมีหลักในการแยกตามคุณสมบัติของโปรตีนที่ต่างกัน เช่น ขนาด ประจุ และสภาพขั้ว โดยอธิบายหลักการได้ดังนี้

Gel filtration chromatography เป็นการแยกโปรตีนตามขนาดและรูปร่างโมเลกุลผ่านตัวกลางที่มีรูพรุน โปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะถูกชะออกมาก่อน ส่วนโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กต้องใช้เวลาในการเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปภายในรูพรุนทำให้ถูกชะออกมาในภายหลัง

Ion exchange chromatography เป็นการแยกโปรตีนที่ขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดทางไฟฟ้าระหว่างประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนและประจุบนตัวกลางที่บรรจุในคอลัมน์ โปรตีนที่มีประจุสุทธิสูงและตรงข้ามกับตัวกลางจะมีแรงดึงดูดที่แข็งแรงระหว่างกันส่งผลให้ถูกชะออกมาทีหลัง เมื่อเพิ่มความแรงของเกลือในเฟสเคลื่อนที่ไอออนของเกลือจะเข้าไปจับกับตัวกลางแทนที่โปรตีนทำให้โปรตีนหลุดออกมาพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่

Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารตามความแตกต่างของสภาพขั้วโดยมีเฟสอยู่กับที่เป็นสารที่ไม่มีขั้วจำพวกอนุพันธ์ของซิลิกาที่ต่อกับไฮโดรคาร์บอนสายยาว เทคนิคนี้จะใช้ปั๊มความดันสูงดันเฟสเคลื่อนที่ซึ่งมีสภาพขั้วสูงให้เคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง ดังนั้นโปรตีนที่มีสภาพขั้วสูงมีแรงดึงดูดกับตัวกลางน้อยจะถูกชะออกมากับเฟสเคลื่อนที่ก่อน โปรตีนที่มีสภาพขั้วต่ำที่จะจับกับตัวกลางได้ดีกว่าส่งผลทำให้เกิดการแยกขึ้น

อีกเทคนิคหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการแยกโปรตีนนอกเหนือจากการใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีคือ เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟเรซิส จะใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของสาร อาศัยหลักที่ว่าสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้า โดยเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามกัน สารที่มีประจุไฟฟ้าต่างกัน ย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน และโมเลกุลขนาดเล็กมักเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เช่น

SDS-PAGE เทคนิคนี้เป็นการแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้าโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งเป็นประโยชน์ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและยังสามารถแยกหน่วยย่อยของโปรตีนที่ช่วยบ่งชี้ถึงองค์ประกอบของโปรตีนรวมไปถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย

Two-dimensional PAGE เทคนิคนี้เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของสาร 2 ขั้นตอน ขั้นที่ 1 คือ Isoelectric focusing (IEF) อาศัยความแตกต่างของค่า Isoelectric point (pI) ของโปรตีนแต่ละตัว ประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนจะขึ้นกับ pH ของสารละลาย ที่ pH เท่ากับ pI โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์จึงไม่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ขั้นที่ 2 ตัวกลางเจลที่มีโปรตีนที่ถูกแยกจากกันด้วยวิธีของขั้นที่ 1 จะถูกแยกออกจากกันอีกครั้งโดยใช้ความแตกต่างของขนาดโปรตีน คือ SDS-PAGE ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกโปรตีน 2 ชนิด ที่มีความแตกต่างกันเพียงกรดอะมิโนที่มีประจุ 1 ตัวได้

ขั้นตอนที่สอง คือ การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยการหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน งานวิจัยนี้ อาศัยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี (Mass Spectrometry) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและความไวสูง สามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อยซึ่งเหมาะสมต่อการวิเคราะห์โปรตีน เป็นเทคนิคที่ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างของสารโดยอาศัยการวิเคราะห์ค่ามวลต่อประจุของไอออนที่สารถูกเหนี่ยวนำให้เกิด

การแตกตัวของประกอบหลักของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ แหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ทำหน้าที่เปลี่ยนสภาพโมเลกุลสารที่ไม่มีประจุให้กลายเป็นไอออน ส่วนที่สองเป็นส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ส่วนนี้ทำหน้าที่แยกไอออนที่เกิดขึ้นตามอัตราส่วนของมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ส่วนสุดท้ายคือส่วนตรวจวัดมวล (detector) มีหน้าที่วัดปริมาณไอออนที่เกิดขึ้น แมสสเปกโทรเมตรีที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์ทางด้านโปรตีนมีหลายเทคนิค อาทิเช่น MALDI-TOF เทคนิคนี้ใช้เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่ได้มาจากการย่อยโปรตีนบริสุทธิ์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางโปรตีน เทคนิคนี้เรียกว่า peptide-mass mapping แมสสเปกโทรมิเตอร์ของเทคนิค MALDI-TOF มีส่วนของแหล่งกำเนิดไอออนเป็น matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) ที่ทำให้โปรตีนกลายเป็นไอออนด้วยพลังงานแสงเลเซอร์โดยใช้กรดอินทรีย์ (matrix) เป็นตัวกลางถ่ายทอดพลังงานจากแสงเลเซอร์ให้กับโปรตีนและทำให้โปรตีนเกิดเป็นไอออนได้ในสภาวะก๊าซ ส่วนวิเคราะห์มวลของเทคนิคนี้เป็น time of flight (TOF) ทำหน้าที่วิเคราะห์มวลตามระยะเวลาที่ไอออนใช้ในการเดินทางจากแหล่งกำเนิดไอออนมาจนถึงส่วนตรวจวัด

หลังจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางแมสสเปกโทรเมตรี ผลที่ได้คือมวลโมเลกุลของชิ้นส่วนเปปไทด์ โดยจะนำไปเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล เพื่อให้ทราบชนิดของโปรตีน แต่ถ้าไม่ตรงกับโปรตีนใดเลยในฐานข้อมูล ก็คาดได้ว่าอาจเป็นโปรตีนชนิดใหม่

## วิธีดำเนินการวิจัย

### สารตัวอย่าง

พิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) 3 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 (KV2) เป็นงูจงอางจากจังหวัดเพชรบูรณ์ นำมาเลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยงงู

ตัวอย่างที่ 2 (KV6) เป็นงูจงอางจากภาคใต้ นำมาเลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยงงู

ตัวอย่างที่ 3 (KV9) เป็นงูจงอางจากภาคใต้ นำมาเลี้ยงในสวนงู

1. แยกโปรตีนจากพิษงูจงอางให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

1.1 เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

1.1.1 SDS-PAGE ใช้ความเข้มข้นของเจล 15% เจลหนา 0.5 mm สารตัวอย่างที่ใช้มีความเข้มข้นของโปรตีนสูงประมาณ 0.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ในการย้อมด้วยสีโคแมสซีบลู

1.1.2 2-D PAGE ใช้แผ่นเจลยาว 7 cm ที่มี pH ในช่วง 4-7 ปริมาณโปรตีนที่ใส่อยู่ในช่วง 20-120  $\mu\text{g}$  มาผสมกับ rehydration solution 100  $\mu\text{l}$  และ IPG buffer 10  $\mu\text{l}$

1.2 เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ที่ใช้คือ HPLC ใช้คอลัมน์ C18 Column ขนาด 4.6 x 250 mm มี Mobile phase ระบบ คือ 0.1% TFA กับ HPLC – grade Acetonitrile สารตัวอย่างจะใช้ crude พิษงูละลายในน้ำ ในการชะโปรตีนออก ให้เพิ่มความเข้มข้นของ Acetonitrile จาก 0 – 100 % ใช้เวลา 100 นาที

2. การย่อยโปรตีนบริสุทธิ์

โปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการย่อยโดยวิธี In gel digestion สำหรับโปรตีนที่แยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีทำการย่อยโดยวิธี In solution digestion

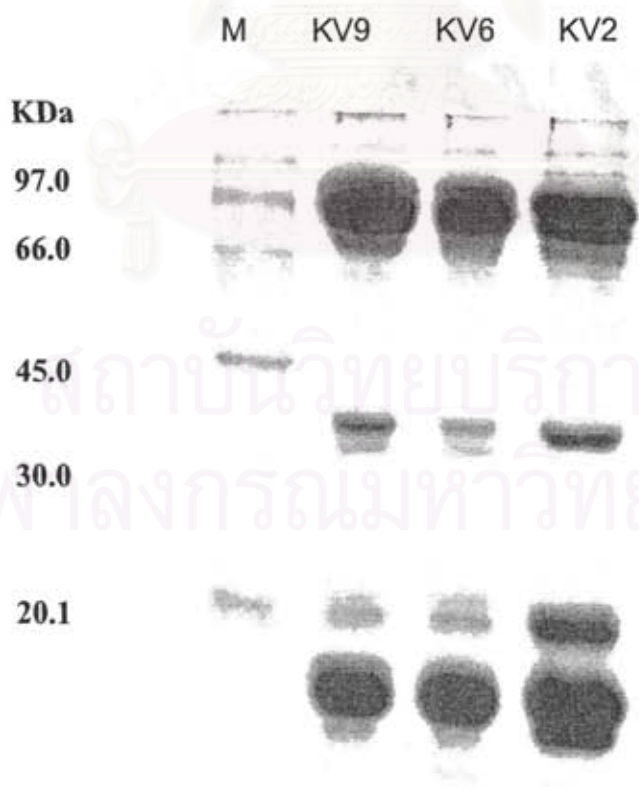
3. วิเคราะห์โปรตีนโดยใช้เทคนิคทางแมสสเปกโทรเมตรี แล้วนำไปสืบค้นจากรฐานข้อมูลโปรตีนเพื่อระบุชนิดโปรตีน

เทคนิคทางแมสสเปกโทรเมตรีที่ใช้คือ MALDI-TOF สารตัวอย่างจะละลายอยู่ใน 50% ACN/0.1% TFA มาผสมกับ matrix solution ( saturated Cyano-4-hydroxycinnamic acid 50% ACN/0.1% TFA ) ในอัตราส่วน 1 : 5 เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่ถูกย่อยมาจากโปรตีนบริสุทธิ์ แล้วนำไปสืบค้นจากรฐานข้อมูลโปรตีนเพื่อระบุชนิดของโปรตีน โดยใช้ฐานข้อมูล MASCOT(<http://www.matrixscience.com>)

#### ผลการทดลอง

##### 1. SDS-PAGE

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ได้ผลดังรูปที่ 1 ซึ่งจากรูปจะเห็นว่า การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคนี้จะบอกองค์ประกอบในพิชงตัวอย่าง KV9 และ KV6 ว่ามีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกัน ที่แตกต่างกันคือมีโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 40 KDa ในตัวอย่าง KV2 แต่วิธีการนี้จะทราบว่ามีโปรตีนอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลเท่าใด แต่ไม่เหมาะใช้ในการแยกแต่ละส่วนเท่าที่ควร เนื่องจากแถบของโปรตีนยังแยกจากกันไม่ชัดเจนพอ จะทำการตัดชิ้นเจลไปทำการสกัดโปรตีนมาวิเคราะห์ต่อไป

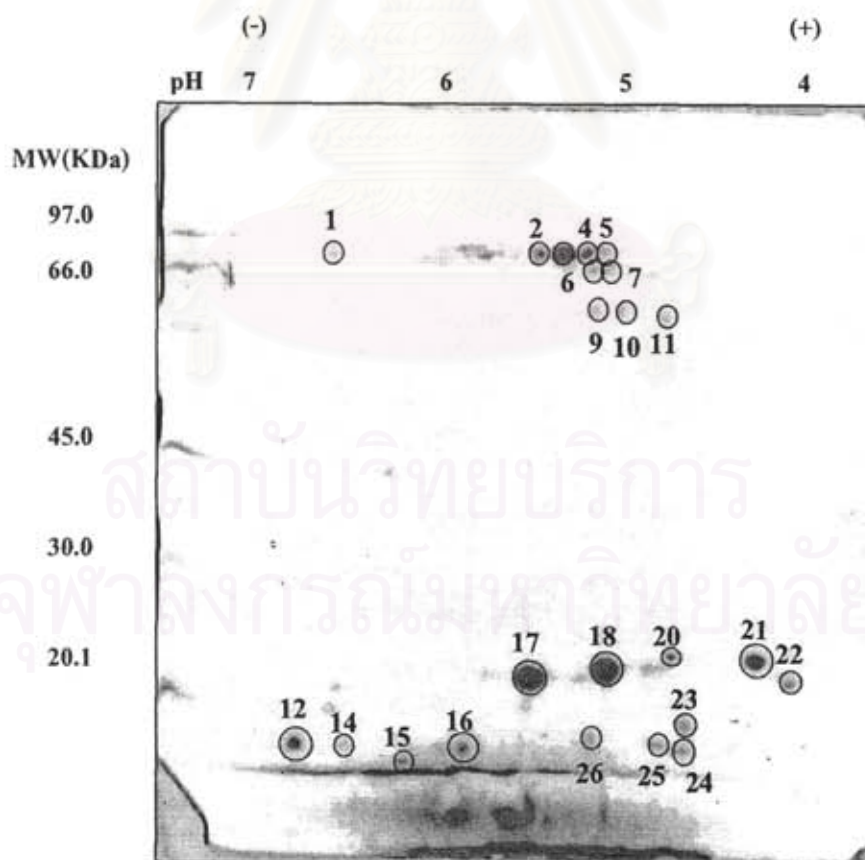


ภาพที่ 1 SDS-PAGE ของพิชงจางทั้ง 3 ตัวอย่าง column 1 protein standard; column 2 ตัวอย่าง KV9; column 3 ตัวอย่าง KV6; column 4 ตัวอย่าง KV2

## 2. Two-dimensional PAGE

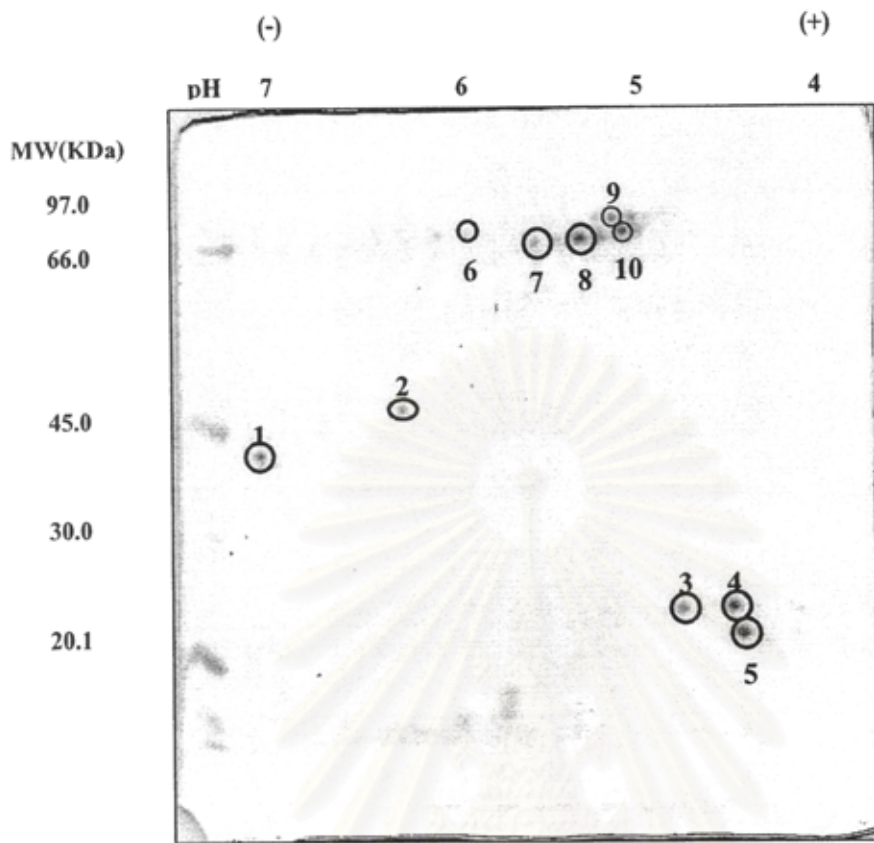
การแยกโปรตีนด้วยวิธี Two-dimensional PAGE ได้ผลดังรูปที่ 2 , 3 และ 4 ตามลำดับ จากผล การแยกโปรตีนด้วยวิธี Two-dimensional PAGE ได้ทำการตัดเจลในแต่ละจุดมาทำการย่อยเจล ด้วยวิธี In-gel digestion โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจล ซึ่งโปรตีนที่ได้จะถูกย่อยเป็นเปปไทด์ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วย MALDI-TOF ทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่ได้มาจากการย่อยโปรตีนบริสุทธิ์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางโปรตีน ( peptide-mass mapping ) ได้ผล ดังตารางที่ 1 , 2 และ 3 ตามลำดับ

รูปแบบของโปรตีนจากการแยกด้วยวิธีนี้ จะพบว่าพืชทั้ง 3 ตัวอย่างมีโปรตีนที่มีค่า pI ประมาณ 5-6 มวลโมเลกุล 65,000-75,000 KDa และ pI 4.5 มวลโมเลกุล 10,000-25,000 KDa เหมือนกัน ส่วนใน พืชตัวอย่าง KV6 และ KV9 จะมีโปรตีนที่มี pI ช่วง 6-7 มวลโมเลกุล 30,000-50,000 KDa คล้ายกันแต่ ไม่พบในพืชตัวอย่าง KV2 ซึ่งจะเห็นว่ามี ความแตกต่างกันในทั้ง 3 ตัวอย่าง แม้ว่าจะเป็นพืชสายพันธุ์ เดียวกัน

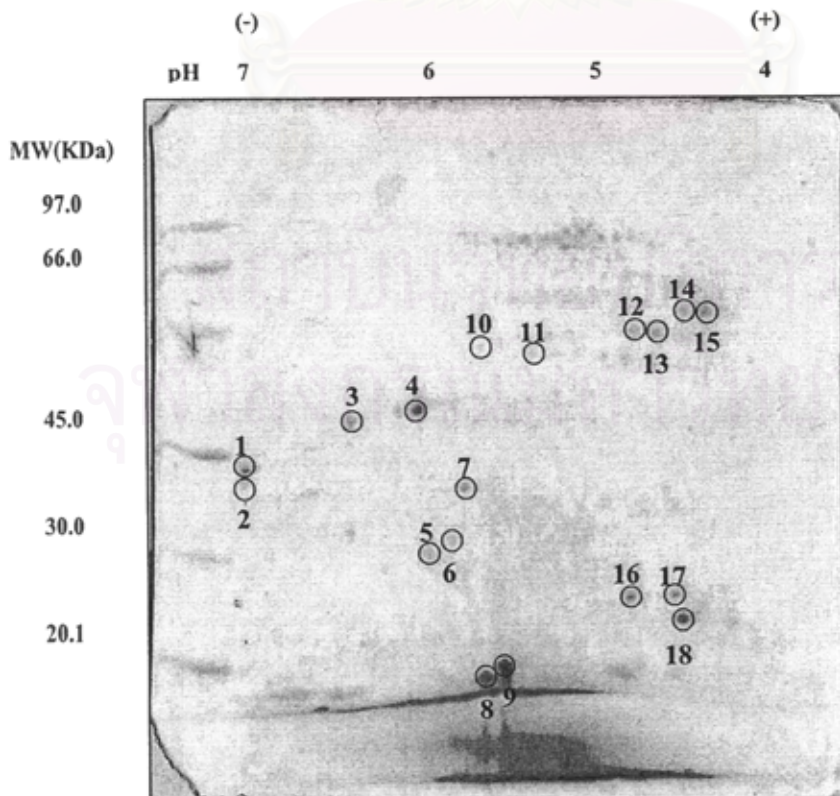


ภาพที่ 2 รูป 2-DE gel ของพืชจุงอางตัวอย่างที่ 1 (KV2) ที่ช่วง pH 4-7





ภาพที่ 3 รูป 2-DE gel ของพิษงูจงอางตัวอย่างที่ 2 (KV6) ที่ช่วง pH 4-7



ภาพที่ 4 รูป 2-DE gel ของพิษงูจงอางตัวอย่างที่ 3 (KV9) ที่ช่วง pH 4-7

ตารางที่ 1 ผลจาก Peptide Mass Mapping ของพิษงูจงอาง ตัวอย่างที่ 1 ( *Ophilophagus Hannah*, KV2 )

Spot No.	App.mass/pl	Theor.mass/pl	No.of peptides matched	Sequence coverage(%)	score	Protein	Species
1	55816/6.6	24993/7.64	6	17	40	GA13258-PA	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
2	56580/5.5	28264/5.79	7	22	51	Hypothetical protein CBG11451	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
4	56580/5.3	14499/8.83	6	33	40	MHC class II region expressed gene KE2	<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)
6	55053/5.3	16590/9.51	5	12	43	chemokine C-C motif receptor 1	<i>Bos taurus</i> (cattle)
7	55053/5.2	19272/10.73	9	35	45	NM_006276 splicing factor	<i>Schistosoma japonicum</i>
9	49709/5.3	40329/7.86	10	13	44	MGC82311 protein	<i>Xenopus laevis</i> (African clawed frog)
10	50473/5.1	25715/11.47	11	26	46	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i> (human)
12	/6.7	59010/6.46	7	15	56	cytochrome P450 CYP6P7	<i>Anopheles minimus</i>
14	/6.5	34074/8.86	6	21	53	cytochrome oxidase deficient homolog 1	<i>Macaca mulatta</i> (rhesus monkey)
15	/6.2	19183/9.07	7	22	49	hypothetical protein LOC76413	<i>Mus musculus</i> (house mouse)
16	/5.9	14045/8.59	5	40	40	NADH dehydrogenase	<i>Homo sapiens</i> (human)
17	8488/5.6	44467/9.37	5	15	50	glycosyl transferase	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680
18	9251/5.2	25585/7.17	5	24	45	GFP-like fluorescent chromoprotein amFP486	<i>Anemonia majano</i>
20	10778/4.9	56282/6.50	9	21	50	Cytochrome P450 family member	<i>Caenorhabditis elegans</i>
21	10778/4.5	26805/6.43	5	31	49	MHC class II antigen	<i>Barbus intermedius</i>
22	7725/4.3	23473/8.12	4	42	44	neurexin 2, partial	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)
23	2381/4.8	30041/8.35	6	19	53	exosome component 3	<i>Mus musculus</i> (house mouse)
24	/4.9	13573/9.27	4	19	46	T-cell receptor alpha chain	<i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod)
25	/5	56157/9.34	9	11	56	Mg chelatase-related protein	<i>Ehrlichia canis str. Jake</i>
26	1618/5.3	42776/8.74	6	18	45	threonine dehydratase	<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i>

ตารางที่ 2 ผลจาก Peptide Mass Mapping ของพิษงูจงอาง 9 ตัวอย่างที่ 2 ( *Ophilophagus Hannah*, KV6 )

Spot No.	App.mass/pl	Theor.mass/pl	No.of peptides matched	Sequence coverage (%)	score	Protein	Species
1	38152/7.00	50829/9.1	9	23	60	endothelin receptor type B	<i>Canis familiaris</i> (dog)
		50829/9.2	9	23	60	Endothelin B receptor precursor	<i>Canis familiaris</i> (Dog).
2	44673/6.30	26191/9.24	8	33	53	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>
3	12065/4.90	11624/7.98	3	39	46	similar to hypothetical protein MGC3265	<i>Pan troglodytes</i> (chimpanzee)
4	13152/4.65	96287/5.15	5	8	46	similar to Golgi autoantigen	<i>Macaca mulatta</i> (rhesus monkey)
		21891/9.96	3	15	42	60S ribosomal protein L9	<i>Ictalurus punctatus</i> (Channel catfish).
5	9891/4.6	31061/6.99	5	27	48	Regulator of G-protein signaling 10	<i>Pan troglodytes</i> (chimpanzee)
6	71847/6.10	92121/8.62	5	9	44	vanilloid receptor-like protein 2	<i>Mus musculus</i> (house mouse)
		98706/6.97	5	8	43	Transient receptor	<i>Mus musculus</i> (Mouse).
7	69673/5.60	10910/5.78	3	51	50	T cell receptor beta chain variable region	<i>Homo sapiens</i>
		23072/6.37	3	28	44	Ephrin-A2 precursor	<i>Brachydanio rerio</i> (Zebrafish)
8	70760/5.40	75831/7.24	5	9	44	leishmanolysin	<i>Bos taurus</i> (cattle)
9	74021/5.20	24017/9.86	31	5	53	ribosomal protein S2	<i>Homo sapiens</i>
10	71847/5.15	13948/7.03	42	4	54	RP11-216L13.10	<i>Homo sapiens</i> (human)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ผลจาก Peptide Mass Mapping ของพิษงูจงอาง ตัวอย่างที่ 3 ( *Ophilophagus Hannah* , KV9 )

Spot No.	App.mass/pl	Theor.mass/pl	No.of peptides matched	Sequence coverage (%)	score	Protein	Species
1	33844/7	48274/9.67	10	23	65	hypothetical protein Afu5g10790	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293
2	31066/7	39530/7.86	9	21	46	MGC82311 protein	<i>Xenopus laevis</i> (African clawed frog)
3	40788/7.5	12376/9.12	8	47	54	YdeP	<i>Cellulophaga</i> sp.
		43122/5081	9	27	51	RAG 1	<i>Felis catus</i> (cat)
4	43566/7.9	43122/5081	10	26	52	RAG 1	<i>Felis catus</i> (cat)
		17644/9.78	9	40	52	hypothetical protein CdifQ_02002079	<i>Clostridium difficile</i> QCD-32g58
5	18566/6	27689/5.09	8	34	60	hypothetical protein	<i>Aedes aegypti</i> ( <i>Stegomyia aegypti</i> )
6	19955/6.1	8642/10.27	7	78	48	c-myc	<i>Phyllodytes auratus</i> ( golden frog)
		11148/10.42	8	73	55	hypothetical protein PdenDRAFT_5081	<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222
7	29677/6.2	26255/9.49	7	42	52	hypothetical protein	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803
8	5044/6.2	2063/6.56	4	100	42	apolipoprotein C2	<i>Bos taurus</i> (cattle)
9	2266/6.3	11999/4.54	6	31	53	ATP citrate lyase beta	<i>Alvinella pompejana</i> (Bac)
10	57455/6.2	14805/8.39	6	43	44	TcR CD3 delta-chain	<i>Sus scrofa</i> (pig)
11	54677/6.5	24066/10.02	8	23	38	hypothetical protein	<i>Macaca mulatta</i> (rhesus monkey)
		18451/5.13	6	22	41	lactoglobulin beta.	<i>Ovis aries</i> (sheep)
12	60233/5	3454/9.11	6	90	61	unnamed protein product	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
13	58844/5.1	11329/9.55	6	61	49	Cerastotin.	<i>Cerastes cerastes</i> (horn viper)
14	63011/5.2	3394/10.88	5	81	44	homeodomain protein	<i>Girardia tigrina</i>
		40356/9.51	10	26	53	hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i> OR74A(Fungi)
15	63011/5.3	36467/8.72	10	33	56	Os07g0531400	<i>Oryza sativa</i>
16	8844/5	22874/6.06	6	42	56	CG14810-PA	<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)
17	10233/5.2	52725/7.63	8	24	48	F52E1.10	<i>Caenorhabditis elegans</i>
18	4677/5.3	1587/8.75	3	100	42	RNA-binding protein	<i>Homo sapiens</i> (human)
		22705/5.93	5	33	48	unknown	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

3. เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ขั้นตอนต่อมา ได้ทำการเก็บ fraction จากการแยก crude ตัวอย่าง พืชทั้ง 3 ตัวอย่าง ด้วย RP-HPLC

การแยกองค์ประกอบของพืช จากโครมาโตแกรมที่ได้ทำให้สามารถแยกองค์ประกอบ และ ทำการเก็บ fraction ได้ดังนี้

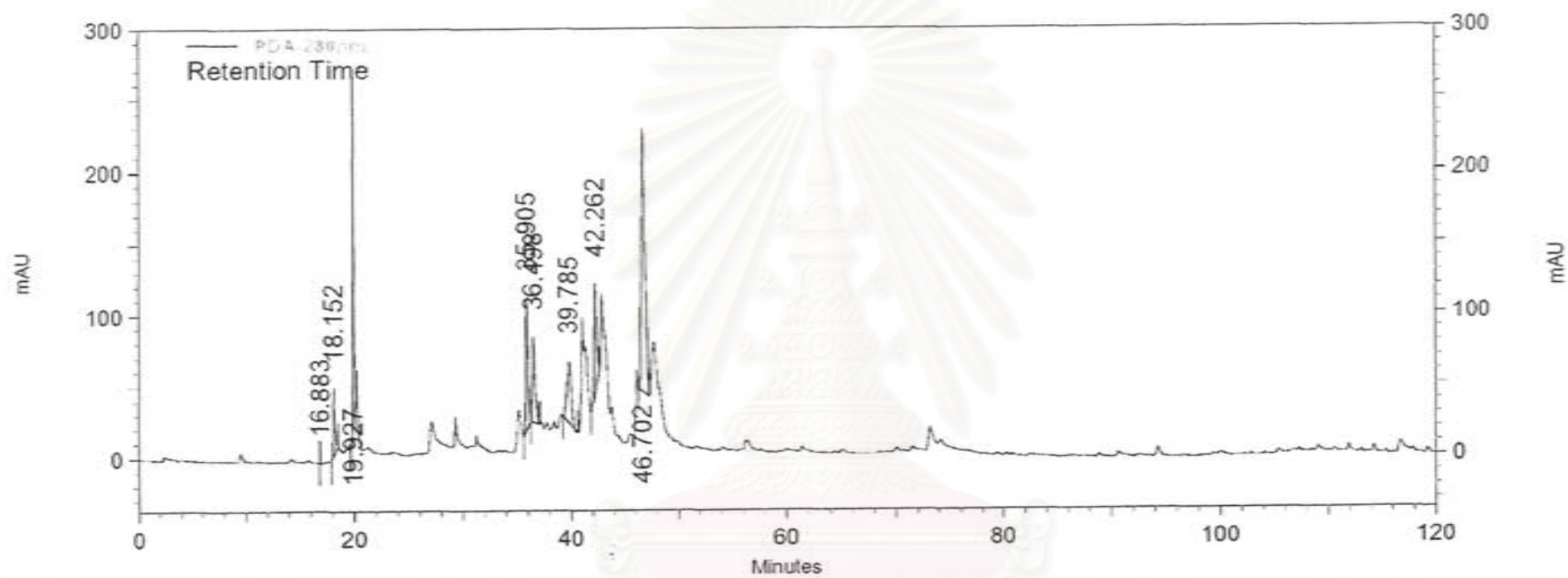
ตัวอย่างที่ 1 (KV2) เก็บ fraction ได้ 13 fraction

ตัวอย่างที่ 2 (KV6) เก็บ fraction ได้ 8 fraction

ตัวอย่างที่ 3 (KV9) เก็บ fraction ได้ 7 fraction ดังแสดงในตารางที่ 4

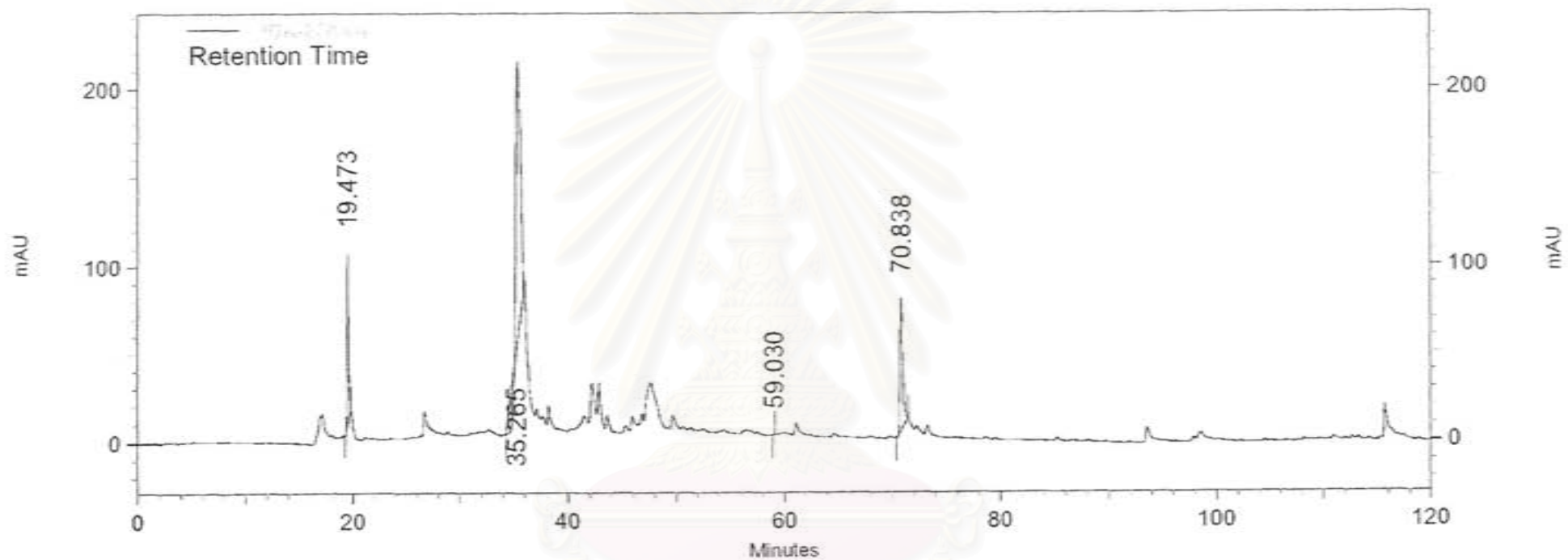
ตารางที่ 4 แสดงผลการแยกองค์ประกอบพืชจาง 3 ตัวอย่างด้วยวิธี RP-HPLC

ตัวอย่างที่ 1(KV2)		ตัวอย่างที่ 2(KV6)		ตัวอย่างที่ 3 (KV9)	
fraction	Retention time(min)	fraction	Retention time(min)	fraction	Retention time(min)
1	17.4	1	17.4	1	16
2	19.5	2	19.7	2	19
3	27.1	3	26.9	3	26.5
4	35.5	4	35.3	4	35
5	36.2	5	42.5	5	42.5
6	39.8	6	47.5	6	47
7	40.8	7	49.6	7	50
8	42.1	8	70.8		
9	42.7				
10	45.9				
11	46.6				
12	47.5				
13	49.6				



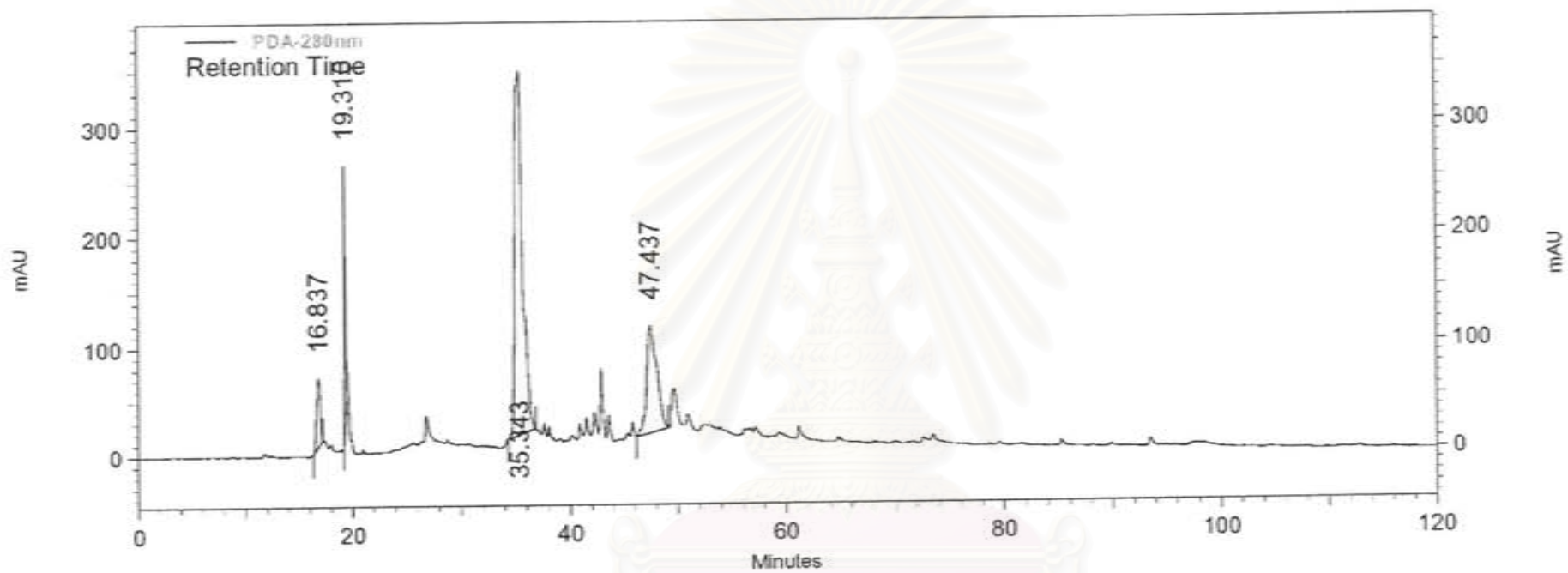
ภาพที่ 4 Chromatogram จาก reverse-phase column HPLC ของพืชงองอาจตัวอย่างที่ 1 (KV2)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5 Chromatogram จาก reverse-phase column HPLC ของพิษงูจงอางตัวอย่างที่ 2 (KV6)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6 Chromatogram จาก reverse-phase column HPLC ของพิษงูงอสดตัวอย่างที่ 3 (KV9)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผลจาก HPLC จะพบว่ารูปแบบของพีคที่ขึ้นมาจะเป็นในรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน ในพิชงตัวอย่าง KV6 และ KV9 เกือบทั้งหมดยกเว้นพีคที่มี retention time ประมาณนาที่ที่ 70 ส่วนตัวอย่าง KV2 จะเหมือนในพีคที่ 1 และ 2 ส่วนพีคอื่นๆ มีรูปแบบและปริมาณที่แตกต่างจากตัวอย่างอื่น

#### รายงานผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

จากตัวอย่าง 4 ตัวอย่างที่แยกได้จากโครงการที่ 2 คือ F1.2.1 , F1.2.2 , F1.2.3 และ F1.2.4 ได้มาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์อีกครั้งด้วย 15% Gel SDS-PAGE พบว่า ในตัวอย่างที่ F1.2.1 และ F1.2.4 ไม่เห็นแถบโปรตีน จึงไม่สามารถตัดแถบโปรตีนมาวิเคราะห์ต่อได้ ส่วนตัวอย่าง F1.2.2 และ F1.2.3 ได้เห็นแถบโปรตีนอยู่ในตำแหน่งมวลโมเลกุลระหว่าง 30 -20.1 กิโลดาลตัน จึงได้ทำการตัดแถบโปรตีนมาทำการย่อยโดยใช้วิธี In-gel digestion และจากการทำการ In-gel digestion จะนำตัวอย่างที่ได้ ไปทำการวิเคราะห์ด้วย MS/MS จึงได้ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ แล้วจึงไปเทียบกับฐานข้อมูล ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com))



ภาพที่ 7 แสดง SDS-PAGE (15% Gel) ของ Fraction: F1.2.2 และ F1.2.3

#### จากการวิเคราะห์พบว่า

ตัวอย่าง F1.2.2 มีค่าความเป็นไปได้ที่ยอมรับได้ว่าเป็นโปรตีน Chain C, Crystal Structure Of Natrin จากงูเห่า และ ophanin จากงูจงอางตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (ตัวแดงคือลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ตรงกันกับฐานข้อมูล)

1. Chain C, Crystal Structure Of Natrin From Naja Atra Snake Venom

Mass: 24938      Mass: 24938      Score: 65      (score ที่ยอมรับได้ต้องมีค่ามากกว่า 45)

(Function: Inhibits carbachol-induced muscle contraction and weakly blocks muscle contraction evoked by potassium.)

10 20 30 40 50 60  
NVDFNSESTR RKKKQKEIVD LHNSLRRRVS PTASNMLKME WYPEAASNAE RWANTCSLNH  
70 80 90 100 110 120  
SPDNLRVLEG IQCGESIYMS SNARTWTEII HLWHDEYKNF VYGVGANPPG SVTGHYTIQIV  
130 140 150 160 170 180  
WYQTYRAGCA VSYCPSSAWS YFYVCQYCPS GNFQGKTATP YKLGPPCGDC PSACDNGLCT  
190 200 210  
NPCTIYNKLT NCDSLLKQSS CQDDWIKSNC PASCFCRNKI I

2. ophanin [Ophiophagus hannah] Mass: 26851 Score: 56

(Function: Weakly blocks contraction of smooth muscle elicited by high potassium-induced depolarization, but does not block caffeine-stimulated contraction. May target voltage-gated calcium channels on smooth muscle)

10 20 30 40 50 60  
MIAFTLLSLA AVLQQSFGNV DFNSESTRRQ KKQKEIVDLH NSLRRSVSPT ASNMLKMQWY  
70 80 90 100 110 120  
PEAASNAERW ASNCNLGHSP DYSRVLEGIE CGENIYMSSN PRAWTEIIQL WHDEYKNFVY  
130 140 150 160 170 180  
GVGANPPGSV TGHYTIQIWY KTYRIGCAVN YCPSSSEYSYF YVCQYCPSGN MRGSTATPYK  
190 200 210 220 230  
SGPTCGDCPS ACDNGLCTNP CTLYNEYTNC DSLVKQSSCQ DEWIKSKCPA SCFCHNKII

ตัวอย่าง F1.2.3 มีค่าความเป็นไปได้ที่ยอมรับได้ว่าเป็นโปรตีน ophanin จากงูจงอาง และ Chain C, Crystal Structure Of Natrin จากงูเห่า ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (ตัวแดงคือลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ตรงกับฐานข้อมูล)

1. ophanin [Ophiophagus hannah] Mass: 26851 Score: 73

10 20 30 40 50 60  
MIAFTLLSLA AVLQQSFGNV DFNSESTRRQ KKQKEIVDLH NSLRRSVSPT ASNMLKMQWY

70 80 90 100 110 120  
 PEAASNAERW ASNCNLGHSP DYSRVLEGIE CGENIYMSSN PRAWTEIQL WHDEYKNFVY  
 130 140 150 160 170 180  
 GVGANPPGSV TGHYQIVWY KTYRIGCAVN YCPSSEYSYF YVCQYCPSGN MRGSTATPYK  
 190 200 210 220 230  
 SGPTCGDCPS ACDNGLCTNP CTLYNEYTNC DSLVKQSSCQ DEWIKSKCPA SCFCHNKII

2. Chain C, Crystal Structure Of Natrin From Naja Atra Snake Venom Mass: 24938 Score: 72

10 20 30 40 50 60  
 NVDFNSESTR RKKKQKEIVD LHNSLRRRVS PTASNMLKME WYPEAASNAE RWANTCSLNH  
 70 80 90 100 110 120  
 SPDNLRVLEG IQCGESIYMS SNARTWTEII HLWHDEYKNF VYGVGANPPG SVTGHYQIV  
 130 140 150 160 170 180  
 WYQTYRAGCA VSYCPSSAWS YFYVCQYCPG GNFQGKTATP YKLGPPCGDC PSACDNGLCT  
 190 200 210  
 NPCTIYNKLT NCDSLKQSS CQDDWIKSNC PASCFCRNKI I

สรุปจากผลที่ได้มา มีความเป็นไปได้ว่าในตัวอย่าง F1.2.2 และ F1.2.3 น่าจะเป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน ทั้งผลจากแถบโปรตีนที่เกิดจากการแยกด้วย SDS-PAGE ที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกันและการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางแมสสเปกโทรเมสทรีที่ให้ผลว่าเป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน

3. การดำเนินงานขั้นต่อไป

แม้ว่าโครงการวิจัยครบกำหนดระยะเวลาวิจัย และเสร็จสมบูรณ์ แต่เนื่องจากตัวอย่างที่ F1.2.1 และ F1.2.4 ที่ไม่เห็นแถบโปรตีนนั้น ผู้วิจัยจะดำเนินการต่อไปอีกโดยแยกใหม่และทำการทดสอบซ้ำ ส่วนตัวอย่างที่ F1.2.2 และ F1.2.3 จะทำการทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันความถูกต้องก่อนจะทำโคลนนิ่ง ผลการศึกษาจะเพิ่มเติมในรายงานฉบับสมบูรณ์เมื่อแผนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์ในเดือนกันยายน 2551

4. อุปสรรคในการดำเนินงานและแนวทางแก้ไข

ไม่มี

ผศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 3

30 กันยายน 2550



## โครงการที่ 4

การศึกษาเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของ  
สารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้ง  
ปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญาเลขที่ GBR\_12\_50\_30\_10  
รายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงาน  
โครงการที่ 4

ชื่อโครงการวิจัย

- (ภาษาไทย) การศึกษาเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
- (ภาษาอังกฤษ) PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING KOBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)

รายงานช่วงระยะตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2549 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2550

ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ. โสภิต ธรรมอารี

หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การดำเนินงาน :

- ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ
- ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

1.1 การหาค่าความเป็นพิษ (lethality) ของพิษงูจงอาง ตามวิธีของ Reed, L.J., Muench, H., 1938

สัตว์ทดลองที่ใช้

หนูเมาส์ไม่จำกัเพศ น้ำหนัก 18-20 กรัม สายพันธุ์ ICR breed (*Mus musculus*) ทำการเพาะเลี้ยงจากสถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

การเตรียมสารละลายพิษงู

Crude venom

จากค่า  $LD_{50}$  ของพิษงูจงอางรุ่น OH 260542 (2) ในโครงการที่ 1 มีค่า 32.9 ไมโครกรัมค่อน้ำหนักหนู 18-20 กรัม ความเข้มข้นของพิษที่เหมาะสมสำหรับทดสอบหา  $LD_{50}$  ของพิษงูจงอางที่ใช้ในโครงการวิจัย จึงกำหนดให้อยู่ระหว่าง 17.8-68.6 ไมโครกรัมค่อน้ำหนักหนู 18-20 กรัม (จากค่ากลางประมาณ 35.0 ไมโครกรัม/หนูหนัก 20 กรัม อัตราส่วนการเจือจาง 1:1.4) ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมดังนี้ 17.8, 25, 35, 49 และ 68.6 ไมโครกรัมตามลำดับ

Fractions ของพิษงูจงอาง

รวม fractions ของแต่ละฟีก หาปริมาณ โปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

เทียบกับพิษของอาจ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมซึ่งมีค่าการคุกกลืนแสงเท่ากับ 1.113

### การทดสอบเบื้องต้น ( preliminary test)

ฉีดพิษในแต่ละพีคให้สัตว์ทดลอง โดยใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่แยกได้ปริมาตร 0.2 มิลลิกรัม แต่ความเข้มข้นที่ใช้ไม่เกิน 2LD50 ของพิษก่อนการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน และทำการเจือจางพิษลง 2 เท่า เป็นจำนวน 2 ครั้ง โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์เป็นตัวทำละลาย ในขั้นตอนนี้ใช้หนูทดลองเพียง 1 ตัวต่อความเข้มข้น

### การหาค่าความเป็นพิษ

จากความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายและความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้สัตว์ทดลองรอดตาย ในข้อที่ 1 ใช้ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นช่วงของการหาค่าความเป็นพิษ ทำการเจือจางพิษในอัตราส่วน 1:1.4

### วิธีทดสอบ

1. ฉีดพิษหรือส่วนย่อยของพิษเข้าหลอดเลือดดำที่หางหนูเมาส์ ความเข้มข้นละ 5 ตัว (สำหรับ fractions ของพิษใช้ความเข้มข้นละ 3 ตัว) ติดตามอาการหลังฉีดตลอด 24 ชม
2. บันทึกจำนวนหนูรอดชีวิต และ หนูตายแต่ละความเข้มข้น
3. รวมจำนวนหนูรอดชีวิตจากพิษ ความเข้มข้นมากไปน้อย
4. รวมจำนวนหนูตายจากพิษความเข้มข้นน้อยไปหามาก
5. นำจำนวนรวมหนูรอดชีวิต, หนูตาย, ความเข้มข้นของพิษที่ใช้ในการทดสอบ และ อัตราส่วนการเจือจางพิษ ไปคำนวณหา LD<sub>50</sub> ตามสมการ

Sum (log of end point)

= Logarithm of lower dilution + [(Proportional distance) x (log of dilution factor)]

$$\text{เมื่อ Proportional distance} = \frac{50 - (\% \text{mortality at dilution next below})}{(\% \text{mortality next above}) - (\% \text{mortality next below})}$$

### 2. สรุปผลการดำเนินงาน

ผลการหาค่าความเป็นพิษของพิษของอาจ (S = Survival, D = Death)

Dose µg/mouse			total		% mortality
	S	D	S	D	
17.8	5	0	9	0	0
25	4	1	4	1	20
35	0	5	0	6	100
49	0	5	0	11	100
68.6*					

\*ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่ได้ทำการฉีดให้สัตว์ทดลอง เนื่องจากที่ความเข้มข้น 49 ไมโครกรัม สัตว์ทดลองตายหลังฉีดพิษไม่เกินครึ่งชั่วโมง

$$\begin{aligned} \log LD_{50} &= \\ \log \text{ of lower dilution} + \{ \log \text{ of dilution factor} \times [ 50\% \text{-mortality lower/ mortality upper- lower} ] \\ &= \log 25 + \{ \log 1.4 \times [ 50-20/100-20] \} \\ &= 1.3979 + \{ 0.146128 \times 0.375 \} \\ &= 1.3979 + 0.054798 \\ \log LD_{50} &= 1.4527 \\ LD_{50} &= 28.36 \mu\text{g/mouse} \end{aligned}$$

### ผลการหาค่าความเป็นพิษ ของพิษงูองจากการแยกด้วย Q-Sepharose

Pooled fractions ได้ 7 fractions;

Preliminary test; ฉีดพิษแต่ละฟีก 3 ความเข้มข้น, ความเข้มข้นละ 1 ตัว (S = Survival, D = Death)

Fraction No.	OD280	mg/ml	mg/mouse	0.2 ml	เจือจาง 1:2	เจือจาง 1:4
F 1	1.1629	1.06*	0.053	D	D	S
F 2	0.5629	0.51	0.102	S	S	S
F 3	0.4199	0.38	0.076	S	S	S
F 4	0.4258	0.39	0.078	S	S	S
F 5	0.4844	0.44	0.088	S	S	S
F 6	0.1229	0.11	0.022	S	S	S
F 7	0.1642	0.15	0.03	S	S	S

\* diluted 1:4 (0.265 mg/ml) ก่อนการทดสอบ

2. เจือจางพิษฟีกที่ 1 (F 1) ที่ความเข้มข้นระหว่างการเจือจางที่ 1:2 และ 1:4 โดยมี dilution factor เท่ากับ 1.4 (S = Survival, D = Death)

Dose $\mu\text{g/mouse}$			total		% mortality
	S	D	S	D	
9.6	3	0	4	0	0
13.5	1	2	1	2	67
18.9	0	3	0	5	100
26.5	0	3	0	9	100

$$\log LD_{50} =$$

log of lower dilution + {log of dilution factor X [ 50%-mortality lower/ mortality upper- lower]}

$$= \log 9.64 + \{\log 1.4 \times [50-0/67-0]\}$$

$$= 0.984 + 0.1096$$

$$\log LD_{50} = 1.094$$

$$LD_{50} = 12.4 \mu\text{g}/\text{mouse}$$

### ผลการหาค่าความเป็นพิษ ของพิษงูจงอางจากการแยกด้วย Cellulofine GCL-1000 sf column

1. Preliminary test; ทดสอบแต่ละพีค 3-4 ความเข้มข้น, ใช้หนู ความเข้มข้นละ 1 ตัว (S = Survival, D = Death)

Fraction No.	OD280	mg/ml	mg/mouse	0.2 ml	เจือจาง 1:2	เจือจาง 1:4	เจือจาง 1:8
F 1.1	0.8925	0.80*	0.040	S	S	S	
F 1.2	0.7377	0.66*	0.044	D	D	D	S
F 1.3	0.4364	0.39*	0.040	S	S	S	

\*เจือจางพิษงูแต่ละพีคให้มีความเข้มข้นมากกว่า 2LD<sub>50</sub> ของพิษงูก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (2 x 12.4=24.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ในที่นี้ใช้ความเข้มข้น 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$

2. เจือจางพิษพีคที่ 2 (F 1.2) ที่ความเข้มข้นระหว่างการเจือจางที่ 1:4 และ 1:8 โดยมี dilution factor เท่ากับ 1.4 (S = Survival, D = Death)

Dose $\mu\text{g}/\text{mouse}$			total		% mortality
	S	D	S	D	
5.6	2	1	3	1	25
8.0	1	2	1	3	75
11.2	0	3	0	6	100

$$\log LD_{50} =$$

log of lower dilution + {log of dilution factor X [ 50%-mortality lower/ mortality upper- lower]}

$$= \log 5.6 + \{\log 1.4 \times [50-25/75-25]\}$$

$$= 0.74818 + 0.07306$$

$$\log LD_{50} = 0.8212$$

$$LD_{50} = 6.63 \mu\text{g}/\text{mouse}$$



ผลการหาค่าความเป็นพิษ ของพิษงูจงอางจากการแยกด้วย SP-Sepharose column

1. Preliminary test; ใช้หนู ความเข้มข้นละ 1 ตัว (S = Survival, D = Death)

Fraction No.	OD280	mg/ml	mg/mouse	0.2 ml	เจือจาง 1:2	เจือจาง 1:4
F 1.2.1	0.0944	0.085	0.0170	D	D	S
F 1.2.2	0.1817	0.163*	0.0163	D	D	S
F 1.2.3	0.0927	0.083	0.0166	D	D	S
F 1.2.4	0.0895	0.080	0.0160	D	D	S
F 1.2.5	0.0455	0.041	0.0082	S		
F 1.2.6	0.0466	0.042	0.0084	S		

\*เจือจางพิษงู 2 เท่าเพื่อให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับ Fraction 1-4 ซึ่งปริมาณโปรตีนดังกล่าวมากกว่า  $2LD_{50}$  ของพิษงูก่อนการทำให้บริสุทธิ์ ( $2 \times 6.6 = 13.26 \mu\text{g/m}$ ) ในที่นี่ใช้ความเข้มข้นประมาณ  $16 \mu\text{g/ml}$

2. การหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจงอาง F 1.2.1 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose (S = Survival, D = Death)

Dose $\mu\text{g/mouse}$			total		% mortality
	S	D	S	D	
3.05	3	0	9	0	0
4.25	3	0	6	0	0
<b>6.09</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>25</b>
8.5	1	2	1	3	75

$$\log LD_{50} =$$

$$\log \text{ of lower dilution} + \{ \log \text{ of dilution factor} \times [ 50\% \text{-mortality lower} / \text{mortality upper} - \text{lower} ]$$

$$= \log 6.09 + \{ \log 1.4 \times [ 50 - 25 / 75 - 25 ] \}$$

$$= 0.7846 + 0.07306$$

$$\log LD_{50} = 0.8576$$

$$LD_{50} = 7.2 \mu\text{g/mouse}$$

การหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose (S = Survival, D = Death)

Dose $\mu\text{g/mouse}$			total		% mortality
	S	D	S	D	
2.92	3	0	6	0	0
<b>4.07</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
5.84	0	3	0	3	100
8.15	0	3	0	6	100

$$\begin{aligned} \log LD_{50} &= \\ \log \text{ of lower dilution} + \{ \log \text{ of dilution factor} \times [ 50\% \text{-mortality lower/ mortality upper- lower} ] \\ &= \log 4.07 + \{ \log 1.4 \times [ 50-0/100-0] \} \\ &= 0.6096 + 0.07306 \\ \log LD_{50} &= 0.6826 \\ LD_{50} &= 4.8 \mu\text{g/mouse} \end{aligned}$$

การหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจงอาง F 1.2.3 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose

Dose μg/mouse			total		% mortality
	S	D	S	D	
2.97	3	0	6	0	0
4.15	3	0	3	0	0
5.95	0	3	0	3	100
8.3	0	3	0	6	100

$$\begin{aligned} \log LD_{50} &= \\ \log \text{ of lower dilution} + \{ \log \text{ of dilution factor} \times [ 50\% \text{-mortality lower/ mortality upper- lower} ] \\ &= \log 4.15 + \{ \log 1.4 \times [ 50-0/100-0] \} \\ &= 0.618 + 0.07306 \\ \log LD_{50} &= 0.6911 \\ LD_{50} &= 4.91 \mu\text{g/mouse} \end{aligned}$$

การหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจงอาง F 1.2.4 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose

Dose μg/mouse			total		% mortality
	S	D	S	D	
2.9	3	0	6	0	0
4.0	3	0	3	0	0
5.7	0	3	0	3	100
8.0	0	3	0	6	100

$$\begin{aligned} \log LD_{50} &= \\ \log \text{ of lower dilution} + \{ \log \text{ of dilution factor} \times [ 50\% \text{-mortality lower/ mortality upper- lower} ] \\ &= \log 4.0 + \{ \log 1.4 \times [ 50-0/100-0] \} \\ &= 0.602 + 0.07306 \\ \log LD_{50} &= 0.6751 \\ LD_{50} &= 4.73 \mu\text{g/mouse} \end{aligned}$$

## 1.2 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของส่วนย่อยสุดท้ายที่บริสุทธิ์ของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อคอระบบสำคัญของร่างกาย

1) นำสารประกอบที่แยกได้จากพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูเมาส์ ซึ่งได้จากการศึกษาในโครงการที่ 2 มาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปในสุนัข เป็นการศึกษาแบบ in vivo

**สัตว์ทดลองที่ใช้** สุนัขพันธุ์ทางเพศผู้ (Male Mongrel Dog) หนัก 10-12 kg จากสำนักควบคุมสุนัข กรุงเทพมหานคร เนื่องจากยังไม่สามารถหาแหล่งเพาะพันธุ์สุนัขที่มีจุดประสงค์เพื่อใช้ในการทดลอง ส่วนใหญ่มีการเพาะสุนัขเพื่อเป็นสัตว์เลี้ยงซึ่งมีราคาแพงมาก การศึกษาผลของสารทดสอบในสัตว์ที่ตอบสนองใกล้เคียงมนุษย์ยังมีความจำเป็นและมีข้อกำหนดในการพัฒนาฯ ในขั้นต้นก่อน

**วิธีการทดลอง** การทดลองในสุนัขพันธุ์ทางที่วางยาสลบด้วยการฉีด Pentobarbital sodium ขนาด 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เข้าทางหลอดเลือดดำ และระหว่างการทดลองจะให้ Pentobarbital sodium ปริมาณพอเหมาะเพื่อรักษาระดับการสลบของสุนัข วิธีการวางยาสลบและผ่าตัดเตรียมสุนัขก่อนการทดลองมีดังนี้

- 1) งดอาหารที่ให้สุนัขอย่างน้อย 8 ชั่วโมงก่อนการทดลอง
- 2) ในวันทดลอง ชั่งน้ำหนักสุนัข คำนวณปริมาตร 6 % pentobarbital sodium sterile solution ที่ต้องใช้ในขนาด 30 mg/Kg body weight
- 3) ใช้อุปกรณ์ฉีดยาที่ปราศจากเชื้อ ดูดยาตามปริมาตรที่ต้องการ ฉีดเข้า femoral vein อย่างช้าๆ สังเกตที่ตา (corneal reflex) และการคลายตัวของกล้ามเนื้อ และไม่ตอบสนองต่อความเจ็บปวด
- 4) เปิดผิวหนังบริเวณคอเพื่อหา carotid artery แล้วใส่ catheter cannula ซึ่งต่อกับเครื่องส่งสัญญาณ เพื่อบันทึกความดันเลือด และการเต้นของหัวใจ
- 5) เปิดผิวหนังบริเวณขาหลัง เพื่อหาหลอดเลือด femoral vein แล้วใส่ catheter cannula เพื่อให้ sterile normal saline (0.9 % solution) ผสม inulin และ para-aminohippuric acid (PAH) infuse อย่างต่อเนื่องสำหรับประเมินค่าการทำหน้าที่ของไต ได้แก่ glomerular filtration rate, renal blood flow, renal plasma flow, และค่าอื่นๆ การให้สารทดสอบจะฉีดเข้าหลอดเลือดดำ femoral vein จะให้ผ่านทาง catheter cannula และการเก็บตัวอย่างเลือดจะเก็บจาก femoral vein ผ่านทาง catheter cannula เช่นกัน
- 6) เปิดผิวหนังบริเวณหลอดลม เพื่อหาหลอดลม แล้วใส่ catheter เข้าหลอดลม เพื่อให้ทางเดินอากาศหายใจสะดวก
- 7) ใส่สายสวนเข้าท่อปัสสาวะจนถึงถุงปัสสาวะ (urinary bladder) เพื่อดูอัตราการขับ

ปัสสาวะ และเก็บตัวอย่างปัสสาวะสำหรับวิเคราะห์

ทำการศึกษาผลของพิษงูจงอางก่อน โดยศึกษาพิษงูจงอาง 3 ขนาด และศึกษาส่วนที่แยกได้จากพิษงูจงอาง 3 ขนาด ต่อการเดินของหัวใจ ความดันเลือด ผลต่อการหายใจ การทำงานของไต ผลต่อองค์ประกอบในเลือด (N = 3 x 4 groups)

ผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปในสุนัข

ความเข้มข้นพิษงู	เวลาที่เก็บเลือด	Na <sup>+</sup> (mEq/L)			K <sup>+</sup> (mEq/L)			Cl <sup>-</sup> (mEq/L)		
		N1	N2	Mean	N1	N2	Mean	N1	N2	Mean
0.05 mg/kg	0 นาที	151.0	143.0	147.0	4.2	4.9	4.6	117.0	111.0	114.0
	15 นาที	147.0	142.0	144.5	5.4	5.5	5.5	118.0	111.0	114.5
	30 นาที	150.0	142.0	146.0	5.0	5.3	5.2	119.0	113.0	116.0
	1 ชม.	152.0	146.0	149.0	5.0	5.2	5.1	120.0	117.0	118.5
	3 ชม.	157.0	147.0	152.0	4.6	5.6	5.1	125.0	116.0	120.5
	6 ชม.	156.0	146.0	151.0	4.9	5.2	5.1	125.0	116.0	120.5
0.1 mg/kg	0 นาที	149.0	125.0	137.0	4.5	0.0	4.5	118.0	132.0	125.0
	15 นาที	151.0	0.0	151.0	5.7	0.0	5.7	118.0	0.0	118.0
	30 นาที	142.0	140.0	141.0	4.7	5.9	5.3	118.0	109.0	113.5
	1 ชม.	153.0	140.0	146.5	4.8	5.9	5.4	124.0	112.0	118.0
	3 ชม.	153.0	0.0	153.0	5.4	0.0	5.4	123.0	0.0	123.0
	6 ชม.	0.0	148.0	148.0	0.0	4.9	4.9	0.0	116.0	116.0
0.2 mg/kg	0 นาที	148.0	151.0	149.5	4.7	4.8	4.8	113.0	121.0	117.0
	15 นาที	0.0	154.0	154.0	0.0	5.2	5.2	0.0	129.0	129.0
	30 นาที	0.0	152.0	152.0	0.0	5.0	5.0	0.0	125.0	125.0
	1 ชม.	142.0	155.0	148.5	4.7	4.9	4.8	114.0	126.0	120.0
	3 ชม.	152.0	162.0	157.0	4.7	4.7	4.7	117.0	128.0	122.5
	6 ชม.	149.0	0.0	149.0	4.6	0.0	4.6	112.0	0.0	112.0
	12 ชม.	152.0	0.0	152.0	5.1	0.0	5.1	117.0	0.0	117.0

ความเข้มข้น พิษ	เวลาที่ เก็บเลือด	% Differential Blood Count																	
		Neutrophil			Band			Eosinophil			Basophil			Lymphocyte			Monocyte		
		N1	N2	MEAN	N1	N2	MEAN	N1	N2	MEAN	N1	N2	MEAN	N1	N2	MEAN	N1	N2	MEAN
0.05mg/kg	0 นาที	83	76	79.5	1	0	0.5	11	2	6.5	0	0	0.0	5	21	13.0	0	1	6.5
	15 นาที	74	58	66.0	2	3	2.5	10	4	7.0	0	0	0.0	14	32	23.0	0	3	11.5
	30 นาที	86	65	75.5	4	9	6.5	4	0	2.0	0	0	0.0	6	25	15.5	0	1	7.8
	1 ชม.	79	61	70.0	10	10	10.0	2	4	3.0	0	0	0.0	9	22	15.5	0	3	7.8
	3 ชม.	70	60	65.0	6	10	8.0	5	5	5.0	0	0	0.0	18	20	19.0	1	5	10.0
	6 ชม.	79	71	75.0	7	20	13.5	2	0	1.0	0	0	0.0	12	7	9.5	0	2	4.8
0.1mg/kg	0 นาที	73		73.0	0		0.0	13		13.0	0		0.0	13		13.0	1		7.0
	30 นาที	82		82.0	2		2.0	8		8.0	0		0.0	7		7.0	1		4.0
	1 ชม.	69		69.0	5		5.0	12		12.0	0		0.0	14		14.0	0		7.0
	3 ชม.	83		83.0	4		4.0	7		7.0	0		0.0	6		6.0	0		3.0
	6 ชม.	82		82.0	8		8.0	3		3.0	0		0.0	7		7.0	0		3.5
0.2mg/kg	0 นาที	69	33	51.0	17	0	8.5	3	24	13.5	0	0	0.0	11	42	26.5	0	1	13.3
	15 นาที		64	64.0		1	1.0		13	13.0		0	0.0		22	22.0		0	22.0
	30 นาที	66	69	67.5	10	7	8.5	2	2	2.0	0	0	0.0	21	28	24.5	1	0	12.8
	1 ชม.	72	58	65.0	9	14	11.5	0	5	2.5	0	0	0.0	18	22	20.0	1	1	10.5
	3 ชม.	65	63	64.0	23	19	21.0	0	2	1.0	0	0	0.0	12	16	14.0	0	0	7.0
	6 ชม.		58	58.0		32	32.0		1	1.0		0	0.0		7	7.0		2	7.0
	12 ชม.		73	73.0		22	22.0		0	0.0		0	0.0		4	4.0		1	4.0

วันที่	dose	อัตราการเต้นของหัวใจ (HR:bpm)					
		0 นาที	15 นาที	30 นาที	1 ชม.	3 ชม.	6 ชม.
Dog 1	0.05 mg/kg	49.2	48.4	42.9	54.4	166.7	150.0
Dog 2		41.4	54.4	107.0	93.8	115.4	107.0
Dog 1	0.1 mg/kg	100.0	93.8	115.4	136.0	167.0	187.5
Dog 2		42.8	93.8	93.8	107.1	167.0	187.5
Dog 1	0.2 mg/kg	115.4	150.0	250.0	214.0	125.0	
Dog 2		100.0	88.2	88.2	115.4	150.0	187.5
Dog 3		69.8	75.0	81.1	107.1	100.0	

วันที่ ทดลอง	DOSE	Mean Arterial Pressure (mmHg)					
		0 นาที	15 นาที	30 นาที	1 ชม.	3 ชม.	6 ชม.
Dog 1	0.05 mg/kg	101.7	105.7	56.7	50.0	55.0	101.7
Dog 2		186.7	185.0	155.0	145.0	160.0	173.3
Dog 1	0.1 mg/kg	104.0	55.3	82.7	78.0	108.0	80.0
Dog 2		113.3	136.7	108.3	46.7	53.8	76.7
Dog 1	0.2 mg/kg	148.3	46.7	43.3	80.0	116.7	-
Dog 2		96.7	56.7	68.3	65.0	80.0	106.7
Dog 3		108.3	78.3	66.7	52.0	96.7	-

### 3. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

- 3.1 ศึกษาฤทธิ์อื่นๆ ทางเภสัชวิทยาของส่วนย่อยสุดท้ายที่บริสุทธิ์ของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อต่อระบบสำคัญของร่างกายในสุนัข และสัตว์ทดลองอื่น ทั้ง *in vivo* และ *in vitro* studies
- 3.2 ศึกษาพิษวิทยาของส่วนย่อยสุดท้ายที่บริสุทธิ์ของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ได้แก่ single dose toxicity, repeated-dose toxicity และ mutagenicity

#### 4. อุปสรรคในการดำเนินงานและแนวทางแก้ไข

ส่วนย่อยสุดท้ายที่บริสุทธ์ของพันธูจงองางที่มีฤทธิชัยยังปลายประสาทที่ค้อกับกล้านเนื้อที่จจะ  
ใช้ในโครงการวิจัยนี้ จะต้องมีปริมาณมาก ซึ่งต้องรอกการแยกพันธูจงองางในโครงการวิจัยที่ 2 อาจทำ  
ให้ความก้าวหน้าของการดำเนินงานวิจัยด้านเภสัชวิทยา และพิษวิทยาล่าช้า แนวทางการแก้ไขคือใน  
โครงการวิจัยที่ 2 ต้องเพิ่มความสามารถในการแยกพันธูจงองางโดยเพิ่มชุดอุปกรณ์การแยก

(รองศาสตราจารย์โสภิต ธรรมอารี)

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 4

วันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2550



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## โครงการที่ 5

การทำโคลนนิ่งสารประกอบของ  
พืชมัจฉางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาท  
ที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สัญญาเลขที่ GBR\_12\_50\_30\_10

รายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงาน

โครงการที่ 5

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

(ภาษาอังกฤษ) CLONING OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING KOBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)

รายงานช่วงระยะตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2550 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2550  
(ระยะเวลาดำเนินการทั้งโครงการ 1 ปี 6 เดือน ดำเนินการมาแล้ว 6 เดือน)

ชื่อหัวหน้าโครงการ

รศ.ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์

หน่วยงาน

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การดำเนินงาน :

ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ

ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

1.1 เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่จะใช้ดำเนินงาน

1.2 ทำการสกัด mRNA จากค่อมพิษงูจงอาง โดยใช้ Oligotex Direct mRNA Micro kits

(12) ของ QIAGEN

2. สรุปผลการดำเนินงาน ได้ mRNA ที่จะใช้ทำ RT-PCR พร้อมในการดำเนินการทดลองในขั้นต่อไป

3. การดำเนินงานช่วงต่อไป เมื่อได้ผลการวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทต่อกับกล้ามเนื้อจากงูจงอาง (โครงการที่ 3) จะทำการออกแบบและสังเคราะห์ degenerated primers ที่จำเพาะต่อสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อจากงูจงอาง จากนั้นทำ RT-PCR เพื่อให้ได้ cDNA แล้วตรวจสอบความถูกต้องโดยการทำ DNA sequencing เพื่อ

หาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมที่ถูกต้องก่อนนำไปต่อเข้ากับ vector และนำไปเพิ่มจำนวน และแสดงออกใน *E.coli* ต่อไป

4. อุปสรรคในการดำเนินงานและแนวทางแก้ไข เนื่องจากโครงการที่ 5 จะต้องรอผลที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนในโครงการที่ 3 เพื่อนำมาใช้ในการออกแบบ degenerated primers จึงทำให้การเริ่มโครงการที่ 5 ล่าช้ากว่ากำหนด

(รองศาสตราจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์)

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 5

วันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2550

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## โครงการที่ 6

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ  
พิษงูจงอางที่แยกส่วนเพื่อหาส่วนที่มี  
ศักยภาพเป็นประ โยชน์ทางการรักษา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญาเลขที่ GBR\_12\_50\_30\_10

การรายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงาน  
โครงการที่ 6

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่แยกส่วนเพื่อหาส่วนที่มี  
ศักยภาพเป็นประโยชน์ทางการรักษา

(ภาษาอังกฤษ) STUDIES OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF  
FRACTIONATED VENOM OF KING KOBRA (*OPHIOPHAGUS  
HANNAH*) FOR POTENTIAL THERAPEUTIC AGENTS

รายงานช่วงระยะตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2548 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2550  
(โครงการวิจัยเสร็จสมบูรณ์)

ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ.โสภิต ธรรมอารี

หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การดำเนินงาน :

- ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ  
 ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

1.1 นำพิษงูที่แยกได้จากโครงการย่อยที่ 2 ในการแยกครั้งที่ 1 จำนวน 7 ส่วนย่อย (F1 – F7) มา  
ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมี ดังนี้

- 1) ปริมาณโปรตีน (Protein content) โดยวิธีของ Bradford
- 2) ศึกษา Enzyme activities
  - 2.1) Proteolytic activity ตามวิธีของ Kunitz
  - 2.2) Phosphodiesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan
  - 2.3) Phosphomonoesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan
  - 2.4) Phospholipase A activity ตามวิธีของ Tan และ Tan
  - 2.5) L-Amino acid oxidase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan
  - 2.6) Acetylcholinesterase activity Ellman และ คณะ

นำค่า Enzyme activity ที่หาได้จากการทดสอบไปคำนวณหาค่า enzyme activity ต่อ 1 มก. โปรตีนของพืช เตรียมสารละลายพืชที่แยกส่วนแล้วให้มีความเข้มข้น 0.4 มก/มล โดยประมาณ โดยใช้ค่า Optical density ของแต่ละส่วนเป็นเกณฑ์ จากนั้นนำไปศึกษาปริมาณโปรตีน และ enzyme activities

## 1.2 ศึกษาฤทธิ์ต่อ cancer cells

### 1) การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford

#### สารเคมีที่ใช้

1. Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD) รุ่น 210001208 ประกอบด้วยชุด Bovine Serum Albumin Standard ความเข้มข้น 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 มก/มล
2. 5xDye Reagent (BIO-RAD) รุ่น 210000258
3. Bovine serum albumin (Sigma® Lot. 80K1365)

เครื่องมือ DU 650 Spectrophotometer Beckman Coulter, USA

Blank น้ำเกลือ 0.9 %

#### วิธีทดสอบ

1. ปิเปตต์ standard และ ตัวอย่างพืชแต่ละความเข้มข้น 20 มคลใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมน้ำ dye reagent 1 มล ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน
3. บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที (ไม่ควรบ่มตัวอย่างทดสอบที่อุณหภูมิห้องนานเกิน 1 ชม)
4. ปิเปตต์ standard และ ตัวอย่างพืช 300 มคล ลงในเพลทนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ใช้ น้ำเกลือ 0.9 % เป็น blank ทำซ้ำ 2 ครั้ง หาค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างทดสอบ
5. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของ standard ไป plot กราฟ
6. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของตัวอย่างไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนจาก slope ของ standard

$$\text{ปริมาณโปรตีนของตัวอย่าง (มก/มล)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของตัวอย่าง} - 0.0424}{0.7743}$$

### 2) ศึกษา Enzyme activities

#### 2.1) การศึกษา Proteolytic activity ตามวิธีของ Kunitz

#### สารเคมีที่ใช้

1. Monobasic sodium phosphate monohydrate (Merck Lot. A619046502)

2. Anhydrous dibasic sodium phosphate (Merck Lot. 1359986507)
3. Casein (Sigma Lot. 127F-0545)
4. Trichloroacetic acid (Fisher Scientific Lot. 0579621)

เครื่องมือ DU 650 Spectrophotometer Beckman Coulter, USA

การเตรียมสารละลาย

เตรียม 1% casein ใน 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 7.75

วิธีทดสอบ

1. เติมสารละลายพิชง 0.1 มล ใน 2 มล ของ 1% casein ใน 0.25 M sodium phosphate buffer pH 7.75 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที
2. เติม 5% trichloroacetic acid 2 มล
3. บั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
4. นำ Supernatant ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหาค่า proteolytic activity ของตัวอย่าง

จากนิยามว่า 1 U protease activity = ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 1 หน่วยในเวลา 1 ชม

เนื่องจากการทดสอบบ่มตัวอย่างทดสอบไว้ 30 นาทีดังนั้น

Proteolytic activity ของตัวอย่าง = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ x 2

- 2.2) การศึกษา Phosphodiesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan

สารเคมีที่ใช้

1. bis-p-nitrophenylphosphate Sodium salt (Koch Light Lab Ltd. Lot. 4287-00)
2. Magnesium sulfate (Merck Lot. 549A8248)
3. Sodium diethylbarbiturate (Riedel® Lot. OE70149)

**เครื่องมือ** DU 650 Spectrophotometer Beckman Coulter, USA

**สารละลายที่ใช้**

1. 2.5 mM bis-*p*-nitrophenylphosphate Na salt
2. 0.01 M MgSO<sub>4</sub>
3. 0.17 M veronal buffer, pH 9.0

**วิธีทดสอบ**

1. เติมสารละลายพิชง 0.05 มล ในสารละลายผสมของ 0.25 มล 2.5 mM bis-*p*-nitrophenylphosphate Na salt, 0.15 มล 0.01 M MgSO<sub>4</sub> และ 0.25 มล 0.17 M veronal buffer, pH 9.0
2. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm 3 นาที แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง
3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มา plot กราฟเพื่อหาอัตราการดูดกลืนแสงต่อนาที หาอัตราเฉลี่ยการดูดกลืนแสงต่อนาที
4. นำอัตราเฉลี่ยการดูดกลืนแสงต่อนาทีมาคำนวณหา phosphodiesterase activity จากนิยามว่า

1 U Phosphodiesterase activity = อัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยต่อนาที  
ดังนั้น

$$\text{Phosphomonoesterase activity ของตัวอย่าง (unit)} = \frac{\text{อัตราการดูดกลืนแสงต่อนาที}}{0.001}$$

2.3) การศึกษา Phosphomonoesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan

**สารเคมีที่ใช้**

1. Glycine (Sigma Lot. 064K0058)
2. *p*-nitrophenylphosphate, Disodium salt (Nacalai tesque Lot. M5A7272)

3. Sodium hydroxide (Merck Lot. 8586818)
4. Magnesium sulfate (Merck Lot. 549A82486)

เครื่องมือ DU 650 Spectrophotometer Beckman Coulter, USA

สารละลายที่ใช้

1. 0.01 M p-nitrophenylphosphate Disodium salt
2. 0.01 M MgSO<sub>4</sub>
3. 0.5 M glycine buffer, pH 8.5

วิธีทดสอบ

1. เติม สารละลายพิษงู 0.05 มล ในสารละลายผสมของ 0.25 มล 0.5 M glycine buffer pH 8.5, 0.25 มล 0.01 M p-nitrophenylphosphate Disodium salt และ 0.15 มล 0.01 M MgSO<sub>4</sub>
2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที
3. เติม 0.2 N Na OH 1 มล ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที
4. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง หาค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
5. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมาหา phosphomonoesterase activity จากนิยามว่า  

$$1 \text{ U phosphomonoesterase} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น}}{0.001 \text{ หน่วยต่อนาที}}$$
 (ที่ความยาวคลื่น 440 nm)

เนื่องจากการทดสอบบ่มตัวอย่างไว้ 30 นาที ดังนั้น

$$\text{Phosphomonoesterase activity ของตัวอย่าง} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น}}{0.001 \times 30}$$

2.4) การศึกษา Phospholipase A activity ตามวิธีของ Tan และ Tan



### สารเคมีที่ใช้

1. CaCl<sub>2</sub> (Sigma® Lot. 86F-0677)
2. Deoxycholic acid, Sodium salt (Sigma® Lot. 74H0267, MW. 414.6)
3. NaOH (Merck Lot.8586818)
4. Phospholipase A<sub>2</sub> from porcine pancreas (Sigma Lot. 045K0961; Enzyme activity 11,634 Lecitase units/ml)

**เครื่องมือ** PHM 290 : pH-Stat controller (Radiometer analytical™) ความจุ burette 2 มล  
การเตรียม Substrate ไข่แดง 1 ส่วน 18 mM CaCl<sub>2</sub> 1 ส่วน และ 8.1 mM deoxycholic acid 1 ส่วน บั่นแยกตะกอนที่ 4°C ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที 20 นาที ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 1 N NaOH

### สารละลายที่ใช้

1. Titrant 0.02 N NaOH
2. Standard เตรียม standard enzyme ให้มี enzyme activity 116.34 หน่วย Lecitase/มล (1:100)

### วิธีทดสอบ

1. ปิเปตต์ substrate 15 มล ใส่ในบีกเกอร์ วางบน magnetic stirrer
2. จุ่ม pH probe ลงในตัวอย่าง ปิดฝาบีกเกอร์ ปรับ pH ก่อน titrate ให้ได้  $8.0 \pm 0.01$  ด้วย 0.02 N NaOH
3. เปิดก๊าซไนโตรเจน เต็ม standard enzyme หรือ สารละลายพิษงู 0.1 มล ใน substrate ไตเตรทด้วย Mode pH-stat titration (ที่ pH 8.0) ตั้งเวลาไตเตรท 3 นาที บันทึกปริมาตร 0.02 N NaOH ที่ใช้ไตเตรทแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยของปริมาตร 0.02 N NaOH ที่ใช้
4. คำนวณหา phospholipase A<sub>2</sub> activity ของตัวอย่างจากปริมาตรเฉลี่ย 0.02 N NaOH ที่ใช้ ไตเตรทตัวอย่างเทียบกับปริมาตรเฉลี่ย 0.02 N NaOH ที่ใช้ไตเตรท standard enzyme ที่มี enzyme activity 116.34 หน่วย/มล จากสูตร  
phospholipase A<sub>2</sub> activity ของตัวอย่าง  
$$= \frac{\text{ปริมาตร 0.02 N NaOH ที่ใช้ไตเตรท ตัวอย่าง} \times \text{enzyme activity ของ standard enzyme}}{\text{ปริมาตร 0.02 N NaOH ที่ใช้ไตเตรท standard enzyme}}$$

2.5) การศึกษา L-Amino acid oxidase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan

### สารเคมีที่ใช้

1. Triethanolamine (Sigma® Lot.107F5613)
2. peroxidase (Sigma® Lot.26H9512)
3. L-leucine (Sigma® Lot. 034K0080)
4. o-dianisidine (Sigma ® Lot. 054K8204)

**เครื่องมือ** DU 650 Spectrophotometer Beckman Coulter, USA

**สารละลายที่ใช้**

1. 0.007 % peroxidase
2. 0.2 M Triethanolamine buffer, pH 7.6 ที่มี 0.1 %L-leucine and 0.0065% o-dianisidine
3. 0.5 M glycine buffer, pH 8.5

**วิธีทดสอบ**

1. เติม 0.025 มล 0.007 % peroxidase ใน 0.5 มล 0.2 M Triethanolamine buffer, pH 7.6 ที่มี 0.1 %L-leucine and 0.0065 % o-dianisidine บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
2. เติม สารละลายพิษงู 0.05 มล
3. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 426 nm 3 นาทีแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มา plot กราฟเพื่อหาอัตราการดูดกลืนแสงต่อนาที หาอัตราเฉลี่ยการดูดกลืนแสงต่อนาที
5. นำอัตราเฉลี่ยการดูดกลืนแสงต่อนาทีมาคำนวณหา L-Amino acid oxidase activity

จากนิยามว่า

1U L-Amino acid oxidase activity = อัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยต่อนาที

ดังนั้น

$$\text{L-Amino acid oxidase activity ของตัวอย่าง (unit)} = \frac{\text{อัตราการดูดกลืนแสงต่อนาที}}{0.001}$$

## 2.6) การศึกษา Acetylcholinesterase activity Ellman และ คณะ

### สารเคมีที่ใช้

1. Acetylthiocholine iodide (Sigma® Lot.094K1598)
2. Dithionitrobenzoate (Sigma® Lot.38H0916)

**เครื่องมือ** DU 650 Spectrophotometer Beckman Coulter, USA

### สารละลายที่ใช้

1. Buffer 0.1 M Phosphate pH 8.0.
2. Substrate 0.075 M Acetylthiocholine iodide (21.67 mg/ml) เก็บในตู้เย็นไว้ใช้ได้ 10-15 วัน
3. Reagent 0.01 M Dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) ละลาย 5 : 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 39.6 มก. ใน 0.1M phosphate buffer pH 7.0, 10 มล.  
แล้วเติม sodium bicarbonate 15 มก.

### วิธีทดสอบ

1. เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.1 มล. ลงใน cuvette ที่มี 0.1M phosphate buffer (pH 8.0) 1.3 มล.
2. เติม DTNB reagent 50 มคล (µl) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm เมื่อค่าการดูดกลืนแสงคงที่ เปิดฝา photocell เพื่อให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ถูกตัดเป็นศูนย์
3. เติม substrate (acetylthiocholine iodide, 0.075 M) 10 มคล (µl) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นใน 6 นาที
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มา plot กราฟเพื่อหาอัตราการดูดกลืนแสงต่อนาที
5. นำอัตราการดูดกลืนแสงต่อนาทีมาคำนวณหา acetylcholinesterase activity จากสูตร

$$R = \frac{\Delta A}{1.36 (10^4)} \times \frac{1}{(V_1/V_2) C_0}$$

เมื่อ R = rate, หน่วยเป็น mole/นาที/กรัม ( moles ของ substrate ที่ถูกตัวอย่าง 1 กรัม hydrolyze ใน 1 นาที)

$\Delta A$  = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่เพิ่มขึ้นต่อนาที

$V_1$  = ปริมาตรตัวอย่าง

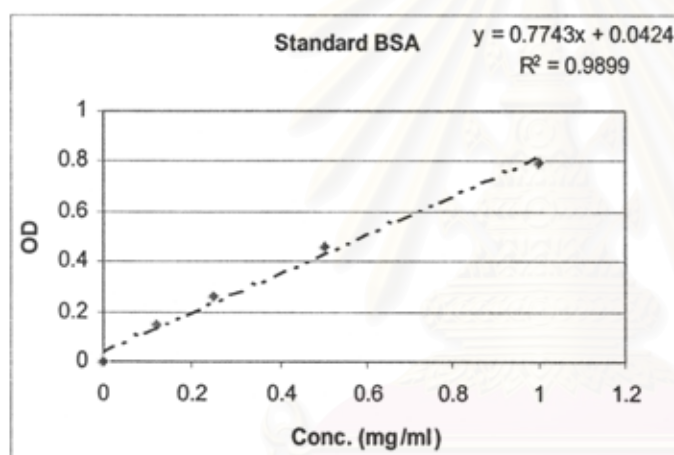
$V_2$  = ปริมาตรรวมของสารละลายทั้งหมด

$C_0$  = ความเข้มข้นตั้งต้นของตัวอย่าง (มก/มล)

ผลการศึกษา

1) การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford

	Standard Concentration ( mg/ml)				
	0	0.125	0.250	0.500	1.000
Standard 1	0.388	0.535	0.656	0.835	1.221
Standard 2	0.399	0.549	0.66	0.863	1.157
Average OD	0.3935	0.542	0.658	0.849	1.189
Net OD	0	0.1485	0.2645	0.4555	0.7955



Fraction	OD 1	OD 2	OD 3	Average	Conc.(mg/ml) (Std.BSA)
1	0.6210	0.6490	0.6350	0.6350	0.77
2	0.4470	0.4570	0.4690	0.4577	0.54
3	0.5470	0.5660	0.5610	0.5580	0.67
4	0.6080	0.6330	0.6290	0.6233	0.75
5	0.5740	0.5930	0.6030	0.5900	0.71
6	0.5350	0.5490	0.5530	0.5457	0.65
7	0.5410	0.5650	0.5660	0.5573	0.67
Crude	0.8000	0.8450	-	0.8225	1.01

2) การศึกษา Enzyme activities

2.1) Proteolytic activity ตามวิธีของ Kunitz

Fraction No.	Tube No.	OD	Vol ml	Δ Absorbance (30min)			Average Δ Absorbance (30min)	Average Δ Absorbance (30min)	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity (unit/mg protein)
1	25-39	0.9196	45	0.0134	0.0142	0.0143	0.0140	0.0279	0.77	0.3628
2	43-50	0.4337	24	0.0164	0.0168	0.0189	0.0174	0.0347	0.54	0.6432
3	75-85	0.3650	33	0.0103	0.0117	0.0105	0.0108	0.0217	0.67	0.3234
4	88-98	0.3854	33	0.0605	0.0602	0.0619	0.0609	0.1217	0.75	1.6231
5	99-109	0.3853	33	0.0108	0.0109	0.0104	0.0107	0.0214	0.71	0.3014
6	112-120	0.1628	27	0.0223	0.0228	0.0215	0.0222	0.0444	0.65	0.6831
7	125-140	0.147	48	0.0103	0.0108	0.0111	0.0107	0.0215	0.67	0.3204
Crude	-	-	-	0.0733	0.0730	0.0726	0.0730	0.1459	1.01	1.4449

\* One unit of enzyme activity was defined as the increase of 1 absorbance unit per hour. (Kunitz 1947)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2) Phosphodiesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan

Fraction No.	Tube no.	OD	Vol ml	$\Delta$ Absorbance		Average	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity (unit/mg protein)
						$\Delta$ Absorbance		
1	25-39	0.9196	45	-		-	-	-
2	43-50	0.4337	24	0.0007	0.0009	0.0008	0.54	29.63
3	75-85	0.3650	33	0.0060	0.0063	0.0062	0.67	183.58
4	88-98	0.3854	33	0.0015	0.0014	0.0015	0.75	38.67
5	99-109	0.3853	33	0.0020	0.0018	0.0019	0.71	53.52
6	112-120	0.1628	27	0.0008	0.0010	0.0009	0.65	27.69
7	125-140	0.147	48	-	-	-	-	-
Crude				0.0119	0.0118	0.0119	1.01	234.65

\* One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that caused the increase of 0.001 absorbance unit per minute. (Tan and Tan1988)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3. Phosphomonoesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan

Fraction No.	Tube No.	OD	Vol ml	Δ Absorbance			Average ΔAbsorbance 30min	Average Δ Absorbance min	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity (unit/mg protein)
1	25-39	0.9196	45	0.0186	0.0190	0.0162	0.0179	0.0006	0.77	15.53
2	43-50	0.4337	24	0.0132	0.0188	0.0226	0.0182	0.0006	0.54	22.47
3	75-85	0.3650	33	0.0165	0.0167	0.0193	0.0175	0.0006	0.67	17.41
4	88-98	0.3854	33	0.1647	0.1655	0.1701	0.1668	0.0056	0.75	148.24
5	99-109	0.3853	33	0.3267	0.3200	0.3280	0.3249	0.0108	0.71	305.07
6	112-120	0.1628	27	0.0631	0.0670	0.0688	0.0663	0.0022	0.65	68.00
7	125-140	0.147	48	0.0229	0.0232	0.0248	0.0236	0.0008	0.67	23.52
Crude				0.2833	0.2862	0.2691	0.2795	0.0093	1.01	184.51

\* One unit of enzyme activity was defined as the increase of 0.001 absorbance unit per minute. (Tan and Tan 1988)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4. Phospholipase A activity ตามวิธีของ Tan และ Tan

Fraction No.	Tube No.	OD	Vol ml	Sample vol. ( $\mu$ )	Titrant consumed (ml)		Average Titrant Consumed (ml)	Protein mg/ml (BSA equ.)	Enzyme Activity (L.unit/mg protein)
					Exp.1	Exp. 2			
1	25-39	0.9196	45	100	0.142	0.124	0.1330	0.77	43.64
2	43-50	0.4337	24	100	0.072	0.077	0.0745	0.54	34.85
3	75-85	0.3650	33	100	0.377	0.363	0.3700	0.67	139.52
4	88-98	0.3854	33	100	0.546	0.522	0.5340	0.75	179.88
5	99-109	0.3853	33	100	0.170	0.176	0.1730	0.71	61.56
6	112-120	0.1628	27	100	0.203	0.193	0.1980	0.65	76.96
7	125-140	0.147	48	100	0.838	0.968	0.9030	0.67	1702.48
Crude	-	-	-	100	1.180	1.177	1.1785	1.01	294.79

Standard : 1:100 dilution = 116.34 Lecitase unit/ml

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



2.5. L-Amino acid oxidase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan

Fraction No.	Tube No.	OD	Vol ml	Δ Absorbance		Average Δ Absorbance	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity (unit/mg protein)
1	25-39	0.9196	45	0.0025	0.0035	0.0030	0.77	77.92
2	43-50	0.4337	24	-	-	-	-	-
3	75-85	0.3650	33	-	-	-	-	-
4	88-98	0.3854	33	0.0216	0.0194	0.0205	0.75	546.67
5	99-109	0.3853	33	0.1272	0.1200	0.1236	0.71	13926.76
6	112-120	0.1628	27	-	-	-	-	-
7	125-140	0.147	48	-	-	-	-	-

\*One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that caused an increase of 0.001 absorbance unit per min. (Tan and Tan, 1988)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 Acetylcholinesterase activity ตามวิธีของ Ellman และ คณะ

Fraction No.	Tube No.	OD	Vol. ml	$\Delta$ Absorbance		Average	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity mmol/min/g
						$\Delta$ Absorbance		
1	25-39	0.9196	45	-	-	-	-	-
2	43-50	0.4337	24	-	-	-	-	-
3	75-85	0.3650	33	-	-	-	-	-
4	88-98	0.3854	33	0.0085	0.0090	0.0088	0.75	0.0125
5	99-109	0.3853	33	0.0947	0.0969	0.0958	0.71	0.1449
6	112-120	0.1628	27	0.2021	0.1990	0.2006	0.65	0.3312
7	125-140	0.147	48	0.0329	0.0344	0.0337	0.67	0.0539
Crude	-	-	-	0.2120	0.2077	0.2099	1.01	0.2230

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการศึกษาปริมาณโปรตีน และ enzyme activity

Fraction No.	Tube No.	Vol. ml	Protein mg/ml (BSA equi.)	Proteolytic Activity (unit)*	PDE Activity (unit)*	PME Activity (unit)*	PLA Activity (L. unit)**	LAO Activity (unit)*	AChE Activity (unit)*
1	25-39	45	0.77	0.3628	-	15.53	43.64	77.92	-
2	43-50	24	0.54	0.6432	29.63	22.47	34.85	-	-
3	75-85	33	0.67	0.3234	183.58	17.41	139.52	-	-
4	88-98	33	0.75	1.6231	38.67	148.24	179.88	546.67	0.0125
5	99-109	33	0.71	0.3014	53.52	305.07	61.56	13926.76	0.1449
6	112-120	27	0.65	0.6831	27.69	68.00	76.96	-	0.3312
7	125-140	48	0.67	0.3204	-	23.52	1702.48	-	0.0539
Crude	-	-	1.01	1.4449	234.65	184.51	294.79	2754.46	0.2230

PDE Phosphodiesterase

PME Phosphomonoesterase

PLA Phospholipase A

LAO L-Amino acid oxidase

AChE Acetylcholinesterase

(unit)\* activity per mg. protein of venom fraction

(L. unit)\*\* Lecitase unit per mg. protein of venom fraction

จากการศึกษา enzyme activity พบว่าบาง enzyme activity พบในทั้ง 7 ส่วนของพิษงูที่แยกได้ เช่น proteolytic, phosphomonoesterase และ phospholipase activity ขณะที่บาง enzyme activity พบในบางส่วนของพิษงูที่แยกได้เท่านั้น อย่างไรก็ตามแต่ละส่วนมี enzyme activity เด่นที่ต่างกัน เช่น ส่วนที่ 3 มี phosphodiesterase activity เด่น ส่วนที่ 4 มี proteolytic activity เด่น ส่วนที่ 5 มี phosphomonoesterase และ L-amino acid oxidase activity เด่น ส่วนที่ 6 มี acetylcholine activity เด่น และ ส่วนที่ 7 มี phospholipase A activity เด่น การที่จะนำพิษงูส่วนที่แยกได้ส่วนใดไปศึกษาต่อขึ้นอยู่กับ enzyme activity ที่สนใจ

## 1.2 ศึกษาฤทธิ์ต่อ cancer cells

นำพิษงูที่แยกได้จากโครงการย่อยที่ 2 จำนวน 7 ส่วนย่อยมาศึกษา Cytotoxicity ต่อเซลล์มะเร็ง

### การเตรียมเซลล์

เลี้ยงเซลล์ Human Gastric carcinoma (KATO-III), Human Ductal carcinoma (BT 474), Human Colon adenocarcinoma (SW620), Human Liver hepatoblastoma (Hep-G<sub>2</sub>), Human Lung undifferentiated (Chago) ในอาหาร RPMI 1640 ที่ผสม fetal bovin serum 5 % บ่มที่ 37 °C 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นดูด media เดิม 0.05 % Trysin ที่มี 0.01% EDTA ปริมาตร 2 ml ตั้งทิ้งไว้จนเซลล์หลุด จึงดูด trypsin ทิ้งแล้วเติม media ใหม่ เคาะให้เซลล์หลุดเป็นเซลล์เดี่ยว

### การศึกษามลของพิษงูต่อการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (Cytotoxicity)

2.1 เตรียมเซลล์ข้างต้นให้เจือจางด้วย RPMI 1640 ได้ความเข้มข้น 2.5 x10<sup>4</sup> เซลล์/ml ปริมาตร 200 µl ใส่ใน plate 96 well แต่ละหลุม บ่มที่ 37 °C 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 เติมพิษงูที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 2 µl ต่อหลุม ทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.3 เติม MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 10 µl ต่อหลุม บ่มไว้ 4 ชั่วโมง ดูด media ทิ้ง (หลุม control ไม่เติม MTT)

2.4 เติม 100 % DMSO (dimethylsulfoxide) ปริมาตร 150 µl ต่อหลุม เขย่าบน plate mixer 5 นาที

2.5 เติม 0.1 M glycine pH 10.5 ปริมาตร 25 µl ต่อหลุม เขย่านาน 5 นาที

2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

## การคำนวณผล

$$\% \text{ cell survival} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD}_{540} \text{ ของ ตัวอย่าง} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ย OD}_{540} \text{ ของ Control}}$$

(Inhibit concentration 50 % (IC50))

## ผลการศึกษา

ผลของพิษงูจงอางทั้ง 7 fractions ต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ Human Gastric carcinoma (KATA III), Human Duetol carcinoma (BT 474), Human Colon adenocacinoma (SW620), Human Liver hepatablastoma (HEP-G<sub>2</sub>), Human Lung undifferentiated (Chago) พบว่า fraction ที่ 5 มีผลต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด รวมทั้ง CH-liver ซึ่งเป็นเซลล์ตับปกติของคน fraction ที่ 6 มีผลต่อเซลล์ HEP-G2 และ SW620 ที่ความเข้มข้น 1.51 และ 0.78 ตามลำดับ แต่มีผลต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นที่ความเข้มข้นสูงกว่า ส่วน fraction ที่ 3 และ 4 มีผลต่อเซลล์มะเร็งเพียงเล็กน้อย และ fraction ที่ 1, 2 และ 7 ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ไม่มีผลต่อเซลล์ใดๆ

## ตารางสรุปผล

Cells	IC <sub>50</sub> (µg/ml)							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	doxorubicin
KATO-III	>10	>10	>10	>10	0.68	9.49	>10	0.48
HEP-G2	>10	>10	6.78	8.24	0.66	1.51	>10	0.40
SW620	>10	>10	>10	7.38	0.49	0.78	>10	0.57
BT 474	>10	>10	7.61	8.11	0.77	9.87	>10	1.50
Chago	>10	>10	>10	6.74	0.74	7.15	>10	0.35
CH liver	>10	>10	7.60	>10	0.74	8.35	>10	1.00

จากการทดสอบผลต่อเซลล์มะเร็งสรุปว่า fraction ที่น่าสนใจทำการศึกษาคytotoxicity ต่อไป คือ fraction ที่ 5 และ 6 โดย fraction ที่ 5 ศึกษาผลต่อทุกเซลล์มะเร็ง และ fraction ที่ 6 ศึกษาเฉพาะผลต่อเซลล์ HEP-G2 และ SW620 เท่านั้น

### บรรณานุกรม

1. Bradford MM. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analyt. Biochem.*; 72: 248-54
2. Kunitz M. (1946) Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. II. General Properties. *J.Gen. Physiol.*; 30: 291-310
3. Tan NH. and Tan CS. (1988) A Comparative Study of Cobra (*Naja*) Venom Enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*; 90B,4: 745-50
4. Ellman GL., Courtney KD., Andres V.Jr. and Featherstone RM. (1961) A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95

### 3. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

โครงการวิจัยเสร็จสมบูรณ์

### 4. อุปสรรคในการดำเนินงานและแนวทางแก้ไข

ไม่มี



(รองศาสตราจารย์โสภิต ธรรมอารี)

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 6

วันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2550

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย