การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของสารกึ่งขวางช่องโซเดียม จากแบคทีเรียทะเล *Vibrio sp.*

นางสาววรรณิพา วิเวโก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-843-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17212170

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SODIUM CHANNEL BLOCKER(S) FROM A MARINE BACTERIUM *Vibrio sp.*

MISS WANNIPHA VIVEKO

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1996

ISBN 974-636-843-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียทะเล *Vibrio sp.*

โดย นางสาววรรณิพา วิเวโก

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.นิคม ชัยศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.นิคม ชัยศิริ)

.....กรรมการ
(ดร. ประสาท กิตตะคุปต์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วรรณิพา วิเวโก : การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียทะเล Vibrio sp. (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SODIUM CHANNEL BLOCKER(S) FROM A MARINE BACTERIUM Vibrio sp.) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.กาญจนา จันทองจีน , อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. นิคม ชัยศิริ , 106 หน้า . ISBN 974-636-843-5

การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากภายในเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทะเล Vibrio sp. สายพันธุ์ St-1-i มีความบริสุทธิ์ โดยเปรียบเทียบวิธีการ 2 แบบ คือแบบที่ 1 การใช้ผงถ่านกัมมันต์ดูดซับและคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 และแบบที่ 2 การใช้คอลัมน์ไบโอเจล พี 2 และคอลัมน์ซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี 25 พบว่าขั้นตอนต่างๆในวิธีการทั้งสองแบบมีส่วนทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์ขึ้นและสูญเสียสารพิษปริมาณเล็กน้อยในแต่ละขั้นตอน อย่างไรก็ดีอนุพันธ์สารพิษที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีสมบัติเหมือนกัน จึงได้รวมเทคนิคทั้งสองแบบเข้าด้วยกัน ในการทำให้สารพิษจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อมีความบริสุทธิ์ พบว่าสารพิษจากเซลล์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 40.1 เท่า ส่วนสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 51.6 เท่า จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสพบว่าสารพิษจากทั้งสองส่วนประกอบด้วยอนุพันธ์ GTx4 ค่าความเป็นพิษจำเพาะของสารพิษจากเซลล์เท่ากับ 0.3847 หน่วย ต่อมก. และความเป็นพิษจำเพาะของสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.6455 หน่วย ต่อมก. ในการทดสอบความเสถียรของสารโดยเทียบกับสารมาตรฐาน GTx4 พบว่าสารพิษจากแบคทีเรียสามารถทนความร้อน 100 °ซ เมื่อละลายอยู่ในสารละลายที่มีสถานะกรดด่างเท่ากับ 3 แต่จะสูญเสียสมบัติทันทีเมื่ออยู่ในสภาวะด่าง ความเสถียรของสารพิษจากแบคทีเรียต่ออุณหภูมิที่ 100 °ซ ในสภาวะกรดนี้เป็นสมบัติของสารในกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต วรรณิพา วิเวโก

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C726477 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: PURIFICATION / PARALYTIC SHELLFISH POISONS / Vibrio sp.

WANNIPHA VIVEKO : (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SODIUM CHANNEL BLOCKER(S) FROM A MARINE BACTERIUM Vibrio sp.) THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.KANCHANA JUNTONGJIN, Ph.D. , THESIS CO-ADVISOR : ASSO.PROF.NIKOM CHAISIRI , PH.D. 106 pp.
ISBN 974-636-843-5

Purification of sodium channel blocker(s) produced in cells and culture broth of marine bacterial Vibrio sp. was performed by using two selected systems. The first system included activated charcoal adsorption and Bio-Gel P-2 chromatography while the second one included Bio-Gel P-2 chromatography and CM-Sephadex C-25 chromatography. It was found that both purification systems increased toxin purity but a small amount of toxin was lost in each step. However the similar toxin derivatives were obtained. Using combination of the two systems to purify the bacterial toxins from cells and culture broth, purity of 40.1 and 51.6 times were obtained from the toxins in cells and the culture broth respectively. The result from electrophoresis showed that both toxins from cells and culture broth contained GTX4. The specific toxicity of toxin from cells was 0.3847 MU/mg and toxin from culture broth was 0.6455 MU/mg. To compare the stability of purified toxins with the standard GTX4. The toxins could retain the activity at 100°C when solubilized in strong acid (pH 3) for 3-4 hours but completely lost when solubilized in strong base. Stability of the isolated toxins at 100°C in acid solution is the characteristic of paralytic shellfish toxins.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงไปด้วยดีโดยความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจีน และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมรองศาสตราจารย์ ดร. นิคม ชัยศิริ ที่ได้ให้ความกรุณาให้คำแนะนำ แนวทางในการทำงานวิจัย ข้อคิดเห็น ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ ดร. ประสาท กิตตะคุปต์ ที่ได้กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบและให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้ง แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Professor Masaaki Kodama, Laboratory of Marine Biological Chemistry,School of Fisheries Sciences, Kitasato University,Sanriku,Japan. ที่ให้ความกรุณาช่วย เหลือในด้านการให้คำปรึกษาและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุน ในการวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาค วิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกในด้านต่างๆและมีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆและน้องๆที่ให้กำลังใจและมีส่วนช่วยเหลืองานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคนที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือและสนับสนุนในด้านต่างๆจนงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีและสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

เรื่อง หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญรูป.....ฌ

สัญลักษณ์และคำย่อ.....ฎ

บทที่

1. บทนำ.....1

2. วารสารปริทัศน์.....4

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....23

4. ผลการทดลอง.....37

5. อภิปรายผลการทดลอง.....77

6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....84

รายการอ้างอิง.....85

ภาคผนวก ก.....91

ภาคผนวก ข.....94

ภาคผนวก ค.....99

ประวัติผู้เขียน.....106

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน	7
2.	โครงสร้างสูตรโมเลกุลและความเป็นพิษจำเพาะของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอย	11
3.	สรุปขั้นตอนการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์ตามวิธีแบบที่ 1	41
4.	ผลการทำสารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โบโอเจล พี 2 (ตามแบบที่ 2)	44
5.	ผลการทำสารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซีเอ็มเซาเด็กซ์ ซี 25 (ตามแบบที่ 2)	48
6.	สรุปขั้นตอนการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์ตามวิธีแบบที่ 2	50
7.	สรุปขั้นตอนการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp สายพันธุ์ St-1-1 ให้บริสุทธิ์	60
8.	สรุปขั้นตอนการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ให้บริสุทธิ์	69
9.	การหาความเป็นพิษจำเพาะของสารมาตรฐาน GTX4	73
10.	เปรียบเทียบค่าความเป็นพิษจำเพาะของสารกีดขวางช่องโซเดียมจากภายในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารมาตรฐาน GTX4	73

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซิน	6
2.	โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์ซักซิทอกซิน	9
3.	โครงสร้างของช่องโซเดียมที่ถูกขัดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียม	12
4.	เปอร์เซนต์ของสารพิษที่สกัดได้จากการใช้ผงถ่านกัมมันต์ 2 ชนิด ในการดูดซับสารพิษในสารละลายความเข้มข้นต่างๆ	38
5.	การทำสารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 1)	40
6.	การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางโซเดียมจากคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 1) โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน	42
7.	การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางโซเดียมจากคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 1) โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย	43
8.	การทำสารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 2)	45
9.	การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางโซเดียมจากคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 2) โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน	46
10.	การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางโซเดียมจากคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 (วิธีแบบที่ 2) โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย	47
11.	การทำสารกีดขวางช่องโซเดียมให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (วิธีแบบที่ 2)	49
12.	การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางโซเดียมจากคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (วิธีแบบที่ 2) โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน	51
13.	การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางโซเดียมจากคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 (วิธีแบบที่ 2) โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย	52
14.	การทำสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอเจล พี 2	55

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

15. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางโซเดียมที่สกัดจากเซลล์ที่ผ่านคอลัมน์ไบโอเจลพี 2 โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน 56
16. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางโซเดียมที่สกัดจากเซลล์ที่ผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย 57
17. การทำสารกึดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากเซลล์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 59
18. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางโซเดียมที่สกัดจากเซลล์ที่ผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน 61
19. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางโซเดียมที่สกัดจากเซลล์ที่ผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย 62
20. การทำสารกึดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 64
21. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน 65
22. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย 66
23. การทำสารกึดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 68
24. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน 70
25. การวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกึดขวางโซเดียมที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 โดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสระบบสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย 71
26. ความเสถียรของสารกึดขวางช่องโซเดียมต่อสภาพความเป็นกรดด่าง 75
27. ความเสถียรของสารกึดขวางช่องโซเดียมต่ออุณหภูมิ 80 °C และ 100 °C 76

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
28. กราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตกับปริมาณเทโทรโดทอกซิน (ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบเอ็มทีที	99
29. ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง Neuro-2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า	100
30. ลักษณะผลึกเอ็มทีที - ฟอร์มาซาน	101
31. สารละลายผลึกเอ็มทีที - ฟอร์มาซาน หลังจากเติมสารละลาย isopropanol ที่มี 0.04 N HCl	102
32. กราฟแสดงค่า correlation coefficient ระหว่างเปอร์เซนต์การรอดชีวิตระหว่างวิธีนับเซลล์และวิธีเอ็มทีที	105

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

ชม. = ชั่วโมง

มก. = มิลลิกรัม

มม. = มิลลิเมตร

มล. = มิลลิลิตร

M = โมลาร์

mM = มิลลิโมลาร์

μM = ไมโครโมลาร์

μg = ไมโครกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย