



สัญญาเลขที่ GBR_12_50_30_10

รายงานฉบับสมบูรณ์แผนงานวิจัย (Research Program)

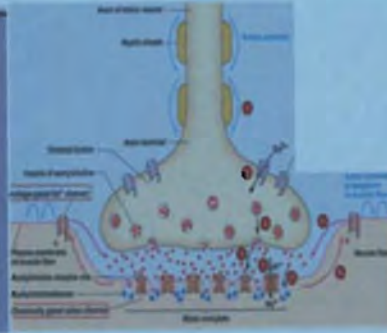
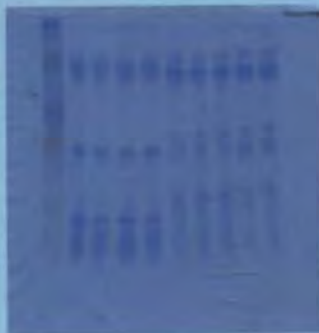
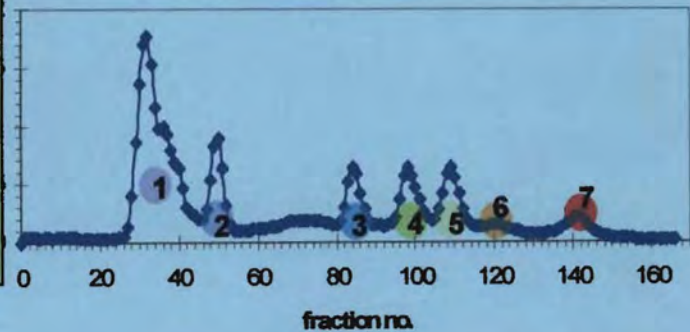
(รวมระยะเวลาทำวิจัยตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2548 ถึง 31 มีนาคม 2552)

แผนงานวิจัยเรื่อง

การพัฒนาจากพิษงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก

DRUG DEVELOPMENT FROM THE VENOM OF KING COBRA

(*OPHIOPHAGUS HANNAH*) : THE PRECLINICAL STUDIES



โดย

รองศาสตราจารย์โสภิต ธรรมอารี และคณะผู้วิจัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

เมษายน 2552

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
จากเงินงบประมาณแผ่นดินและผลงานวิจัยนี้เป็นความรับผิดชอบของคณะผู้วิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานประมาณ ที่พิจารณาอนุมัติ ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2549 ปี พ.ศ. 2550 และปี พ.ศ.25451

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะแพทยศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันเสวภา สภาภาษาไทย ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยของคณะผู้วิจัยในสังกัด คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณสถาบันเสวภา สภาภาษาไทย ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่เลี้ยงสุนัขที่ใช้ในการทดลอง และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิ และที่ปรึกษาแผนงานวิจัย ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุง ข้อเสนอโครงการวิจัย และการดำเนินงานวิจัย

อนึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ให้ความเอื้อเฟื้อเพื่อเซลล์มะเร็งในการศึกษา

คำนำ

รายงานฉบับสมบูรณ์ของแผนงานวิจัย เรื่อง "การพัฒนาจากพิษงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก" (DRUG DEVELOPMENT FROM THE VENOM OF KING KOBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*) : THE PRECLINICAL STUDIES) ฉบับนี้ เป็นผลงานวิจัยที่ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549 ถึงปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 3 ปี คณะผู้วิจัยได้ขอต่อระยะเวลาดำเนินการวิจัยอีก 6 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2551 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2552 เนื่องจากขั้นตอนการทำโคลนนิ่งต้องใช้เวลามากกว่าที่คาดไว้ คณะผู้วิจัย ฝ่ายวิจัย และภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ร่วมกับ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ได้จัดการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัย การพัฒนาจากพิษงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก เมื่อวันที่ 17 มีนาคม 2552 ณ ห้องประชุม 301 ตึกอำนวยการ ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รายงานฉบับสมบูรณ์นี้ ได้รายงานแต่ละโครงการซึ่งมีทั้งหมด 7 โครงการ โดยมีส่วนประกอบของแต่ละรายงานสมบูรณ์ในแต่ละโครงการ

จากผลการวิจัยที่ได้ นักวิจัยสามารถนำผลงานวิจัยไปพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ได้ยาช่วยคลายกล้ามเนื้อ และศึกษาต่อยอดสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีศักยภาพด้านเซลล์มะเร็ง และด้านจุลชีพได้

การดำเนินงานตามแผนงานวิจัยได้มีการจัดจ้างนักวิจัยทำงานเต็มเวลารวม 2 ตำแหน่ง ตลอด จนมีนิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ได้นำบางส่วนไปทำวิทยานิพนธ์จำนวนไม่น้อยกว่า 3 คน ดังนั้นการดำเนินงานในแผนงานวิจัยนี้มีส่วนช่วยพัฒนานักวิทยาศาสตร์ให้เป็นนักวิจัย และสร้างมหาบัณฑิต

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
คำนำ	ข
สารบัญ	ค
รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย	1
รายชื่อคณะผู้บริหารแผนงานวิจัย	1
ชื่อโครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัย	4
ความสำคัญและที่มาของแผนงานวิจัย (Rationale)	5
วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	5
ทฤษฎีกรอบแนวคิด (Conceptual Framework) ของแผนงานวิจัย	6
รายงานโดยละเอียดของแต่ละโครงการ	
รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการย่อยที่ 1	
รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการย่อยที่ 2	
รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการย่อยที่ 3	
รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการย่อยที่ 4	
รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการย่อยที่ 5	
รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการย่อยที่ 6	
รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการย่อยที่ 7	

Manuscript ส่งตีพิมพ์

รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย

ทิศทางการศึกษาวิจัย (Direction) การวิจัยที่นำประเทศไปสู่การพึ่งพาตนเอง

แผนวิจัย (Plan) แผนวิจัยเพื่อผลิตยา

1. ชื่อแผนงานวิจัย

(ภาษาไทย) การพัฒนาจากพิษงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก

(ภาษาอังกฤษ) DRUG DEVELOPMENT FROM THE VENOM OF KING KOBRA
(*OPHIOPHAGUS HANNAH*) : THE PRECLINICAL STUDIES

2. รายชื่อคณะผู้บริหารแผนงานวิจัย

2.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

รศ.โสภิต ธรรมอารี

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-251-1965, 02-256-4481 โทรสาร 02-251-1965, 02-256-4481

E-mail sopit.t@chula.ac.th

2.2 ที่ปรึกษาแผนงานวิจัย

1) ศ.เกียรติคุณ นพ.วิศิษฎ์ สิตปรีชา

ผู้อำนวยการสถานเสาวภา สภากาชาดไทย

ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330

โทรศัพท์ 02-252-0161-4, 02-256-4309 โทรสาร

2) ศ.น.สพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 คณะผู้วิจัย

1) รศ.โสภิต ธรรมอารี ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย และหัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์และโทรสาร 0-2251-1965, 0-2256-4481

E-mail : sopit.t@chula.ac.th

2) รศ.ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 0-2256-4132

- 3) นางนฤมล พัทมณี หัวหน้าโครงการวิจัย
 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330
 โทรศัพท์ 02-252-0161-4 ต่อ 150
 E-mail :
- 4) ผศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช หัวหน้าโครงการวิจัย
 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 โทรศัพท์ 0-2218-8053-6 โทรสาร 0-2218-8052
 mail : spolkit@chula.ac.th E-
- 5) น.ส. อรวรรณ แซ่โค้ง ผู้ร่วมวิจัย
 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330
 โทรศัพท์ 02-252-0161-4 ต่อ 150
- 6) Dr. Tamotsu-Omori Satoh ผู้ร่วมวิจัย
 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330
 โทรศัพท์ 02-252-0161-4 ต่อ 150
- 7) น.ส. สุนุชชา สุนทรารชุน ผู้ร่วมวิจัย
 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330
 โทรศัพท์ 02-252-0161-4 ต่อ 150
- 8) นางพรรณิภา จุลสุคนธ์ ผู้ร่วมวิจัย
 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330
 โทรศัพท์ 02-252-0161-4 ต่อ 150

- 9) น.ส จุรีพร น้อยพรหม ผู้ร่วมวิจัย
 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330
 โทรศัพท์ 02-252-0161-4 ต่อ 150
- 10) น.ส สุจิตตรา ไทยทำนัส ผู้ร่วมวิจัย
 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330
 โทรศัพท์ 02-252-0161-4 ต่อ 150
- 11) อ.พญ. ดวงเพ็ญ ธิระบัญชาศักดิ์ ผู้ร่วมวิจัย
 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 1873 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม. 10330
 โทรศัพท์และโทรสาร 0-2256-
 E-mail :
- 11) สพ.ญ. ลาวัญญ์ จันทร์โฮม ผู้ร่วมวิจัย
 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330
 โทรศัพท์ 02-252-0161-4 ต่อ 150
- 12) รศ.ดร.อมร เพชรสม ผู้ร่วมวิจัย
 สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 โทรศัพท์ 0-2218-8053-6 โทรสาร 0-2218-8052
- 13) น.สพ. ชาญณรงค์ มิตรมูลพิทักษ์ ผู้ร่วมวิจัย
 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330
 โทรศัพท์ 02-252-0161-4 ต่อ 150

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2549 ถึงปี 2551 จำนวน รวม 4,662,270 บาท
4. ระยะเวลาทำการวิจัย 3 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2549 ถึงเดือน กันยายน พ.ศ. 2551 ขอยกเวลาอีก 6 เดือน ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2552
5. ชื่อโครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัย

- 1) การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน
STUDY OF QUALITY SPECIFICATION OF KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*) VENOM FOR STANDARDIZATION
- 2) การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
FRACTIONATION OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)
- 3) การวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
PROTEIN ANALYSIS OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)
- 4) การศึกษาเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)
- 5) การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
CLONING OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)
- 6) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่แยกส่วนเพื่อหาส่วนที่มีศักยภาพเป็นประโยชน์ทางการแพทย์
STUDIES OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF FRACTIONATED VENOM OF KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*) FOR POTENTIAL THERAPEUTIC AGENTS
- 7) โครงการบริหารจัดการ การพิมพ์รายงาน และการถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัยการพัฒนามาจากพิษงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก
ADMINISTRATION REPORT PRINTING AND TECHNOLOGY TRANSFER OF THE RESEARCH PROGRAM ON DRUG DEVELOPMENT FROM THE VENOM OF KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*): THE PRECLINICAL STUDIES

ความสำคัญและที่มาของแผนงานวิจัย (Rationale)

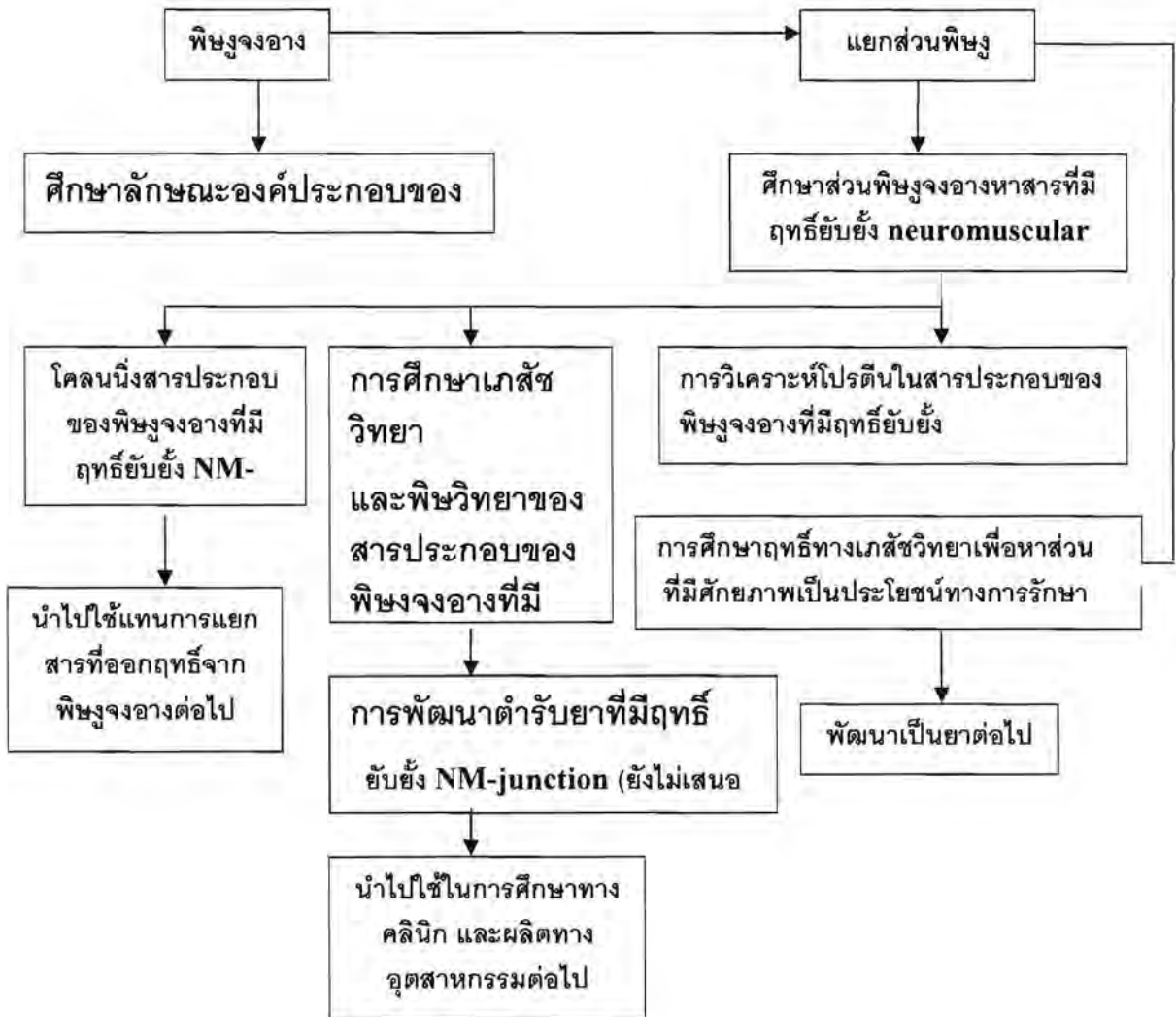
มีการพัฒนายาจากองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลชีพ นำมาใช้ประโยชน์ในการฆ่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ยาเหล่านั้นเรียก antibiotics ใช้รักษาโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ นอกจากนี้ ปัจจุบันพิษจากแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* (Botulinum toxin) ถูกนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ โดยอาศัยฤทธิ์ที่ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และถูกนำมาใช้ด้านความงามโดยใช้ลดรอยเหี่ยวย่น ทำให้ผิวหนังตึงเรียบ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจจนมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการเสริมความงาม จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสารประกอบของพิษงูที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ botulinum toxin คือมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อจากพิษงูจงอาง เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาใช้ในทางการแพทย์และเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

พิษงูเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ มีทั้ง enzymatic protein และ non-enzymatic protein โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พวกสารพิษ (Toxins เช่น neurotoxins, cardiotoxin, myotoxin เป็นต้นโปรตีนต่างๆ ในพิษงูมีบทบาทด้านชีวเคมี และเภสัชวิทยาต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการหาอาหารของงู ซึ่งมีเป้าหมายที่เด่นๆ ของพิษงูได้แก่ cell membranes ; vascular wall, connective tissue component และ plasma proteins เป้าหมายของส่วนที่เป็นสารพิษส่วนใหญ่ได้แก่ receptor ที่จำเพาะ หรือ ion channels เช่น neurotoxin ของพิษงูเห่าไทย มี acetylcholine receptor ที่ fold ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ปลายประสาท เป็นต้น จากคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพิษงูเป็นที่น่าสนใจของนักวิจัยหลายกลุ่มนำมาศึกษาเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนายาตัวใหม่ๆ ยาตัวแรกที่ประสบความสำเร็จโดยการพัฒนามาจาก bradykinin potentiating peptides ซึ่งแยกจากพิษงู *Bothrops jararaca* คือ ACE inhibitor : captopril ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนายาจากพิษงูที่มีในประเทศไทย พิษงูที่น่าสนใจจะนำมาศึกษาคือ พิษงูจงอาง ด้วยเหตุผลที่ งูจงอางเป็นงูพิษขนาดใหญ่ที่สุด ปริมาณพิษมาก และทางสถานเสาวภา สามารถทำการเพาะเลี้ยงงูจงอางได้ และการศึกษาเกี่ยวกับพิษงูจงอางในประเทศไทยมีไม่มาก องค์ประกอบที่สำคัญในพิษงูจงอางคือ neurotoxin แบบ post synaptic neurotoxin ซึ่ง target receptor คือ acetylcholine receptor นอกจากนี้ในพิษงูจงอางยังมีบทบาทออกฤทธิ์ต่อผนังหลอดเลือดแดงด้วย คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเหล่านี้ทำให้น่าสนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางยาจากพิษงูจงอาง

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

ศึกษาพิษงูจงอางในระยะก่อนคลินิก (Preclinical studies) เพื่อพัฒนายาจากพิษงูจงอาง ให้เป็นยา ยับยั้งปลายประสาทที่ควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อ (neuromuscular junction blocking agent) ซึ่งอาจมีฤทธิ์คล้ายคลึงกับ botulinum toxin

ทฤษฎีกรอบแนวคิด (Conceptual Framework) ของแผนงานวิจัย และวิธีการเชื่อมโยงของโครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัย



รายงานโดยละเอียดของแต่ละโครงการ

โครงการที่ 1

การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงู
จงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน

STUDY OF QUALITY SPECIFICATION OF
KING KOBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)
VENOM FOR STANDARDIZATION

รายงานการวิจัย

การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน Study of Quality Specification of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom for Standardization

นางนฤมล พัทมณี
ภญ. พรรณีภา จุลสุคนธ์
น.ส.อรวรรณ แซ่ไคว้
นางสาวจวีพร น้อยพรหม
สพ.ญ. ลาวัลย์ จันทร์โสม •

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน เป็นโครงการที่จัดทำขึ้นโดยได้รับการสนับสนุนจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนำข้อมูลไปใช้ประกอบแผนงานวิจัย การพัฒนาจากพิษงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2549 ของแผนงานวิจัย การพัฒนาจากพิษงูจงอาง: การศึกษาระยะก่อนคลินิก

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน

นฤมล พักมณี พรรณิภา จุลสุคนธ์ อรวรรณ แซ่โค้ว จุรีพร น้อยพรหม และลาวัณย์ จันทร์โสม
สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพทั้งด้านกายภาพ ด้านชีวเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของพิษงูจงอาง 3 กลุ่มจำนวน 9 lots ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างพิษงูจงอางที่ได้จากงูจงอางซึ่งมีถิ่นที่อยู่ที่มีขอบเขตภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน พบว่าพิษงูจงอางแห่งมีลักษณะทางกายภาพเป็นผงละเอียด มีสีครีมจนถึงสีเหลือง ปริมาณโปรตีนในพิษงูจงอางแห่งอยู่ในช่วง 20-28 % พิษงูจงอางที่มาจากถิ่นที่มีขอบเขตภูมิศาสตร์ต่างกันพบว่ามีรูปแบบโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ 2-DE มีความแตกต่างกันในความเข้มของแถบโปรตีน การกระจายตัวของจุดโปรตีนคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วงของความเป็นกรด และมีมวลโมเลกุลต่ำ พิษงูจงอางทุกตัวอย่างมีactivities ของเอนไซม์ Phosphomonoesterase, Phosphodiesterase, Phospholipase A₂, Acetylcholinesterase และ L-amino acid oxidase ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า ตัวอย่างพิษของงูจงอางที่มาจากเพชรบูรณ์มีความเป็นพิษมากกว่าตัวอย่างพิษของงูจงอางที่มาจากภาคใต้ และสอดคล้องกับผลการศึกษา neurotoxicity ความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงของพิษงูจงอางต่ำ ในขณะที่ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งปอด เซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งกระเพาะ และเซลล์มะเร็งลำไส้ ได้ใกล้เคียงกับยาต้านมะเร็ง Doxorubicine โดยเฉพาะอย่างยิ่งพิษงูจงอางที่มี L-amino acid oxidase activity สูง ลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพทั้งด้านกายภาพ ด้านชีวเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลมาตรฐานของพิษงูจงอางคั้งคั้นที่จะนำมาใช้พัฒนาเป็นยาต่อไป

ABSTRACT

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

Pakmanee N, Chulasugandha P, Khoo O, Noiphrom J and Chanhome L

Queen Saovabha Memorial Institute, The Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Quality specification including physical properties, biochemical properties and biological activities of 9 samples of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom were investigated. The venom samples were extracted from king cobra with different geographic areas and lyophilized. The physical properties of the lyophilized venoms are fine powder with cream or yellow color. There is little density variation in bands of protein analyzed by SDS-PAGE and 2-DE. Similar distribution of protein points in anionic range and low molecular weight were observed. The venoms possess activities of phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phospholipase A₂, acetylcholinesterase and L-amino acid oxidase. The venom of *O. hannah* from Petchaboon exhibits higher lethal toxicity and neurotoxicity than those from the southern of Thailand. All venoms do not show coagulation activity. Hemolytic activity of all samples were low. In addition, the venoms inhibit proliferation of cancer cell lines including , breast cancer (BT 474), lung cancer (Chago), liver cancer (HEP-G₂), gastric carcinoma (KATO-III) and colon adenocarcinoma (SW620). High ability of inhibition of cancer cell proliferation was observed in the venoms with high activity of L-amino acid oxidase. These quality specification are the data base for standardization of starting king cobra venoms using in drug development.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทนำ	1
ทฤษฎีและแนวทางในการวิจัย	3
งูจงอาง	3
พิษงูและส่วนประกอบของพิษงู	4
งานวิจัยที่ผ่านมา	4
กรอบแนวความคิด	6
วิธีดำเนินการวิจัย	7
วัสดุและอุปกรณ์	7
สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	7
การวัดปริมาณโปรตีนในพิษงูด้วยวิธี Bradford	8
การวิเคราะห์โปรตีนในพิษงูด้วยวิธี SDS-PAGE	8
การวิเคราะห์โปรตีนในพิษงูด้วยวิธี 2-DE	9
การวัด activity ของเอนไซม์ L-amino acid oxidase	9
การวัด activity ของเอนไซม์ Phospholipase A2	10
การวัด activity ของเอนไซม์ Phosphomonoesterase	10
การวัด activity ของเอนไซม์ Phosphodiesterase	11
การวัด activity ของเอนไซม์ Acetylcholinesterase	12
การวัด Proteolytic activity ในพิษงู	12
การหาความเป็นพิษ	13
การศึกษาฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)	14
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเรียบร่วมประสาทของพิษงูจงอาง	15

การหา Minimum coagulation dose (MCD-F)	18
การหา Minimum coagulation dose (MCD-P)	18
การศึกษาฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งของพิษงูจงอาง	19
ผลการวิจัยและอภิปราย	20
การรวบรวมตัวอย่างพิษงูจงอาง	20
การศึกษาลักษณะเฉพาะทางกายภาพของพิษงูจงอาง	20
การศึกษาลักษณะเฉพาะทางชีวเคมีของพิษงูจงอาง	20
การวัดปริมาณ โปรตีน	21
การวัด activities ของเอนไซม์ในพิษงูจงอาง	21
การศึกษารูปแบบ โปรตีนของพิษงูจงอาง โดยเทคนิค SDS-PAGE	22
การศึกษารูปแบบ โปรตีนของพิษงูจงอาง โดยเทคนิค 2-DE	22
การศึกษา biological activities ของพิษงูจงอาง	25
สรุปผลและแนะนำการวิจัย	27
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	30
ภาคผนวก ก	31
ภาคผนวก ข	32
ภาคผนวก ค	35
ประวัติผู้วิจัยและคณะ	38

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Lot และที่มาของพิษงูจงอาง	20
2	ลักษณะเฉพาะทางกายภาพ และปริมาณ โปรตีนของพิษงูจงอาง	21
3	Enzymatic activities และ Lethal toxicity ของพิษงูจงอาง	22
4	Biological activities ของพิษงูจงอาง	25
5	การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ โดยพิษงูจงอาง	26

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะสีสันของงูจงอางจากภาคต่างๆของประเทศไทย	3
2	ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองการหาคัดตัวของกล้ามเนื้อ กระบังลมเมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า โดยใช้ Suction electrode	17
3	รูปแบบโปรตีนของพิษงูจงอาง (เพชรบูรณ์) (2-5) พิษงูจงอาง (ภาคใต้) (6-8) และพิษงูจงอาง (ภาคใต้/สวนงู) (9-10) โดย เทคนิคSDS-PAGE	23
4	รูปแบบโปรตีนของพิษงูจงอาง 3 ตัวอย่าง โดยเทคนิค 2-DE gel	24

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	Absorption
ACE	Angiotensin-converting enzyme
BSA	Bovine serum albumin
2-DE	2-Dimension electrophoresis
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTNB	Dithiobisnitrobenzoic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HRP	Horse radish peroxidase
Hz	Hertz
g	gram
IC ₅₀	Inhibition concentration 50
IEF	Isoelectric focusing
kDA	Kilodalton
LD ₅₀	Lethal dose 50 (minimum lethal dose)
M	Molar
mA	Milliampere
MCD-F	Minimum coagulation dose-fibrinogen
MCD-P	Minimum coagulation dose-plasma
mg/ml	milligram per milliliter
µg/ml	microgram per milliliter
µl	microlitre
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
ms	millisecond
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
N	Normal
nm	nanometer
RBC	Red blood cell
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel

บทนำ

ในอดีตที่ผ่านมาการค้นหายาแห่งยา (drug discovery) ที่สำคัญที่สุดคือ สารจากธรรมชาติ มีการพัฒนา ยาจากองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลชีพ นำมาใช้ประโยชน์ในการฆ่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ยาเหล่านั้นเรียก antibiotics ใช้รักษาโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ นอกจากนี้ ปัจจุบันพิษจากแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* (Botulinum toxin) ถูกนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ โดยอาศัยฤทธิ์ที่ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และถูกนำมาใช้ด้านความงามโดยใช้ลดรอยเหี่ยวย่น ทำให้ผิวหนังตึงเรียบ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจจนมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการเสริมความงาม^(1,2) จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสารประกอบของพิษงูที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ botulinum toxin คือมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อจากพิษงู เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาใช้ในทางการแพทย์และเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

น้ำพิษที่งูพิษสร้างออกมาเพื่อเป็นอาวุธ และเครื่องมือที่สำคัญของงูในการป้องกันตัวและกินอาหาร โดยทำให้เหยื่อตาย หรือเป็นอัมพาต⁽³⁾ การที่มนุษย์ได้รับอันตรายจากพิษงูนี้เอง ก่อให้เกิดความสนใจศึกษาวิจัย พิษงูในด้านต่างๆ เช่น องค์ประกอบของพิษงู กลไกทำให้เกิดความเป็นพิษหรืออันตรายต่อเหยื่อ วิธีการแก้พิษ หรืออันตรายที่เกิดจากพิษงูจนทำให้มนุษย์เราทราบว่า พิษงูคืออะไร ประกอบด้วยสารอะไรบ้าง สารแต่ละตัว มีบทบาทอย่างไร ในการเกิดความเป็นพิษหรืออันตรายต่อเหยื่อ จากข้อมูลต่างๆที่ได้จากการศึกษาวิจัย พิษงู ทำให้นักวิจัยมองเห็นด้านบวกของพิษงู เห็นแนวทางที่จะนำพิษงูไปใช้ประโยชน์ ในด้านการใช้ประโยชน์ จากพิษงูนั้น

พิษงูเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ มีทั้ง enzymatic protein และ non-enzymatic protein โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พวกสารพิษ (Toxins) เช่น neurotoxins, cardiotoxin, myotoxin เป็นต้น โปรตีนต่างๆ ในพิษงูมีบทบาทด้านชีวเคมี และเภสัชวิทยาต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการหาอาหารของงู ซึ่งมีเป้าหมายที่เด่นๆ ของพิษงูได้แก่ cell membranes ; vascular wall, connective tissue component และ plasma proteins เป้าหมายของส่วนที่เป็นสารพิษส่วนใหญ่ได้แก่ receptor ที่จำเพาะ หรือ ion channels เช่น neurotoxin ของพิษงูเห่าไทย มี acetylcholine receptor ที่ fold ของเซลล์กล้ามเนื้อรอบๆ ปลายประสาท เป็นต้น⁽³⁾ จากคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพิษงูเป็นที่น่าสนใจของนักวิจัยหลายกลุ่มนำมาศึกษาเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการ พัฒนายาตัวใหม่ๆ ยาตัวแรกที่ประสบความสำเร็จโดยการพัฒนาจาก bradykinin potentiating peptides ซึ่งแยก จากพิษงู *Bothrops jararaca* คือ ACE inhibitor : captopril^(3,4,5) ยาตัวนี้ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่ามี ประสิทธิภาพในการลดความดันโลหิตสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีความดันโลหิตสูง ร่วมกับความเสี่ยงของไต สามารถทำให้อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากภาวะหัวใจล้มเหลวลดลงได้ การ ค้นพบยา captopril นี้ทำให้ Prof. Sergio Henrique Ferreira ซึ่งเป็นผู้ค้นพบได้รับรางวัลสมเด็จเจ้าฟ้ามหิดล สาขาการแพทย์ประจำปี 2551 นอกจากนี้มีการพัฒนายา ancrod จาก proteolytic enzyme ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการ แข็งตัวของเลือด (defibrinogenating effect) ของพิษงูกะปะ (Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*) ทางคณะผู้วิจัยเห็นว่าพิษงูในประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง น่าจะมีโอกาสสูงที่จะค้นพบสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้ จึงสนใจที่จะศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาจากพิษ

งูที่มีในประเทศไทย พิษงูที่น่าสนใจจะนำมาศึกษาคือ พิษงูจงอาง ด้วยเหตุผลที่ งูจงอางเป็นงูพิษขนาดใหญ่ที่สุด ปริมาณพิษมาก และทางสถานเสาวภา สามารถทำการเพาะเลี้ยงงูจงอางได้ และการศึกษาเกี่ยวกับพิษงูจงอางในประเทศไทยมีไม่มาก องค์ประกอบที่สำคัญในพิษงูจงอางคือ neurotoxin แบบ post synaptic neurotoxin ซึ่ง target receptor คือ acetylcholine receptor นอกจากนี้ในพิษงูจงอางยังมีบทบาทออกฤทธิ์ต่อผนังหลอดเลือดแดงด้วย^(6,7) คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเหล่านี้เป็นฤทธิ์ที่น่าสนใจมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาหาสารที่มีฤทธิ์ทางยา

การที่จะเริ่มต้นพัฒนาขายจำเป็นต้องศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของวัตถุดิบหรือวัตถุดิบเริ่มต้นเพื่อเป็นมาตรฐานไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการกำหนดคุณลักษณะเฉพาะ ของวัตถุดิบที่จะนำมาผลิตยาในอนาคต นอกจากนี้การที่งูจงอางในประเทศไทยมีความผันแปรในเรื่องของขนาด สีสันและนิสัย อาจส่งผลถึงความแตกต่างของพิษงู ตามที่มีผู้ศึกษามาว่าความแตกต่างของขนาดตัว ถิ่นที่อยู่อาศัย อาหารตลอดจนความผันแปรที่เกี่ยวข้องกับขอบเขตทางภูมิศาสตร์มีผลต่อความแตกต่างของส่วนประกอบของพิษงูและความเป็นพิษ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อใช้เป็นมาตรฐานต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะด้านกายภาพ และด้านชีวเคมี ของพิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) เพื่อเป็นมาตรฐานของพิษงูจงอางที่จะใช้ศึกษาพัฒนา

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการศึกษาลักษณะเฉพาะด้านกายภาพ ได้แก่ Physical form รูปแบบโปรตีน และน้ำหนักโมเลกุล โดยเทคนิค SDS – PAGE และ 2 – dimension electrophoresis คุณสมบัติด้านชีวเคมี และ ชีววิทยา

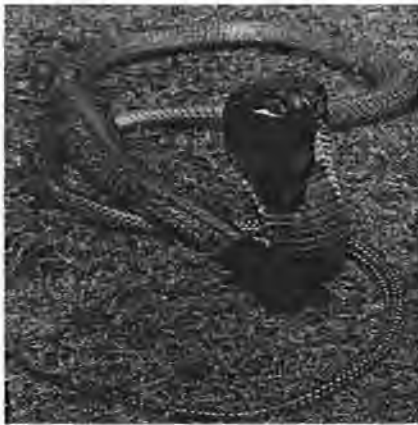
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลคุณลักษณะเฉพาะของพิษงูจงอาง เพื่อใช้เป็นมาตรฐานของพิษงูจงอางที่นำมาใช้ในการทำวิจัย เพื่อพัฒนาเป็นยา

ทฤษฎีและแนวทางในการวิจัย

งูจงอาง⁽⁸⁾

งูจงอาง (King cobra, *Ophiophagus hannah*) เป็นงูพิษที่มีขนาดใหญ่ที่สุด อยู่ในครอบครัว Elapidae เป็นงูพิษที่มีนิสัยค่อนข้างดุ สามารถแผ่แม่เบี้ยได้เช่นเดียวกับงูเห่า แต่แม่เบี้ยของงูจงอางจะแคบกว่าแม่เบี้ยของงูเห่า งูจงอางเป็นงูป่า สามารถอาศัยอยู่ในระดับสูงกว่าระดับน้ำทะเลได้ถึง 2,000 เมตร บนภูเขา หรือในป่าจะอยู่ใกล้แหล่งน้ำลำธาร อาหารของงูจงอางคือ งูชนิดอื่นๆ กิ้งก่า และตุ๊กแก งูจงอางมีความผันแปรในเรื่องขนาดและสีของลำตัวที่ชัดเจน (ภาพที่ 1) เป็นความผันแปรที่เกี่ยวข้องกับขอบเขตทางภูมิศาสตร์ (geographic variation) คือ งูจงอางที่พบทางภาคใต้ของไทยมักจะมีขนาดตัวใหญ่กว่างูจงอางในภาคอื่น สีตัวเป็นสีน้ำตาลอมเขียวหรือเขียวอมเทา ลวดลายไม่ชัดเจน งูจงอางทางภาคเหนือมักพบว่ามีส่วนหัวเข้มคล้ำจนเกือบดำ นิสัยค่อนข้างดุกว่างูจงอางภาคใต้ ส่วนงูจงอางทางภาคกลางและภาคอีสานมักมีส่วนหัวเป็นลายขวางเป็นบั้งๆ เกือบตลอดตัว และขนาดตัวเล็กกว่าภาคอื่น มีนิสัยดุ ว่องไวปราดเปรียว มีพิษทางระบบประสาท (neurotoxicity) ที่รุนแรง ผู้ถูกงูจงอางกัดจะมีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาตก พูดไม่ชัด หายใจไม่สะดวก และอาจเสียชีวิตเนื่องจากระบบการหายใจล้มเหลว เนื่องจากงูจงอางเป็นงูขนาดใหญ่ ปริมาณพิษมากและพฤติกรรมการกัดแบบกัดคิดแน่นอน ไม่ยอมปล่อย ทำให้เป็นงูพิษที่อันตรายมาก



งูจงอางจากภาคใต้



งูจงอางจากภาคเหนือ



งูจงอางจากภาคกลางหรืออีสาน

ภาพที่ 1 ลักษณะสีตัวของงูจงอางจากภาคต่างๆของประเทศไทย⁽⁸⁾

พิษงูและส่วนประกอบของพิษงู⁽⁹⁾

พิษงู (snake venom) ประกอบด้วยสารที่เป็นโปรตีนประมาณ 90% และที่เหลือเป็นส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ซึ่งอยู่ในรูปของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น ธาตุสังกะสี ไรโบฟลาวิน กรดนิวคลีอิก เป็นต้น ส่วนที่เป็นโปรตีนแบ่งย่อยเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นสารพิษ (toxin) และส่วนที่เป็น enzyme พิษงูมีส่วนประกอบโปรตีนที่เป็น enzyme อยู่มากมายหลายชนิด พบแล้วประมาณ 26 ชนิด enzyme เหล่านี้พบว่ามียับยั้งหรือทำลายพิษงูได้ 3 อย่าง คือ

1. ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านได้ของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น และเกิดการทำลายของเซลล์
2. ทำให้การแข็งตัวของเลือดผิดปกติ
3. ทำให้มีการปล่อยสารบางชนิดออกมา เช่น สารจำพวก histamine serotonin kinins และ bradykinin ทำให้ผู้ถูกงูกัดมีอาการเจ็บปวด ทำให้ความดันเลือดต่ำ เป็นต้น

การศึกษาเกี่ยวกับพิษงูจึงอาจเทียบเท่ากับงูพิษอื่นแล้วน้อยกว่ามาก ส่วนประกอบหลักในพิษงูจึงอาจคือ neurotoxin ชนิด long chain post synaptic neurotoxin ซึ่งจะไปแย่งจับที่ receptor กับ acetylcholine ที่ neuromuscular junction และส่งผลให้เกิดอัมพาต ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับ post synaptic α - neurotoxin ที่พบในพิษงูชนิดต่างๆ กว่า 100 ชนิด เป็นชนิดที่พบในงูจงอางเพียง 8 long chain neurotoxin, 1 short chain neurotoxin และ 1 weak toxin⁽¹⁰⁾ และ การศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่มีพิษชนิดเดียว คือ hannalgesin ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารระงับปวด (analgesic)⁽¹¹⁾ นอกจากนี้ในพิษงูจงอางยังพบเอนไซม์หลายชนิด เช่น L-amino acid oxidase, Phosphomonoesterase, Phosphodiesterase, Acetylcholinesterase Phospholipase A₂ และ Protease เป็นต้น^(6,7) ซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพ จึงน่าสนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ที่จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางยา หรือ diagnostic reagent จากพิษงูจงอาง

งานวิจัยที่ผ่านมา

นับพันปี ก่อนมนุษย์นำพิษงูมาใช้ ในการรักษาทางการแพทย์ อย่างเช่น ในศตวรรษที่ 12 แพทย์ได้นำพิษงูมาใช้ในการรักษาโรคเรื้อน (Leprosy) เพราะเขามีความคิดว่าตัวงูสามารถรักษาแผลหลังจากการลอกคราบได้ น่าจะนำคุณสมบัตินี้ไปใช้กับคนได้ ในปี ค.ศ. 1880 มีการใช้พิษจากงูหางกระดิ่ง (Rattle snake) รักษาโรคต่างๆ กว่า 50 โรคที่ไม่สามารถรักษาด้วยวิธีอื่นๆ ได้ ค.ศ. 1940 ในอเมริกาใช้พิษจากงูในการรักษาอาการเลือดกำเดาออกมามากๆ และเลือดออกมามากหลังการถอนฟัน⁽³⁾

กลุ่มนักวิจัยสนใจที่จะพัฒนา ยารักษาโรคจากพิษงู เช่นพิษงูหลายชนิดมีคุณสมบัติทั้งทำให้เลือดแข็งตัว (coagulant properties) และทำให้เลือดไม่แข็งตัว ด้านการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant properties) จากคุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือดนำไปสู่การพัฒนาจากพิษงู 2 ตัว คือ Ancrod⁽¹²⁾ และ Aggrastat[®] (13)

Ancrod พัฒนาจากพิษงูกะปะ (*Agkistrodon rhodostoma* หรือปัจจุบันคือ *Calloselasma rhodostoma*) ใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยเส้นโลหิตอุดตันในสมอง⁽¹²⁾

Aggrastat[®] เป็นยาสังเคราะห์ที่พัฒนาจากโปรตีน disintegrins ของพิษงู จากงูพิษ saw-scaled viper ของแอฟริกา ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Echis carinatus* disintegrin เป็นสารป้องกันการรวมตัวของ (การ

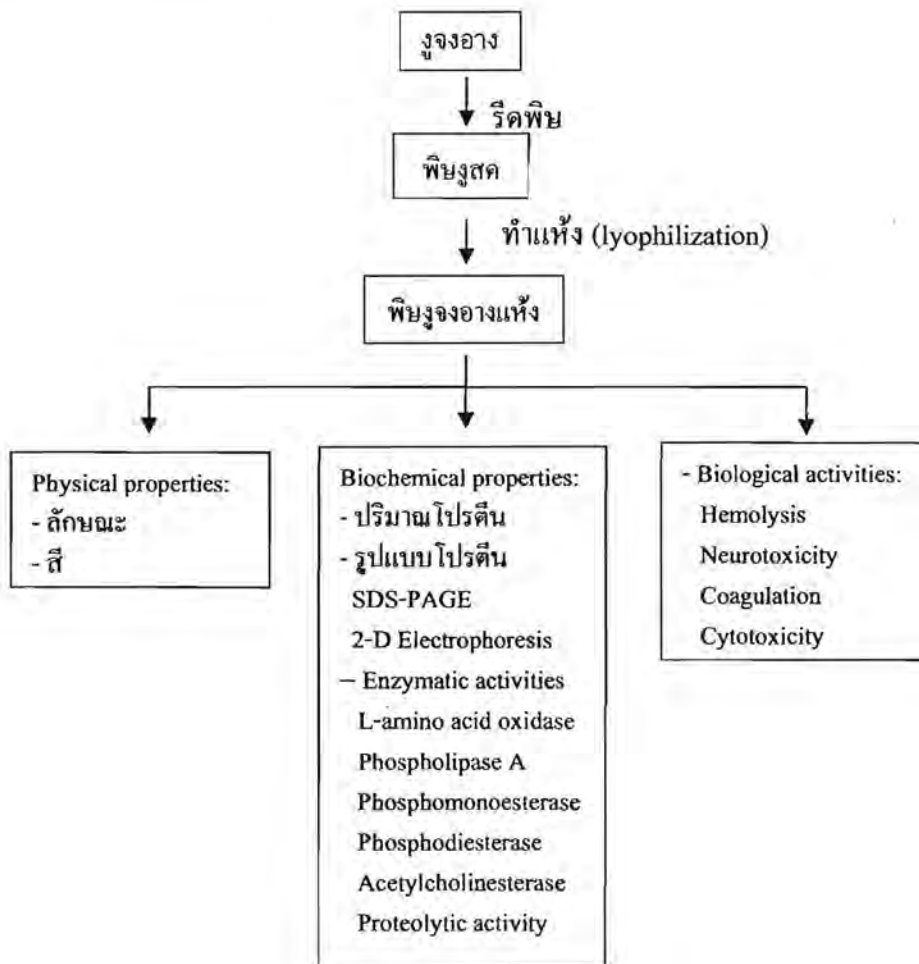
ติดกันของ)เกล็ดเลือด Aggrastat[®] เป็นยาที่จับกับ receptor ของเกล็ดเลือด ใช้กับผู้ป่วยที่หัวใจล้มเหลวขณะนี้ ได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา⁽¹³⁾

โปรตีน disintegrin อีกชนิดหนึ่งที่แยกได้จากพิษงูพิษที่พบในอเมริกา ซึ่งเรียกว่า copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) สามารถขัดขวางการทำงานของ integrin ซึ่งเป็น โปรตีนที่อยู่บนผิวของเซลล์ ช่วยให้เซลล์เกาะติดกัน สามารถหยุดการแข็งตัวของเลือดได้เช่นเดียวกัน กลุ่มนักวิจัยในเมืองบอสตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา เชื่อว่า disintegrin ที่มีชื่อว่า contortrostatin⁽¹⁴⁾ จากพิษงูของพิษ copperhead snake สามารถจะหยุดการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ เพราะ integrin บนผิวของเซลล์มะเร็ง คล้ายกับที่อยู่บนผิวของเกล็ดเลือดมาก จึงได้ทำการวิจัยโดยให้พิษงูชนิดนี้กับหนูที่เป็นมะเร็งเต้านม โดยฉีด เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์เข้าไป จากการศึกษาพบว่าโปรตีนจากพิษงูนี้สามารถลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 60-70 % และหยุดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังปอดของหนูได้ 90 %

นอกจากนี้เอนไซม์ L-amino acid oxidase ที่พบในพิษงูเห่า สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ต่างๆแก่ตาย (apoptosis) ได้ โดยเอนไซม์ชนิดนี้จับกับผิวเซลล์แล้วสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีประสิทธิภาพสูง ในการออกซิไดซ์ จนมีความเข้มข้นสูงเฉพาะบริเวณ และทำให้เกิดการทำลายเซลล์ คุณสมบัติของพิษงู ที่ทำให้เกิดการทำลายของเซลล์ เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่ทำให้นักวิจัยให้ความสนใจที่จะพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ ในการทำลายเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้รักษาโรคมะเร็งต่อไป⁽¹⁵⁾

Tan และ Saifuddin⁽⁶⁾ ได้ทำการศึกษา enzymatic properties และความเป็นพิษของพิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) 4 ตัวอย่างพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (intraspecific variation) เพียงเล็กน้อยทั้ง ปริมาณของเอนไซม์ ส่วนประกอบโปรตีนและความเป็นพิษของพิษงู พิษงูที่ศึกษาทั้ง 4 ตัวอย่างไม่พบ hemolytic activity รูปแบบโปรตีนที่วิเคราะห์โดย polyacrylamide gel electrophoresis มีความคล้ายกันมากทั้ง 4 ตัวอย่าง มี activities ของ L-amino acid oxidase, Phosphomonoesterase, Phosphodiesterase, Acetylcholinesterase , Phospholipase A₂ และ Protease สูงกว่าในพิษงูเห่า และมี alkaline Phosphomonoesterase activity สูงมาก

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วัสดุ และอุปกรณ์

พิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) ได้จากการรีดพิษจากงูจงอางซึ่งเลี้ยงที่สวนงู สถานเสาวภา หลายตัวรวมกัน (pooled venom) 4 ตัวอย่าง พิษงูอยู่ในรูป Lyophilized form

วิธีดำเนินการวิจัย

1) การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของพิษงูจงอาง

สังเกตลักษณะผงของพิษงูจงอาง สีของผงพิษงู และ บันทึกรหัส

2) การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของพิษงูจงอาง

2.1 ปริมาณโปรตีนในพิษงูจงอาง (Protein content) โดยใช้วิธีของ Bradford⁽¹⁶⁾

2.2 ศึกษารูปแบบโปรตีนในพิษงูจงอาง โดยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีของ Laemmli⁽¹⁷⁾ ใน 12.5 % polyacrylamide gel และ โดยเทคนิค 2- Dimensional electrophoresis^(18,19)

2.3 ศึกษา enzymatic activities ของพิษงูจงอางทั้ง 4 ตัวอย่าง

นำพิษงูมาละลายในสารละลาย physiological saline ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร และ ใช้สำหรับวัด activity ของ enzymes เหล่านี้

2.3.1 L-amino acid oxidase ตามวิธีของ Tan และ คณะ^(6,20)

2.3.2 Phospholipase A ตามวิธีของ Tan และ คณะ⁽²¹⁾

2.3.3 Phosphomonoesterase ตามวิธีของ Tan และ คณะ^(6,22)

2.3.4 Phosphodiesterase ตามวิธีของ Tan และ คณะ^(6,22)

2.3.5 Acetylcholinesterase ตามวิธีของ Ellman และ คณะ⁽²³⁾

2.3.6 Proteolytic activity ตามวิธีของ Kunitz⁽²⁴⁾

2.4 ศึกษา Biological activities ของพิษงูจงอางทั้ง 4 ตัวอย่าง

2.4.1 Lethal toxicity^(6,25,26)

2.4.1 Hemolytic activity⁽²⁵⁾

2.4.2 Neurotoxicity⁽²⁷⁾

2.4.3 Coagulation ตามวิธีของ WHO collaborating center⁽²⁶⁾

2.4.4 Cytotoxicity โดยทดสอบกับ cell lines ของเซลล์มะเร็ง⁽²⁸⁾

สถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

สวนงู และ ห้องปฏิบัติการฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวัดปริมาณโปรตีนในพิษงู ด้วยวิธี Bradford ⁽¹⁶⁾

สารเคมีที่ใช้

1. ชุดน้ำย้าวัดปริมาณโปรตีน Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD)
2. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin Standard) ความเข้มข้น 1.0 mg/ml

การเตรียมสารละลายพิษงู

เตรียมสารละลายพิษงูความเข้มข้น 1 mg/ml ในสารละลาย normal saline 0.9 %

วิธีทดสอบ

1. เจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml
2. ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ในข้อ 1 และ ตัวอย่างพิษงู 20 µl ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด
3. เติมน้ำยา dye reagent (ภาคผนวก) 1 ml ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน
4. บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที (ไม่ควรบ่มตัวอย่างทดสอบที่อุณหภูมิห้องนานเกิน 1 ชม)
5. นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA และ ตัวอย่างพิษงูที่เกิดปฏิกิริยาแล้วไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยใช้ สารละลาย normal saline 0.9 % เป็น blank ทำซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างทดสอบ
6. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ไป plot กราฟมาตรฐาน
7. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของตัวอย่าง ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนเป็นร้อยละเทียบกับ standard

จากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีนเป็นร้อยละของตัวอย่าง} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของตัวอย่าง} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของ standard} \times \text{ความเข้มข้น 1 มก/มล}}$$

การวิเคราะห์โปรตีนในพิษงูด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ⁽¹⁷⁾

วิธี SDS-PAGE ใช้ 15% Polyacrylamide gel ในส่วน Separating gel และ 3% gel สำหรับ Stacking gel นำตัวอย่าง 4 fraction มาผสมกับ loading buffer และทำการต้ม 5 นาที ก่อนที่จะใส่ลงในร่อง (well) บน stacking gel ในส่วนการทำ electrophoresis ทำงานโดยใช้กำลังไฟ 15 mA ต่อ 1 เจล (Mini-Protein (Hoefler mini VE)) เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำเจลไปย้อมสีในสารละลายสีย้อม Coomassie blue เป็นเวลาประมาณ 60 นาที แล้วจึงค่อยรินออก แล้วเติม destaining solution ประมาณ 30 นาที 3 ครั้ง หรือจนกว่าสีย้อมที่ติดอยู่บนเจลจะหลุดออกหมด

การวิเคราะห์โปรตีนในพินิจด้วยวิธี 2-Dimensional electrophoresis (2-DE)^(18,19)

วิธี 2-dimensional electrophoresis นั้น ทิศทางแรกจะแยกโปรตีนตามประจุ โดยอาศัยวิธี IEF โดยใช้ IPG strips ขนาด 7 เซนติเมตร มาชุบด้วยตัวอย่างพินิจที่ผสมกับ lysis buffer และ rehydration solution ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 12 ชั่วโมง การทำ electrophoresis จะทำที่อุณหภูมิ 20 °C โดยใช้เครื่อง Multiphor II Electrophoresis Unit เมื่อสิ้นสุดทำการบ่ม IPG strip ใน equilibration solution 2 แบบ อย่างละ 15 นาที เมื่อเสร็จนำมาแยกต่อในทิศทางที่สองซึ่งแยกโดยอาศัยความแตกต่างของมวลโมเลกุลชั้นโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE ทำงานโดยใช้กำลังไฟ 10 mA ต่อ 1 เจลเป็นเวลาประมาณ 15 นาทีและ 20 mA ต่อ 1 เจล จนกว่าสีย้อมจะลงมาสุดเจล เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำเจลไปย้อมสีในสารละลายสีย้อม Coomassie blue เป็นเวลาประมาณ 60 นาที แล้วจึงค่อยรินออก แล้วเติม destaining solution ประมาณ 30 นาที 3 ครั้ง หรือจนกว่าสีย้อมที่ติดอยู่บนเจลจะหลุดออกหมด

การวัด activity ของเอนไซม์ L-amino acid oxidase ตามวิธีของ Tan และคณะ^(6,20)

สารเคมี

1. Horseradish peroxidase (HRP) เตรียมเป็นสารละลาย 0.007 % HRP
2. 0.2 M Triethanolamine buffer, pH 7.6 ที่มี 0.1 %L-leucine and 0.0065 % o-dianisidine
3. glycine (เตรียมสารละลาย 0.5 M glycine buffer, pH 8.5)
4. สารละลายพินิจความเข้มข้น 1 mg/ml ในสารละลาย normal saline 0.9 %

วิธีดำเนินการ

1. เติม 1 ml ของ 0.2 M Triethanolamine buffer, pH 7.6 ที่มี 0.1 %L-leucine and 0.0065 % o-dianisidine ในแต่ละหลอดทดลองที่ใช้วัดแอกติวิตี
2. เติม 0.007 % HRP 0.05 ml ลง ในแต่ละหลอดบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
3. เติม สารละลายพินิจ 0.1 ml
4. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 426 nm 3 นาทีแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มา plot กราฟเพื่อหาอัตราการดูดกลืนแสงต่อนาที หาอัตราเฉลี่ยการดูดกลืนแสงต่อนาที
6. นำอัตราเฉลี่ยการดูดกลืนแสงต่อนาทีมาคำนวณหา L-Amino acid oxidase activity

1 Unit of L-Amino acid oxidase activity คือ อัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยต่อนาที

ดังนั้น

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

การวัดแอกติวิตี ของเอนไซม์ Phospholipase A₂ ตามวิธีของ Tan และคณะ⁽²¹⁾

สารเคมี

1. Sodium hydroxide (เตรียมสารละลาย 0.02 N NaOH)
2. Phospholipase A₂ from porcine pancreas (enzyme activity 11,634 Lecitase units/ml) ผลิตภัณฑ์ของ Sigma Lot.045K0961 เป็น standard enzyme
3. substrate ของเอนไซม์ Phospholipase A₂ (ไข่แดง: 18mM CaCl₂: 8.1 mM sodium deoxycholate = 1:1:1 แล้วปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 1 N NaOH)
4. สารละลายพืงูความเข้มข้น 1 mg/ml ในสารละลาย normal saline 0.9 %

เครื่องมือที่ใช้

PHM 290 : pH-Stat controller (Radiometer analyticalTM) ความจุ burette 2 ml

วิธีทดสอบ

1. pipette substrate 15 ml ใส่บีกเกอร์ วางบน magnetic stirrer
2. ปรับ pH ของ substrate ก่อน titrate ให้ได้ 8.0 ± 0.01 ด้วย 0.02 N NaOH
3. เติม standard enzyme หรือ สารละลายพืงู 0.1 ml ใน substrate ไตเตรทด้วย Mode pH-stat titration ที่ pH 8.0 ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน เวลาไตเตรท 3 นาที บันทึกปริมาตร 0.02 N NaOH ที่ใช้ไตเตรทแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยของปริมาตร 0.02 N NaOH ที่ใช้
4. กำหนดหา phospholipase A₂ activity ของตัวอย่างจากปริมาตรเฉลี่ย 0.02 N NaOH ที่ใช้ ไตเตรทตัวอย่างเทียบกับปริมาตรเฉลี่ย 0.02 N NaOH ที่ใช้ไตเตรท standard enzyme จากสูตร

phospholipase A₂ activity ของตัวอย่าง =

$$\frac{\text{ปริมาตร 0.02 N NaOH ที่ใช้ไตเตรท ตัวอย่าง} \times \text{enzyme activity ของ standard enzyme}}{\text{ปริมาตร 0.02 N NaOH ที่ใช้ไตเตรท standard enzyme}}$$

การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Phosphomonoesterase^(6,22)

สารละลายที่ใช้

1. สารละลาย 0.01 M p-nitrophenylphosphate
2. สารละลาย 0.01 M MgSO₄
3. สารละลาย 0.5 M glycine buffer, pH 8.5
4. สารละลายพืงูความเข้มข้น 1 mg/ml ในสารละลาย normal saline 0.9 %

วิธีทดสอบ

1. เติม สารละลายพิฆง 0.1 ml ลง ในสารละลายผสมของ 0.5 ml 0.5 M glycine buffer pH 8.5, 0.5 ml 0.01 M *p*-nitrophenylphosphate และ 0.3 ml 0.01 M $MgSO_4$
2. บ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ นาน 30 นาที
3. เติม 0.2 N NaOH 2 ml ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที
4. หลังจากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 4 ครั้ง หาค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
5. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยไปคำนวณ หา phosphomonoesterase activity โดยกำหนดว่า 1 Unit (U) ของ phosphomonoesterase คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ที่เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยต่อนาที

การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ Phosphodiesterase^(6,22)

สารละลายที่ใช้

1. สารละลาย 2.5 mM Ca-bis-*p*-nitrophenylphosphate
2. สารละลาย 0.01 M $MgSO_4$
3. สารละลาย 0.17 M veronal buffer, pH 9.0
4. สารละลายพิฆงความเข้มข้น 1 mg/ml ในสารละลาย normal saline 0.9 %

วิธีทดสอบ

1. เติมสารละลายพิฆง 0.1 ml ในสารละลายผสมของ 0.5 ml 2.5 mM Ca-bis-*p*-nitrophenylphosphate, 0.3 ml 0.01 M $MgSO_4$ และ 0.5 ml 0.17 M veronal buffer, pH 9.0
2. ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm เป็นเวลา 3 นาที แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง
3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มา plot กราฟเพื่อหาอัตราการดูดกลืนแสงต่อนาที และหาอัตราเฉลี่ยการดูดกลืนแสงต่อนาที
4. นำอัตราเฉลี่ยการดูดกลืนแสงต่อนาทีมาคำนวณหา phosphodiesterase activity จากนิยาม 1 Unit ของ เอนไซม์ Phosphodiesterase คือ อัตราการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ที่เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยต่อนาที

การวัด Acetylcholinesterase activity⁽²³⁾

สารละลายที่ใช้

1. สารละลาย 0.1 M Phosphate buffer pH 8.0.
2. สารละลาย substrate 0.075 M Acetylthiocholine iodide (21.67 mg/ml) เก็บในตู้เย็นไว้ใช้ได้ 10-

3. สารละลาย 0.01 M Dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) เตรียมโดยละลาย 5 : 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 39.6 mg ใน 0.1M phosphate buffer pH 7.0, 10 ml. แล้วเติม sodium bicarbonate 15 mg
4. สารละลายพืษงูความเข้มข้น 0.1 mg/ml ในสารละลาย normal saline 0.9 %

วิธีทดสอบ

1. เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.1 ml ลงใน cuvette ที่มี 0.1M phosphate buffer (pH 8.0) 1.3 ml
2. เติม DTNB reagent 50 μ l วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm เมื่อกำการดูดกลืนแสงคงที่ เพื่อเป็น baseline
3. เติม substrate (acetylthiocholine iodide, 0.075 M) 10 μ l ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นใน 5 นาที
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มา plot กราฟเพื่อหาอัตราการดูดกลืนแสงต่อนาที
5. นำอัตราการดูดกลืนแสงต่อนาทีมาคำนวณหา acetylcholinesterase activity จากสูตร

$$R = \frac{\Delta A}{1.36 (10^{-4})} \times \frac{1}{(V_s/V_T) C_0}$$

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

ΔA = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่เพิ่มขึ้นต่อนาที

V_s = ปริมาตรตัวอย่าง

V_T = ปริมาตรรวมของสารละลายทั้งหมด

C_0 = ความเข้มข้นตั้งต้นของตัวอย่าง (mg/ml)

การวัด Proteolytic activity ในพืษงู⁽²⁴⁾

สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. สารละลาย substrate (1% casein ใน 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 7.75)
2. สารละลาย 5% trichloroacetic acid
3. สารละลายพืษงูความเข้มข้น 1 mg/ml ในสารละลาย normal saline 0.9 %

วิธีทดสอบ

1. เติมสารละลายพืษงู 0.1 ml ในสารละลาย substrate 1% casein 2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37^oซ นาน 30 นาที
2. เมื่อบ่มครบ 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 5% trichloroacetic acid 2 ml
3. ปั่นแยกตะกอนด้วย centrifuge ที่แรงเหวี่ยง 10,000 g นาน 10 นาที

4. นำ Supernatant ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง หาค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย

5. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย ไปหา proteolytic activity ของตัวอย่างจากนิยามว่า 1 Unit ของ protease activity คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ที่เพิ่มขึ้น 1 หน่วยในเวลา 1 ชม.

การหาความเป็นพิษ (Minimum Lethal Dose, LD₅₀)^(6,25,26)

สัตว์ทดลอง

หนู mouse สายพันธุ์ ICR breed (*Mus musculus*) จากสถานีเพาะเลี้ยงม้า และ สัตว์ทดลอง สถานเสาวภา

การเตรียมสารละลายพิษงู

จาก LD₅₀ ของพิษงูจงอางที่อยู่ระหว่าง 25.4 และ 50.0 µg/หนูหนัก 20 g เฉลี่ยได้ 37.7 µg /หนูหนัก 20 g การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาความเข้มข้นของพิษที่เหมาะสมสำหรับทดสอบหา LD₅₀ ของพิษงูจงอางที่ใช้ในโครงการวิจัยในหนู ความเข้มข้นละ 3 ตัว จึงกำหนดให้อยู่ระหว่าง 17.9-96.0 µg /หนูหนัก 20 g (จากค่ากลาง 35.0 µg /หนูหนัก 20 g อัตราส่วนการเจือจาง 1:1.4) ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทดสอบหา LD₅₀ ในโครงการวิจัยนี้ดังนี้

พิษงูรุ่น OH 260542(2)	24.9, 34.9, 48.9 และ 68.6 µg /หนูหนัก 20 g
พิษงูรุ่น OH 150948-43/2	68.6, 96.0, 134.5 และ 188.2 µg /หนูหนัก 20 g
พิษงูรุ่น OHFARM 031048/2	34.9, 48.9 68.6 และ 96.0 µg /หนูหนัก 20 g

วิธีทดสอบ

1. ฉีดพิษงูเข้าเส้นเลือดที่หางหนูความเข้มข้นละ 5 ตัว คัดตามอาการ 24 ชม
2. บันทึกจำนวนหนูรอดชีวิต และ หนูตายแต่ละความเข้มข้น
3. รวมจำนวนหนูรอดชีวิตจากพิษงู ความเข้มข้นมากไปน้อย
4. รวมจำนวนหนูตายจากพิษงูความเข้มข้นน้อยไปหามาก
5. นำจำนวนรวมหนูรอดชีวิต, หนูตาย, ความเข้มข้นของพิษงูที่ใช้ในการทดสอบ และ อัตราส่วนการเจือจางพิษงู ไปคำนวณหา LD₅₀ จากสมการ

$$\text{Log LD}_{50} = \log D_a - [(\text{Proportional distance}) \times (\log \text{ of dilution factor})]$$

เมื่อ

D_a = venom dose which obtained percent death next above 50%

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

การศึกษาฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)⁽²⁵⁾

การเตรียมเม็ดเลือดแดงแขวนตะกอน (RBC suspension preparation)

1. นำเลือดที่ได้จากคน (citrated whole blood) มาปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อแยกเม็ดเลือด
2. นำเม็ดเลือดแดงที่ได้จากข้อ 1 มาล้างด้วย normal saline 0.9% หลายๆ ครั้งจน supernatant ใส
3. เตรียมเม็ดเลือดแดงแขวนตะกอนใน normal saline 0.9% ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm เท่ากับ 0.8

วิธีทดสอบ

1. เตรียม Blank โดยการเติม normal saline 0.25 ml ในเม็ดเลือดแดงแขวนตะกอน 1 ml เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 5 ชม. หลังจากนั้นเติม normal saline 3 ml
2. ปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วนำ Blank ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
3. เตรียม Control (100% hemolysis) โดยเติม น้ำกลั่น 0.25 ml ในเม็ดเลือดแดงแขวนตะกอน 1 ml เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 5 ชม. หลังจากนั้นเติม น้ำกลั่น 3 ml
4. ปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกัน บันทึกค่าการดูดกลืนแสงไว้
5. เตรียม ตัวอย่าง โดยเติมสารละลายพิษงู 0.25 ml ในเม็ดเลือดแดงแขวนตะกอน 1 ml เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 5 ชม. หลังจากนั้นเติม normal saline 3 ml
6. ปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกัน บันทึกค่าการดูดกลืนแสงไว้ แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง หากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
7. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของ control และ ตัวอย่าง ไปคำนวณหาประสิทธิภาพการทำลายเม็ดเลือดแดงเป็นร้อยละของตัวอย่างเมื่อเทียบกับ control ตามสูตร

$$\text{ประสิทธิภาพการทำลายเม็ดเลือดแดงของตัวอย่าง} = \frac{A_s - A_c}{A_c} \times 100$$

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

A_c = ค่าการดูดกลืนแสงของ control

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอาง (Neurotoxicity)⁽²⁷⁾

สัตว์ทดลอง

หนูพันธุ์ Swiss albino mice เพศผู้ น้ำหนัก 30-40 กรัม จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย (มาตรฐาน GMP) พักสัตว์ก่อนทำการทดลองที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (มาตรฐาน SPF) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้อายุ 12 ชั่วโมง light/dark cycle โดยไม่จำกัดอาหารและน้ำ

เครื่องมือและอุปกรณ์

ชุดอุปกรณ์ Organ bath แบบ Double Walled Harvard Type ขนาด 25 ml ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น มีช่องเปิดให้ Gas Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) ไหลผ่านเข้าสู่ชั้นในซึ่งใช้บรรจุ Physiological Solution สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนอยู่เพื่อควบคุมอุณหภูมิของ Oxygenated Physiological Solution ที่อยู่ชั้นในให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส ตลอดจนการทดลอง โดยใช้ Thermo regulating water pump

ถังบรรจุก๊าซ Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂)

เครื่องรับสัญญาณสำหรับวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ

เครื่องแปลงสัญญาณ

เครื่องปรับแต่งสัญญาณ Bridge Amp

เครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผลรุ่น Biopac Lab Pro MP100

เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (stimulator)

Suction electrode และ unipolar electrode

ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก

เครื่องชั่งแบบละเอียด

โหลมีฝาปิดซึ่งมีท่อต่อไปยังถังก๊าซ carbogen

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลาย Krebs solution

- Sodium chloride (Merck, Germany); Potassium chloride (Merck, Germany); Calcium chloride (Merck, Germany); Magnesium sulphate (Merck, Germany); Potassium dihydrogen Phosphate (Merck, Germany); Sodium hydrogen carbonate (Merck, Germany); Glucose (Merck, Germany)

สารทดสอบ

- พิษงูจงอาง (crude venom) จัดซื้อจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย อยู่ในรูปผงแห้ง สีเหลืองอ่อน ได้จากงูจงอางที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในเขตจังหวัดเพชรบูรณ์ ในการทดลองจะละลายพิษงูด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation

ทำการสลบหนูด้วย CO_2 (95% CO_2 + 5% O_2) โดยใส่หนูลงในโหลมีฝาปิดที่ต่อกับถังบรรจุก๊าซ CO_2 เปิดให้ก๊าซ CO_2 เข้าไปในโหล และเฝ้าสังเกตว่าหนูสลบลึกจนหมดความรู้สึก และตายในที่สุด จากนั้นทำการผ่าตัดแยก mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ทันที

นำ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm มาใส่ใน organ bath ที่บรรจุ oxygenated (95% O_2 + 5% CO_2) Krebs solution ซึ่งส่วนประกอบและวิธีเตรียมแสดงไว้ในภาคผนวก สำหรับเลี้ยงกล้ามเนื้อกระบังลม ผูกปลายล่างของกล้ามเนื้อยึดกับก้น organ bath ผูกปลายบนกับตะขอที่ต่อกับ transducer แยกกล้ามเนื้อกระบังลมไว้ภายใต้แรงตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 0.8 กรัม และอุณหภูมิ 37 °C ส่วนเส้นประสาท phrenic nerve จะถูกสอดไว้ใน suction electrode เพื่อไม่ให้เกิดการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงเมื่อทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

2. ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าโดยใช้ suction electrode (control, n = 5)

เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 1

พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibrium) 30 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาดต่างๆ โดยเริ่มต้นที่ 0.5 โวลต์ ในความถี่ (frequency) 0.1 Hertz (Hz) และระยะเวลาในการกระตุ้น (duration) 0.2 millisecond (ms) โดยใช้ suction electrode

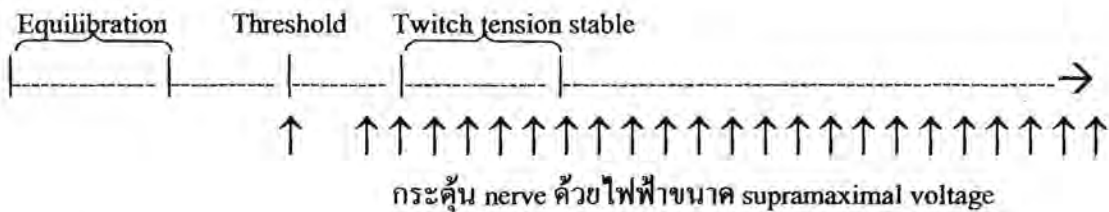
สังเกตกระแสไฟฟ้าที่ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (ระดับ Threshold) และบันทึกค่าแรงตึงที่เกิดขึ้นจากการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension)

คำนวณหา supramaximal voltage (4 x Threshold) จากกระแสไฟฟ้าระดับ Threshold

หยุดกระตุ้นด้วยไฟฟ้าและพักประมาณ 5 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode

บันทึกค่า twitch tension ตามเวลาต่าง ๆ จนกระทั่งไม่มีการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension มีค่าเท่ากับ resting tension) แสดงว่ากล้ามเนื้อไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา จะได้ระยะเวลาที่กล้ามเนื้อมีความคงทนสามารถเกิดการหดตัวได้เมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า เลือกช่วงเวลาที่กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวคงที่มาใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 2 ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลมเมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า โดยใช้ Suction electrode

3. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอาง (n = 5)

3.1 เตรียม mouse phrenic nerve — hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 1

3.2 พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้น ทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode

3.3 บันทึกค่า twitch tension และปล่อยให้ twitch tension มีความคงที่ (stable) 10 นาที

3.4 ทำการทดสอบผลของพิษงูจงอางต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยใช้พิษงูจงอางที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μ l ให้ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 หรือ 160 μ g/ml ใน organ bath

3.5 บันทึกค่า twitch tension ที่เปลี่ยนแปลงหลังให้พิษงูจงอางในแต่ละความเข้มข้น สังเกตผลต่อไปจนกระทั่ง twitch tension คงที่ (ระยะเวลาที่คงที่ควรอยู่ในช่วงที่ twitch tension มีความคงที่)

3.6 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับความเข้มข้นของพิษงูจงอางที่ใช้ ทำการเลือกความเข้มข้นของพิษงูจงอางน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทมากที่สุด และความเข้มข้นนั้นต้องให้ผลคงที่เช่นเดิมเมื่อมีการทำซ้ำใหม่ (reproducible)

3.7 ใช้ความเข้มข้นของพิษงูจงอางที่เลือกไว้เป็นค่าตั้งต้นในการคำนวณหาความเข้มข้นของ F1 — F7 ซึ่งจะคำนวณตาม % yield ของโปรตีน ที่ได้จากการแยกส่วนของแต่ละ fraction

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูหรือส่วนของพิษงู โดยพิจารณา twitch tension (%) กับเวลา แสดงผลโดยใช้ค่าเฉลี่ยร้อยละ \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean \pm S.E.M.) ทดสอบค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA (Tukey) และ paired t-Test พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

การหา Minimum coagulation dose (MCD-F)⁽²⁶⁾

สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. สารละลาย 0.2 % bovine fibrinogen (Fibrinogen from bovine plasma Type IV (Sigma) Cat. No. F 4753 Lot no. 072 K 7604)
2. สารละลายพินูจของาง ความเข้มข้น 0.5 – 240 µg/ml ใน normal saline 0.9%

วิธีทดสอบ

เติมสารละลายพินูจ 50 (µL) ในหลอดทดลองที่มี สารละลาย 0.2 % bovine fibrinogen 0.2 ml โดย หลอดทดลองแช่ใน water bath อุณหภูมิ 37^oซ จับเวลาที่พินูจแต่ละตัวอย่างทำให้เกิด clot ทำซ้ำ 3 ครั้ง หา เวลาเฉลี่ยการเกิด clot นำความเข้มข้นของพินูจ และ เวลาเฉลี่ยการเกิด clot ของสารละลายพินูจแต่ละความเข้มข้นไป plot กราฟ อ่านค่า MCD-F คือความเข้มข้นของพินูจที่ทำให้เกิด clot ที่เวลา 60 วินาที หมายเหตุ หากพินูจช่วงความเข้มข้นที่เตรียมไม่ทำให้เกิด clot ภายใน 60 วินาที ให้ถือว่าพินูจนั้น ไม่มี MCD-F

การหา Minimum coagulation dose (MCD-P)⁽²⁶⁾

สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. สารละลาย 0.2 % standard human plasma (Essentially plasmino(gen) free (Sigma) Cat. No. F 4883 Lot no. 015 K 7555 fibrinogen content 2.8 g/L)
2. เตรียมพินูจของาง ความเข้มข้น 0.5 – 240 µg/ml ใน normal saline

วิธีทดสอบ

เติมสารละลายพินูจ 50 µL) ในหลอดทดลองที่มี สารละลาย 0.2 % standard human plasma 0.2 ml ซึ่งแช่ใน water bath อุณหภูมิ 37^oซ จับเวลาที่พินูจแต่ละตัวอย่างทำให้เกิด clot ทำซ้ำ 3 ครั้ง หาเวลาเฉลี่ย การเกิด clot นำความเข้มข้นของพินูจ และ เวลาเฉลี่ยการเกิด clot ของสารละลายพินูจแต่ละความเข้มข้นไป plot กราฟ อ่านค่า MCD-P คือ ค่าความเข้มข้นของพินูจที่ทำให้เกิด clot ที่เวลา 60 วินาที หมายเหตุ หากพินูจช่วงความเข้มข้นที่เตรียมไม่ทำให้เกิด clot ภายใน 60 วินาที ให้ถือว่าพินูจนั้น ไม่มี MCD-P

การศึกษาฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งของพิษงูจงอาง (Cytolytic activity)⁽²⁸⁾

การเตรียมเซลล์

เลี้ยงเซลล์ Human Gastric carcinoma (KATA III), Human Duetol carcinoma (BT 474), Human Colon adenocacinoma (SW620), Human Liver hepatablastoma (HEP-G₂), Human Lung undifferentiated (Chago) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม fetal bovin serum 5 % บ่มภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ ออก เติม 2 ml 0.05 % Trypsin ที่มี 0.01% EDTA ตั้งทิ้งไว้จนเซลล์หลุด คูด trypsin ทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เกลาะให้เซลล์หลุดเป็นเซลล์เดี่ยว

การเตรียมพิษงู

จากสารละลายพิษงูจงอางความเข้มข้น 1 mg/ml เจือจางด้วย normal saline ให้เป็นสารละลายพิษงูจงอางความเข้มข้น 10 µg/ml จากนั้นเจือจางแบบ serial dilution 1:10 ด้วย normal saline เพื่อให้ได้สารละลายพิษงูจงอางความเข้มข้น 1, 0.1, 0.01, 0.001 µg/ml ตามลำดับ

การศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (Cell Proliferation)

1. เติมเซลล์มะเร็งที่เตรียมไว้ โดย เจือจางให้มีความเข้มข้น 2.5×10^4 เซลล์/ml ปริมาตร 200 µl ใส่ในเพลท 96 หลุม แต่ละหลุมบ่มภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติมพิษงูที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 2 µl ต่อหลุม บ่มไว้ เป็นเวลา 3 วัน
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 คูด media ทิ้ง (หลุม control ไม่เติม MTT)
4. เติม 100 % DMSO ปริมาตร 150 µl ต่อหลุม เขย่าบน plate mixer 5 นาที
5. เติม สารละลาย 0.1 M glycine pH 10.5 ปริมาตร 25 µl ต่อหลุม เขย่านาน 5 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ทำซ้ำ 5 ครั้ง และหาค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
7. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมา plot กราฟหาความเข้มข้นของพิษงูจงอางที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 50 % (IC 50)

ผลการวิจัยและอภิปราย

การรวบรวมพิษงอง

ตามแผนงานเดิมวางไว้ว่าจะได้พิษงองทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ในลักษณะพิษแห้ง แต่พิษงองแห้งมีไม่เพียงพอที่จะจำหน่ายให้ เนื่องจากทางสถานเสาวภาจะต้องเก็บเป็น stock สำหรับใช้ในงานผลิตเซรุ่มแก้พิษงู จึงรวบรวมพิษงอง โดยรีดพิษสดจากงูจางในโครงการเพาะเลี้ยงงู และในสวนงูของสถานเสาวภา แยกพิษงูเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 พิษงอง(เพชรบูรณ์) เป็นพิษของงูจางฟักจากไข่ที่ได้มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ อายุ 3 ปี (5 ขวด)และ 9 ปี (3 ขวด) กลุ่มที่ 2 พิษงอง(ภาคใต้) เป็นพิษของงูจางฟักจากไข่ที่ได้มาจากภาคใต้ อายุ 5 ปี (6 ขวด) และกลุ่มที่ 3 พิษงอง(สวนงู) เป็นพิษของงูจางในสวนงู (2 ขวด) ได้มาจากภาคใต้ แล้วทำเป็นผงแห้งโดยวิธี lyophilization ทั้งหมด 16 ขวด จำนวน 9 lots ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง Lot และที่มาของพิษงอง

พิษงูตัวอย่างที่	Lot No.	จำนวน (ขวด)	น้ำหนักรวม (กรัม)	ที่มาของงูจาง	สถานที่เลี้ยงงู	อายุของงู (ปี)
1	OH250142(1)	2	3.8212	เพชรบูรณ์	โครงการเพาะเลี้ยงงู	3
2	OH260542(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	-

การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของพิษงอง

รวบรวมพิษงอง โดยรีดพิษสดจากงูจางในโครงการเพาะเลี้ยงงู และในสวนงูของสถานเสาวภา แล้วทำเป็นผงแห้งโดยวิธี lyophilization สังเกตลักษณะเฉพาะของพิษงอง ทางกายภาพ และบันทึก ดังแสดงผลในตารางที่ 2 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพพบว่า ลักษณะพิษงูแห้ง lot 1 และ lot 2 เป็นผงละเอียด ส่วนพิษงอง lot อื่นๆมีลักษณะเป็น cake และมีลักษณะเป็นฟองอากาศ ซึ่งอาจเป็นเพราะมีการเกิดเป็นฟองในขั้นตอนการทำแห้ง พิษงูแห้งมีสีครีมและสีเหลือง

ตารางที่ 2 ลักษณะเฉพาะทางกายภาพ และปริมาณโปรตีนของพิษงูจงอาง

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

การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของพิษงูจงอาง

การวัดปริมาณโปรตีน

นำพิษงูทุก lot วัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยใช้ Bovine serum albumin เป็น โปรตีนมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 จากการพิจารณาผลตามตารางที่ 1 และ 2 พบว่าปริมาณ โปรตีนในพิษของงูจงอางที่มีอายุเท่ากันมีค่าใกล้เคียงกัน พิษงูจงอาง(เพชรบูรณ์)ที่มีอายุ 3 ปีมีปริมาณ โปรตีนในพิษเท่ากับ 24.99 และ 24.56 % พิษงูจงอาง(เพชรบูรณ์)ที่มีอายุ 9 ปีมีปริมาณ โปรตีนในพิษเท่ากับ 28.21 และ 26.55% ส่วนพิษงูจงอาง(ภาคใต้)และพิษงูจงอาง(สวนงู)พบว่ามีปริมาณ โปรตีนน้อยกว่า เมื่อนำไปสัมพันธ์กับสีของพิษงูแห่ง พบว่าปริมาณ โปรตีนกับสีของพิษงูแห่งไม่มีความสัมพันธ์กัน

การวัด activities ของเอนไซม์ในพิษงูจงอาง

นอกจากนี้ได้นำไปวัด activities ของเอนไซม์ Phosphomonoesterase, Phosphodiesterase, Proteolytic activity, Phospholipase A₂, L-amino acid oxidase และ Acetylcholinesterase ดังแสดงผลในตารางที่ 3 สำหรับการวัดความเป็นพิษ (Lethal toxicity, LD₅₀) จากผลการวัด activities ของ enzymes ทั้ง 5 พบว่า

1. พิษงูของงูจงอางที่ได้มาจากเพชรบูรณ์มีความเป็นพิษมากกว่างูจงอางที่ได้มาจากภาคใต้

2. พิษของงูจงอางที่ได้จากธรรมชาติพบว่ามี activity ของเอนไซม์ Phosphomonoesterase และ proteolytic activity สูงกว่าพิษงูที่ได้จากงูจงอางที่เลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยงงู
3. พิษของงูจงอางที่ได้จากธรรมชาติพบว่ามี activity ของเอนไซม์ L-amino acid oxidase ต่ำกว่าพิษงูที่ได้จากงูจงอางที่เลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยงงู

พิษงูจงอางที่นำมาศึกษามี L-amino acid oxidase activity สูงกว่าพิษของงูจงอางจากมาเลเซีย พิษของงูจงอางจากภาคใต้ และพิษของงูจงอางที่ซื้อมาจาก Miami Serpentarium Laboratories ที่ Tan และ Saifudden⁽⁶⁾ ศึกษาไว้

ตารางที่ 3 Enzymatic activities และ Lethal toxicity ของพิษงูจงอาง

Sample no.	Lot	LD ₅₀ µg/mouse	Phosphomono- esterase(U)	Phosphodi- esterase(U)	Proteolytic activity (U)	PLA ₂ (U)	L-amino acid oxidase(U)	Acetylcholin- esterase mmole/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

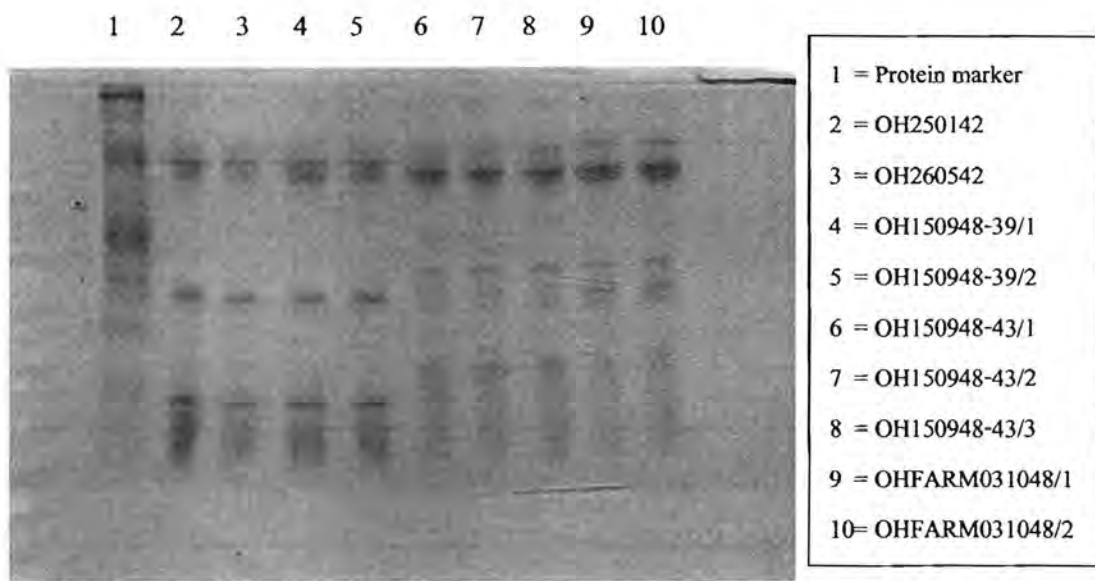
การศึกษาารูปแบบโปรตีนของพิษงูจงอางโดยเทคนิค SDS-PAGE

ได้นำพิษงูทั้ง 9 lots มาศึกษาารูปแบบโปรตีน โดยเทคนิค Sodium dodecyl sylphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าพิษงู(เพชรบูรณ์) lot 2 มีแถบโปรตีนบางแถบแตกต่างจากแถบโปรตีนของพิษงู(ภาคใต้)และพิษงู(สวนงู) (ภาพที่ 3) แถบโปรตีนที่ได้จะมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 66-14 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนของพิษงู(เพชรบูรณ์)มีความเข้มมากกว่าแถบโปรตีนของพิษงู(ภาคใต้)และพิษงู(สวนงู) จากความแตกต่างของความเข้มและจำนวนแถบโปรตีนในตัวอย่างพิษงูซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่พิษงูแต่ละตัวอาจมีความเป็นพิษที่แตกต่างกัน

การศึกษาารูปแบบโปรตีนของพิษงูจงอางโดยเทคนิค 2-dimensional electrophoresis

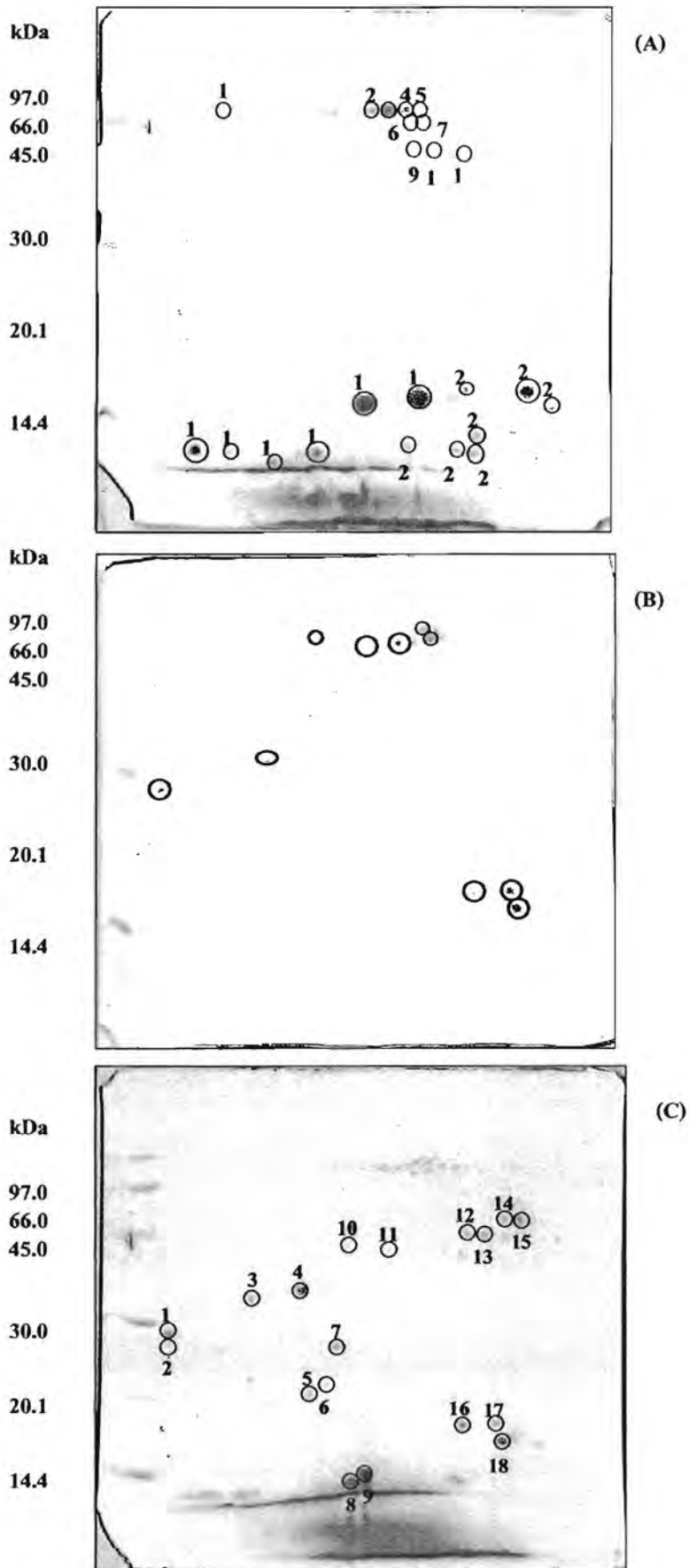
นำพิษงูจงอาง lot 2 (OH 260542), lot 6(OH150948-43) และ lot 9(OHFARM031048)

ศึกษารูปแบบ โปรตีน โดยใช้เทคนิค 2-dimensional electrophoresis เพื่อให้เห็นรูปแบบ โปรตีนชัดเจนมากขึ้น
 ดังผลในภาพที่ 4(A),(B) และ (C) ซึ่งพบว่าพิษงูจงอาง(เพชรบูรณ์) มีโปรตีนมากชนิดกว่าพิษงูจงอาง(ภาคใต้)
 โดยเฉพาะในช่วงมวล โมเลกุลต่ำกว่า 14.4 กิโลดาลตัน การกระจายตัวของจุดโปรตีนคล้ายคลึงกันคืออยู่
 ในช่วงของความเป็นกรด และมีมวล โมเลกุลต่ำ เช่นเดียวกับงานของ Nawarak⁽¹⁸⁾ ถ้าพิจารณาในแง่อายุของงู
 จะเห็นว่าพิษที่มาจากงูอายุน้อยมีโปรตีนมากกว่าพิษงูที่มาจากงูอายุมาก



ภาพที่ 3 รูปแบบ โปรตีนของพิษงูจงอาง(จังหวัดเพชรบูรณ์)(2-5) พิษงูจงอาง(ภาคใต้)
 (6-8) และพิษงูจงอาง(ภาคใต้/สวนงู) (9-10) โดยใช้นี้เทคนิค SDS-PAGE

pI 7 \longrightarrow 4



ภาพที่ 4 รูปแบบโปรตีนของพืชมงอ 3 ตัวอย่าง โดยเทคนิค 2-DE
(A):พืชมงอ lot 2, (B):พืชมงอ lot 6 และ (C): พืชมงอ lot 9

การศึกษา biological activities ของพิษงูจงอาง

ได้นำพิษงูจงอางทั้ง 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 พิษของงูที่สกัดจากไขที่ได้มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ กลุ่มที่ 2 พิษของงูที่สกัดจากไขที่ได้มาจากภาคใต้ และกลุ่มที่ 3 พิษของงูจงอาง ได้มาจากภาคใต้และเลี้ยงในสวนงูมาศึกษา hemolytic activity, neurotoxicity, coagulation activity ตามวิธีของ Theakston and Reid⁽²⁶⁾ และ cytotoxicity โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เทียบกับยาค้านมะเร็ง Doxorubicine โดยพิจารณาจากค่า IC 50 (Inhibition concentration 50) คือความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) เซลล์มะเร็งปอด (Chago) เซลล์มะเร็งตับ (hep-G2) เซลล์มะเร็งกระเพาะ (KATO-III) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ผลการศึกษาได้สรุปไว้ในตารางที่ 4 และ 5 ซึ่งพบว่าผลงูทุก lots ไม่มี coagulation activity neurotoxicity ของพิษงูจงอางมีความสอดคล้องกับค่าความเป็นพิษ (LD₅₀) จะเห็นว่าความเป็นพิษของพิษงูจงอางกลุ่มที่ 1 ที่มาจากเพชรบูรณ์มีความเป็นพิษสูงที่สุด รองลงมา คือ พิษงูกลุ่มที่ 3 มาจากภาคใต้และเลี้ยงในสวนงู และพิษงูจงอางจากภาคใต้และเลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยงงูมีความเป็นพิษต่ำสุด ผลของ neurotoxicity ได้ผลทำนองเดียวกัน คือ พิษงูจงอางกลุ่มที่ 1 มี neurotoxicity มากกว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ตามลำดับ (กลุ่มที่ 1 > กลุ่มที่ 2 > กลุ่มที่ 3) ผลการศึกษา hemolytic activity พบว่าพิษงูกลุ่มที่ 3 มี hemolytic activity สูงกว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 1

ส่วนการศึกษา cytotoxicity โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเทียบกับยาค้านมะเร็ง Doxorubicine พบว่าพิษงูจงอางกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นงูจากภาคใต้และนำมาเลี้ยงในสวนงู (แบบธรรมชาติ) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม ปอด ตับ กระเพาะอาหาร ต่ำกว่าพิษงูจงอางกลุ่มอื่นและยาค้านมะเร็ง แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้เทียบเท่าพิษงูอื่นๆ พิษงูจงอางกลุ่มที่ 1 และ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร ได้ดีกว่ายาค้านมะเร็ง Doxorubicine (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 Biological activities ของพิษงูจงอาง

Sample No	Lot	Protein content (BSA* equivalent) (%)	Coagulation		Hemolytic activity (DW Equ.) %	Neurotoxicity 50%inhibition ^(a) Min.
			MCD-P** mg/L	MCD-F*** mg/L		
1	OH 250142(1)	24.99	NA	NA	1.94	
2	OH 260542(2)	24.56	NA	NA	-	4.20
3	OH 150948-39/1	28.21	NA	NA	0.80	
4	OH 150948-39/2	26.55	NA	NA	0.91	
5	OH 150948-43/1	20.24	NA	NA	10.39	
6	OH 150948-43/2	19.39	NA	NA	8.68	7.74
7	OH 150948-43/3	20.36	NA	NA	0.91	
8	OHFARM 031048/1	23.35	NA	NA	-	
9	OHFARM 031048/2	23.36	NA	NA	11.53	6.44

ตารางที่ 5 การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆโดยพิษงองออง

สาร	IC ₅₀ (μg/ml)				
	BT474 ⁽¹⁾	Chago ⁽²⁾	Hep-G ₂ ⁽³⁾	KATO-III ⁽⁴⁾	SW620 ⁽⁵⁾
OH 260542(2)	0.88	0.67	0.79	0.63	0.62
OH 150948-43/2	0.94	0.72	0.67	0.85	0.68
OHFARM 031048/2	6.30	6.60	6.52	6.28	0.67
Doxorubicine	0.70	0.55	0.61	>10	0.10

⁽¹⁾ เซลล์มะเร็งเต้านม ⁽²⁾ เซลล์มะเร็งปอด ⁽³⁾ เซลล์มะเร็งตับ

⁽⁴⁾ เซลล์มะเร็งกระเพาะ ⁽⁵⁾ เซลล์มะเร็งลำไส้

สรุปผลและแนะนำการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางแห่งทั้ง 3 กลุ่มโดยศึกษาลักษณะทางกายภาพ ทางชีวเคมีและทางชีวภาพ พบว่า พิษงูจงอางแห่งมีลักษณะทางกายภาพที่เห็นด้วยตาเปล่าเป็นผงละเอียด และอาจมีสีครีม จนถึงเหลือง ปริมาณโปรตีนในพิษงูจงอางแห่งที่ใช้ศึกษาอยู่ในช่วง 20-28% และสังเกตพบว่าพิษงูจงอางที่เกิดจากการฟักไข่ ซึ่งมาจากเพชรบูรณ์ จะมีปริมาณโปรตีนมากกว่าพิษงูจงอางที่เกิดจากการฟักไข่ซึ่งมาจากภาคใต้ และพิษงูจงอางจากภาคใต้ ปริมาณโปรตีนแปรตามอายุพิษของงูจงอาง อายุมากมีปริมาณ โปรตีนสูงกว่าพิษงูจงอางที่มีอายุน้อย การศึกษาความเป็นพิษและ neurotoxicity พบว่าพิษของงูจงอางที่เกิดจากการฟักไข่ซึ่งมาจากเพชรบูรณ์มีความเป็นพิษและ neurotoxicity สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE และจุดโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วย 2-DE อยู่ในช่วงมวลโมเลกุลที่ต่ำอยู่มากกว่า ซึ่ง post-synaptic neurotoxin จะมีมวลโมเลกุลไม่ถึง 10 กิโลดาลตัน

การศึกษา Enzyme activity และฤทธิ์ทางชีวภาพของพิษงูจงอางพบว่า พิษงูจงอางทุก lot มี activity ของเอนไซม์ Phosphomonoesterase, Phosphodiesterase, Phospholipase A₂, Acetylcholinesterase ใกล้เคียงกัน ค่าความแตกต่างเพียงเล็กน้อย ซึ่งน่าจะเป็นความแตกต่างที่เกิดระหว่างตัวอย่าง (intraspecific variation หรือ individual variation) ส่วน L-amino acid oxidase activity สังเกตเห็นว่าสอดคล้องกับความสามารถในฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างพิษงูจงอางที่มี L-amino acid oxidase activity สูงจะพบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูง ลักษณะของฤทธิ์ทางชีวภาพ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเป็นลักษณะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาวิจัย และนำไปพัฒนาสารที่มีฤทธิ์เป็นยาด้านมะเร็งต่อไป

ข้อมูลจากการศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางในงานวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้เป็นมาตรฐานของพิษงูจงอางที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางยา ซึ่งสอดคล้องกับ Standard assay procedures สำหรับ characterization พิษงูที่ WHO⁽²⁶⁾ แนะนำไว้

นอกจากนี้จากผลการวิจัยนี้พบว่า ส่วนประกอบของพิษงูที่ได้จากงูจงอางที่มาจากต่างท้องถิ่น จะมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะความเป็นพิษของพิษงู แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการวิจัยนี้ได้จากตัวอย่างพิษงูไม่มากพอที่จะสรุปได้อย่างหนักแน่น หากเป็นไปได้ควรทำการศึกษาวิจัยส่วนประกอบของพิษงูที่ได้จากพิษงูที่มาจากท้องถิ่นต่างๆ ทั่วประเทศไทย เพื่อจะได้ข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

1. Stupak HD, Maas CS. New procedures in facial plastic surgery using botulinum toxin A. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2003;11(4):515-20.
2. Vartanian AJ, Dayan SH. Complications of botulinum toxin A use in facial rejuvenation. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2003;11(4):483-92.
3. Stocker KF. Research, Diagnostic and Medicinal uses of snake venom enzymes. In: *Enzymes from snake venom*. Bailey GS (ed.). Colorado: Fort Collins. Alaken Inc., 1998: 705-36
4. Ferreira SH, Vane JR. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. *Br J Pharm Chemother* 1967;30: 417-24.
5. Smith CG, Vane JR. The discovery of captopril. *FASEB J* 2003;17:788-9.
6. Tan NH, Saifuddin MN. Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom and venom fractions. *Toxicon* 1989; 27(6): 689-95.
7. Tan NH, Saifuddin MN. Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *Toxicon* 1990; 28(4): 385-92.
8. Jintakune P, Chanhom L. Venomous snakes of Thailand. In: Queen Saovabha Memorial Institute Ed. *Venomous snakes in Thailand*. Bangkok: People Publisher, 1995:58-137.
9. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 1991;29(11):1279-303.
10. He YY, Lee WH, Zhang Y. Cloning and purification of α -neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon* 2004; 44: 295-303.
11. Pu XC, Wong PTH, Gopalakrishnakone P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon* 1995; 33: 1425-31.
12. Sherman DG, Atkinson RP, Chippendale T, *et al*. Intravenous ancrod for treatment of acute ischemic stroke: the STAT study: a randomized controlled trial. *Stroke Treatment with Ancrod Trial. JAMA* 2000;283 (18): 2395-403.
13. Hartman GD, Egbertson MS, Halczenko W, Laswell WL, Duggan ME, Smith RL, Naylor AM, Manno PD, Lynch RJ. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Discovery and design of exosite inhibitors. *J Med Chem* 1992; 35 (24): 4640-2.
14. Swenson S, Costa F, Ernst W, Fujii G, Markland FS. Contortrostatin, a Snake Venom Disintegrin with Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity. *Pathophysiol Haemos Thromb* 2005;34:169-76.

15. Du X-Y , Clemetson KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon* 2002; 40(6) :659-65.
16. Bradford MN. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72: 248-54.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
18. Nawarak J, Sirichaikul S, Wu C-Y, Lian M-Y, Phutrakul S, Chen S-T. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis* 2003; 24: 2838-54.
19. Berkelman, T., and Stenstedt, T. 2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients: Principle and Methods. Sweden: Amersham Biosciences AB, 1998.
20. Tan NH, Kanthimathi MS, tan CS. Enzymatic activities of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. *Toxicon.* 1986; 24: 626.
21. Tan NH, Tan CS. Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension substrate. *Analyt. Biochem.* 1988; 170:282.
22. Tan NH, Tan CS. Thermal stability of snake venom enzymatic activities. In: *Progress in Venom and Toxin Research.* Gopalakrishnakone P, Tan CK (eds.) Singapore: National University of Singapore. 1987 : 188.
23. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr. Featherstone RM. A new and rapid colourimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmac.* 1961; 7: 88.
24. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor II general properties. *J gen Physiol.* 1946; 30: 291-310.
25. Karlson E, Amberg H, Eaker D. Isolation of the principle neurotoxins of two *Naja naja* subspecies. *Eur J Biochem.* 1971; 21: 1-16.
26. Theakston RDG, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull Wld Org.* 1983; 61: 949-56.
27. Bülbring, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *British Journal of Pharmacology* 1 (1946): 38-61.
28. Iwaguchi T, Takechi M, Hayashi K. Cytolytic activity of cytotoxin isolated from Indian cobra venom against experimental tumor cells. *Biochem Int* 1985;10:343-9.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

1. ชุดน้ำย้าวัดปริมาณโปรตีน Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD) ประกอบด้วย

1.1 **Bradford reagent** : เป็นน้ำยาสำเร็จรูป ที่มี 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml 95% ethanol และ 100 ml 85% (w/v) phosphoric acid.

1.2 **Color reagent** : นำ Bradford reagent 1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่น 4 ส่วน แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman # 1 ก่อนนำไปใช้

1.3 **Standard Protein Solution (BSA)** ความเข้มข้น 1 mg/ml

ภาคผนวก ข

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

1. Stock Solutions

A. 2 M Tris-HCl (pH 8.8), 100 ml

	Final concentration	Amount
Tris-base	2 M	24.2 g
Distilled water		50 ml
HCl		adjust to pH 8.8
Distilled water		to 100 ml

B. 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 100 ml

	Final concentration	Amount
Tris-base	1 M	12.1 g
Distilled water		50 ml
HCl		adjust to pH 6.8
Distilled water		to 100 ml

C. 10% SDS (w/v), 100 ml

	Final concentration	Amount
SDS	10% (w/v)	10 g
Distilled water		to 100 ml

D. 50% glycerol (v/v), 100 ml

	Final concentration	Amount
100% glycerol	50% (v/v)	50 ml
Distilled water		to 50 ml

E. 1% bromophenol blue (w/v), 10 ml

	Final concentration	Amount
Bromophenol blue	1% (w/v)	100 mg
Distilled water		to 10 ml

2. Working Solutions

A. Solution A (acrylamide stock solution) (30% acrylamide, 0.8% N, N'-methylenebisacrylamide)

	Final concentration	Amount
Acrylamide	30% (w/v)	29.2 g
N, N'-methylenebisacrylamide	0.8% (w/v)	0.8 g
Distilled water		to 100 ml

B. Solution B (4x separating gel buffer) (2 M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS)

	Final concentration	Amount
2 M Tris-HCl (see stock solution A)	1.5 M	75 ml
10% SDS (see stock solution C)	0.4% (v/v)	4 ml
Distilled water		to 100 ml

C. Solution C (4x stacking gel buffer) (1 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS)

	Final concentration	Amount
1 M Tris-HCl (see stock solution B)	0.5 M	50 ml
10% SDS (see stock solution C)	0.4% (v/v)	4 ml
Distilled water		to 100 ml

D. 10% Ammonium persulfate

	Final concentration	Amount
Ammonium persulfate	10%	0.5 g
Distilled water		to 5 ml

E. Electrophoresis buffer

	Final concentration	Amount
Tris-base	25 mM	3 g
Glycine	192 mM	14.4 g
SDS	0.1% (w/v)	1 g
Distilled water		to 1000 ml

F. 5x Sample buffer (1 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol)

	Final concentration	Amount
1 M Tris-HCl (see stock solution B)	60 mM	0.6 ml
50% glycerol (see stock solution D)	25% (v/v)	5 ml
10% SDS (see stock solution C)	2% (v/v)	2 ml
2-mercaptoethanol	14.4 mM	0.5 ml
Distilled water		to 10 ml

3. Coomassie gel stain

	Amount
Coomassie blue R-250	1.0 g
Methanol	450 ml
Glacial acetic acid	100 ml
Distilled water	450 ml

4. Coomassie gel destain

	Amount
Methanol	100 ml
Glacial acetic acid	100 ml
Distilled water	800 ml

5. Gel preparation

	Separating gel (10 ml)	Stacking gel (4 ml)
Solution A	5.0 ml	0.67 ml
Solution B	2.5 ml	-
Solution C	-	1.0 ml
10% Ammonium persulfate	50 µl	30 µl
TEMED	5.0 µl	5.0 µl
Distilled water	2.5 ml	2.3 ml

ภาคผนวก ค

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2-DE

1. Stock Solutions

A. Lysis solution (8M urea, 4% CHAPS, 2% Pharmalyte 3-10)

	Final concentration	Amount
Urea (FW 60.06)	8 M	19.2 g
CHAPS [†]	4% (w/v)	1.6 g
Pharmalyte 3-10	2%	800 μ l
Double distilled H ₂ O		to 40 ml

B. Rehydration stock solution without IPG buffer* (8M urea, 2% CHAPS, 0.002% bromophenol blue)

	Final concentration	Amount
Urea (FW 60.06)	8 M	12 g
CHAPS	2% (w/v)	0.5 g
bromophenol blue	0.002%	50 μ l
Double distilled H ₂ O		to 25 ml

C. Bromophenol blue stock solution

	Final concentration	Amount
bromophenol blue	1%	100 mg
Tris-base	50 mM	60 mg
Double distilled H ₂ O		to 10 ml

D. Rehydration stock solution with IPG Buffer (8M urea, 2% CHAPS, 0.5% or 2% IPG buffer, 0.002% bromophenol blue)

	Final concentration	Amount
Urea (FW 60.06)	8 M	12 g
CHAPS	2% (w/v)	0.5 g
IPG Buffer or Pharmalyte	0.5% (v/v) or 2% (v/v)	125 μ l or 500 μ l
bromophenol blue	0.002%	50 μ l
Double distilled H ₂ O		to 25 ml

E. SDS equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue)

	Final concentration	Amount
Tris-HCl, pH 8.8	50 mM	10.0 ml
Urea (FW 60.06)	6 M	72.07 g
Glycerol (87% v/v)	30% (v/v)	69 ml
SDS (FW 288.38)	2% (w/v)	4.0 g
bromophenol blue	0.002% (w/v)	400 µl of 1% solution
Double distilled H ₂ O		to 200 ml

F. 30% T, 2.6% C monomer stock solution (30% acrylamide, 0.8% N,N'-methylenebisacrylamide)

	Final concentration	Amount
Acrylamide	50 mM	10.0 ml
N,N'-methylenebisacrylamide (FW 154.17)	6 M	72.07 g
Double distilled H ₂ O		to 200 ml

G. 4x resolving gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

	Final concentration	Amount
Tris base (FW 121.1)	1.5 M	181.7 g
Double distilled H ₂ O		750 ml
HCl (FW 36.46)		adjust to pH 8.8
Double distilled H ₂ O		to 1 l

H. 10% SDS

	Final concentration	Amount
SDS (FW 288.38)	10% (w/v)	5.0 g
Double distilled H ₂ O		to 50 ml

I. 10% ammonium persulfate

	Final concentration	Amount
ammonium persulfate (FW 288.20)	10% (w/v)	0.1 g
Double distilled H ₂ O		to 1 ml

J. Gel storage solution (0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS)

	Final concentration	Amount
4x Resolving gel buffer (see solution F)	1x	50 ml
10% SDS	0.1%	2 ml
Double distilled H ₂ O		to 200 ml

K. SDS electrophoresis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS)

	Final concentration	Amount
Tris-base (FW 121.1)	25 mM	30.3 g
Glycine (FW 75.07)	192 mM	144.0 g
SDS (FW 288.38)	0.1% (w/v)	10.0 g
Double distilled H ₂ O		to 10 l

L. Agarose sealing solution

	Final concentration	Amount
SDS electrophoresis buffer		100 ml
Agarose	0.5 %	0.5 g
Bromophenol blue	0.002% (w/v)	200 µl

2. Gel preparation

Final Gel Concentration	15%
Monomer solution (solution E)	50 ml
4x resolving gel buffer (solution F)	25 ml
10% SDS (Solution G)	1 ml
Double distilled water	23.5 ml
10% ammonium persulfate (solution H)	500 µl
TEMED	33 µl
Total volume	100 ml

ประวัตินักวิจัยและคณะ

- ชื่อ (ภาษาไทย) นางนฤมล พักmani (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Narumol Pakmanee
 - เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1004 00698 181
 - ตำแหน่งปัจจุบัน หัวหน้าฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้เชี่ยวชาญพิเศษ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 9
 - สถานที่ติดต่อ (ที่ทำงาน) ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
1871 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 162 โทรสาร 02-2540212
E-mail : npakmanee@yahoo.com
- ที่อยู่(บ้าน) 100/33 หมู่ 11 แขวงลาดพร้าว เขตลาดพร้าว โทรศัพท์ 02-5703230
โทรศัพท์ 02-9422838 โทรสาร 02-5702536
- ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีวเคมี	2522
จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต	ชีวเคมี	2525

6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ(สามารถตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

สาขาวิชาชีวเคมีและอิมมูโนวิทยาโดยเฉพาะด้านพิษงู

7. ประสบการณ์ทำงาน

7.1 งานบริหาร หัวหน้าฝ่ายวิจัยและพัฒนา กำกับดูแลด้านแผนงานวิจัย

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง

7.2.1 Neutralization of lethal and enzyme activities of *Daboia russelli siamensis* from Thailand and Myanmar by Thai and Myanmar Russell's viper antivenom

7.2.2 Envenomation of mice by Thai Cobra (*Naja kaouthia*) venom: Tolerable venom concentration and exposure time

7.2.3 การพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของพิษงูที่ออกฤทธิ์ต่อระบบโลหิต (ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากมูลนิธิเวชศาสตร์)

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. การพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของพิษงูที่ออกฤทธิ์ต่อระบบโลหิต (อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับเพื่อลงตีพิมพ์)
2. Rojnuckarin P, Chanthawibun W, Noiphrom J, Pakmanee N, Intragumtornchai T. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antivenom for local effects of green pit viper bites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Sep;100(9):879-84. Epub 2006 Feb 8.
3. Pithayanukul P, Ruenraroengsak P, Bavovada R, **Pakmanee N**, Suttisri R, Saen-Oon S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. *J Ethnopharmacol.* 2005 Mar 21;97(3):527-33.
4. Pithayanukul P, Laovachirasuwan S, Bavovada R, **Pakmanee N**, Suttisri R. Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Mayalan pit viper venom. *J Ethnopharmacol.* 2004 Feb;90(2-3):347-52.
5. Thammapalerd W, **Pakmanee N**, Tampitag S. A study on local tissue necrotic effecting components from the venom of Siamese cobra (*Naja kaouthia*). *Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin*, 2003 Aug ; 2(2): 11-9.
6. **Pakmanee N**, Khow O, Chanhome L, Aeksowan S, Chulasugandha P, Sitprija V. Cross-reactivity of antivenom . *J Toxicol* 2003 ; 22(1) : 91-113
7. Chiobamroongkiat M, **Pakmanee N**, Noiphrom J, Jaijaremsub W, Suttisri R. King cobra venom antibody in serum of king cobra handlers in Koksnga village. *Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin*, 2003 Apr; 2(1): 9-19.
8. Win-Aung , **Pakmanee N**, Khow O, Nambut C, Sitprija V. Cross neutralization of the lethal activities of Myanmar and Thai Russell's viper venoms by Thai and Myanmar antivenoms. *J Nat Toxins.* 2001 Nov; 10(4) : 335-42.
9. Nuchprayoon I, Sai-Ngam A, Suntrarachun S, Noiphrom J, **Pakmanee N**, Chanhome L, Nuchprayoon S, Sitprija V. Molecular cloning of phospholipase A2 from a Thai Russell's viper venom gland cDNA library. *J Med Assoc Thai.* 2001 June; 84 Suppl 1: s99-105.
10. Suntrarachun S, **Pakmanee N**, Tirawatnapong T, Chanhome L, Sitprija V. Development of a polymerase chain reaction to distinguish monocellate cobra (*Naja kaouthia*) bites from other common Thai snake species, using both venom extracts and bite-site swabs. *Toxicon* 2001 Jul;39(7): 1087-90.
11. Chanhome L, Khow O, Omori-Satoh T, **Pakmanee N**, Sitprija V. Antihemorrhagic factor in king cobra (*Ophiophagus hannah*) serum. In Abstracts : The Fifth Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, October 12-15, 1999. *Toxicon* 2001 ;39 : 135.

12. Suteparuk S, **Pakmanee N**. The kinetics study of *Trimeresurus albolabris* venom and antivenom in rabbits. . In Abstracts : The Fifth Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, October 12-15, 1999. Toxicon 2001; 39 : 148.
13. **Pakmanee N**, Aung W, Khoo O, Noiphrom J, Sitprija V. Neutralization of lethal and enzyme activities of *Daboia russelli siamensis* from Thailand and Myanmar by Thai and Myanmar Russell's viper antivenom. 13th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. Paris. 2000; Abstr : No. 222.
14. Suntrachun S, **Pakmanee N**, Tirawatnpong T, Chanhom L, Sitprija V. Identification of Thai cobra snake from venom extracts and swab specimens from snake bite-site in mice by polymerase chain reaction. 13th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. Paris. 2000; Abstr. No. 223.
15. Khoo O, Wongtangkam N, **Pakmanee N**, Omori – Satoh T, Sitprija V. Development of reversed passive latex agglutination for detection of Thai Cobra (*Naja kaouthia*) venom. Journal of Natural Toxins 1999; 8(2) : 213-220.
16. Rojnuckarin P, Intragumtornchai T, Sattapiboon R, Muanpasitporn C, **Pakmanee N**, Khoo O, Swasdikul D. The Effects of green pit viper (*Trimeresurus albolabris* and *Trimeresurus macrops*) venom on the fibrinolytic system in human. Toxicon 1999; 37 :743-755.
17. Chanhom L, Wangtongkam N, Khoo O, **Pakmanee N**, Omori-Satoh T, Sitprija V. Genus specific neutralization of *Bungarus* snake venoms by Thai Red Cross banded krait antivenom. Journal of Natural Toxins 1999;8(1): pp. 135-140.
18. **Pakmanee N**, Khoo O, Kumsup W, Omori-Satoh T, Chanhom L, Sriprapat S, Sitprija V. Envenomation of mice by Thai Cobra (*Naja kaouthia*) venom: Tolerable venom concentration and exposure time. Toxicon 1999 ;26(5): 809-812.

7.4 ผลงานวิจัยที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์

การพัฒนาวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ในการตรวจวินิจฉัยชนิดของพิษงูในซีรัมของผู้ถูกกัด (พ.ศ. 2534 – 2536)

การพัฒนาชุดตรวจชนิดของพิษงูที่ออกฤทธิ์ต่อระบบโลหิต

7.5 ผลงานอื่นๆ เช่น ตำรา บทความ

1. นฤมล พัทธมณี พิษงู: ประโยชน์ของพิษงู ในสูจิบัตรงานกาชาดประจำปี 2548 หน้า 43-45 เป็นเอกสารที่เผยแพร่ความรู้ในแง่มุมที่แสดงให้เห็นว่าพิษงูไม่ได้มีแค่โทษเพียงอย่างเดียว พิษงูมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้มากมาย
2. นฤมล พัทธมณี. สารเคมีอันตรายต่อสุขภาพ. สารเสาวภา. 2005 ; 4(2) : 5-11.(บทความพิเศษ)

3. นฤมล พัทธมณี. การตรวจพิษงู. สารเสาวภา. 2004;3(2): 25-36.(review)

4. นฤมล พัทธมณี. การตรวจพิษงูโดยวิธี Immunoassay ในหนังสือประกอบการประชุมวิชาการเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ทรงเจริญพระชนมายุ 72 พรรษา เรื่อง ฐพิษและพิษงูในประเทศไทย ณ โรงแรมวันนารา รามาคา วันที่ 3 ธันวาคม 2547 จัดการประชุมโดย สถาบันเสาวภา สภากาชาดไทย และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย;2547:48-55.

5. นฤมล พัทธมณี. การผลิตแอนติบอดีจากไข่แดง สารเสาวภา. 2003 ; 2(2) : 22-9.

6. Pakmanee N. (1990). Tissue Necrotic Effecting Components from The Viper and Elapid Snakes in Thailand. In "HIGHLIGHTS" : International Symposium on Tissue Repair. Faculty of Medicine, University of Khonkhaen. 1990 ;pp.37-38.

7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูงองเพื่อเป็นมาตรฐาน ในโครงการชุดเรื่อง การพัฒนาจากพิษงูงอง (ผู้วิจัยหลัก)

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาเพื่อประเมินความปลอดภัย,เภสัชจลนศาสตร์ และ ภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการใช้เซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าชนิดที่ผลิตจากม้าซึ่งผลิต โดยสถาบันเสาวภา สภากาชาดไทย (TRCS Antirabies Serum ® ; Lot no. E0105; Mfg date 19-01-05; Exp.date 19-01-07) เปรียบเทียบกับเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าชนิดที่ผลิตจากม้า และการใช้อยู่ในทางเวชปฏิบัติในปัจจุบัน (Rabies Antiserum Bema® ; Lot no. 8000069; Exp.date 03-2006) เมื่อใช้ร่วมกับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าชนิด PCEC (Lot no. 1032)

1. ชื่อ - นามสกุล นาง พรรณีภา จุลสุคนธ์

Mrs. Pannipa Chulasugandha

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1009 04993 26 8

3. ตำแหน่งปัจจุบัน เกษัตริกร 8

4. สถานที่ทำงาน ฝ่ายวิจัย และ พัฒนา สถานเสาวภา

1871 ถ.พระราม 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 162 โทรสาร 02-2540212

E-mail Address : pannipa_c@yahoo.com โทรศัพท์มือถือ 089-6964266

5. ประวัติการศึกษา

เภสัชศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2518

เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2525

Pharmaceutical Technology สถาบัน State University of Ghent, Belgium 2534

6. สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง (ตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

เภสัชกรรมการผลิต , ชีวเคมี

7. ประสบการณ์ทำงาน

7.1 งานบริหาร หัวหน้าฝ่ายผลิตเซรุ่ม กำกับดูแลงานบริหารการผลิตเซรุ่มแก้พิษงู

7.2 งานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษารูปแบบโปรตีนของพิษงูกุ่มที่ออกฤทธิ์ต่อระบบโลหิต

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.3.1 Pakmanee N, Khow O, Chanhome L, Aeksowan S, Chulasugandha P, Sitprija V.

Cross-Reactivity of Antivenom. Journal of Toxicology Toxin Reviews 2003;22 (1): 91-113.

(impact factor = 01.000) ที่มา :Journal Citation Reports,

7.3.2 Chulasugandha P, Khawplod P, Havanond P, Wilde H. Cost comparison of rabies pre-exposure

vaccination with post-exposure treatment in Thai children. Vaccine 2006; 24: 1478-1482 (impact factor =)

ที่มา :Journal Citation Reports, 2003

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.4.1 การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูของเองเพื่อเป็นมาตรฐาน ในแผนงานวิจัย การพัฒนาจากพิษงูของเอง:การศึกษาระยะก่อนคลินิก (ผู้วิจัยร่วม)

7.4.2 การศึกษาทางพิษวิทยาของสมุนไพรรักษา 3 ชนิด (เถาโลกกระออม, ใบฝ้ายผี และ ใบโคลงเคลง) ที่มีฤทธิ์ในการต้านพิษงู และ ด้านฤทธิ์ที่ทำให้เกิดเนื้อตายจากพิษงูของงูเห่าไทย และ งูกะปะ (ผู้วิจัยร่วม)

1. ชื่อ – นามสกุล

นางสาว อรวรรณ แซ่ไคว่

Miss Orawan Khaw

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1013 00185 88 4

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้อำนวยการพิเศษ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 7

4. สถานที่ทำงาน

1871 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน

จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10330

โทรศัพท์ 022520161-4 ต่อ 182 โทรสาร 022540212

E-mail Address qsmikhow@yahoo.com

โทรศัพท์มือถือ 099654243

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรีสาขา ชีววิทยา สถาบัน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

5.2 ปริญญาโทสาขา เคมีชีวภาพ สถาบัน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ อิมมูโนวิทยา, ชีวเคมี

7. ประสบการณ์ทำงาน

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.1 Isolation, toxicity and amino terminal sequences of three major neurotoxins in the venom of Malayan krait (*Bungarus candidus*) from Thailand

7.1.2 Isolation of the major lethal toxin in the venom of *Bungarus flaviceps*

7.1.3 A hemorrhagin as a metalloprotease in the venom of *Trimeresurus purpureomaculatus*: purification and characterization.

7.1.4 Effectiveness of Thai cobra (*Naja kaouthia*) antivenom against sea snake (*Lapemis hardwickii*) venom: verification by affinity purified F(ab')₂ fragments.

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Yanoshita R, Ogawa Y, Murayama N, Omori-Satoh T, Saguchi K, Higuchi S, **Khow O**, Chanhome L, samejima Y, Sitprija V. (2006) Molecular cloning of the major lethal toxins from two kraits (*Bungarus flaviceps* and *Bungarus candidus*). *Toxicon* 47: 416-424. (impact factor =)

2. **Khow O**, Chanhome L, Omori-Satoh T, Ogawa Y, Yanoshita R, Samejima Y, Kuch U, Mebs D, Sitprija V. (2003) Isolation, toxicity and amino terminal sequences of three major neurotoxins in the venom of Malayan krait (*Bungarus candidus*) from Thailand. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 134(6): 799-804. (impact factor = 2.148)

3. Chanhom L, **Khaw O**, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2003) Antihemorrhagin in the blood serum of king cobra (*Ophiophagus hannah*): purification and characterization. *Toxicon* 41(8): 1013-1019. (impact factor = 2.020)
4. Sriprapat S, Aeksowan S, Sapsutthipas S, Chotwiwatthanakun C, Suttijitpaisal P, Pratanaphon R, **Khaw O**, Sitprija V, Ratanabanangkoon K. (2003) The impact of a low dose, low volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand. *Toxicon* 41(1): 57-64. (impact factor = 2.020)
5. Chanhom L, **Khaw O**, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2002) Capacity of Thai green pit viper antivenom to neutralize the venoms of Thai *Trimeresurus* snakes and comparison of biological activities of these venoms. *Journal of Natural Toxins* 11(3): 251-259. (impact factor = 0.894)
6. **Khaw O**, Chanhom L, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2002) Isolation of the major lethal toxin in the venom of *Bungarus flaviceps*. *Toxicon* 40(4): 463-469. (impact factor = 1.575)
7. **Khaw O**, Chanhom L, Omori-Satoh T, Puempunpanich S, Sitprija V. (2002) A hemorrhagin as a metalloprotease in the venom of *Trimeresurus purpureomaculatus*: purification and characterization. *Toxicon* 40(4): 455-461. (impact factor = 1.575)
8. Win-Aung, Pakmanee N, **Khaw O**, Nambut C, Sitprija V. (2001) Cross neutralization of the lethal activities of Myanmar and Thai Russell's viper venoms by Thai and Myanmar antivenoms. *Journal of Natural Toxins* 10(4):335-342. (impact factor = 0.894)
9. **Khaw O**, Chanhom L, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2001) Effectiveness of Thai cobra (*Naja kaouthia*) antivenom against sea snake (*Lapemis hardwickii*) venom: verification by affinity purified F(ab')₂ fragments. *Journal of Natural Toxins* 10(3):249-253. (impact factor = 0.894)

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวจูรีพร น้อยพรหม

(ภาษาอังกฤษ) Ms. Jureeporn Noiphrom

เพศ หญิง วันเดือนปีเกิด 9 เมษายน 2519

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ 5

ที่อยู่(ที่ทำงาน) ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

1871 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 161 โทรสาร 02-2540212

E-mail: tu-juree-n@hotmail.com

ที่อยู่(ที่บ้าน) 711 ถ.สุขุมวิท 50 แขวงพระโขนง เขตคลองเตย กรุงเทพฯ 10260

โทรศัพท์ 02-3110014

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (ชีววิทยา) สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ปีที่สำเร็จ 2537

วท.ม. (เภสัชวิทยา) สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่สำเร็จ จะสำเร็จภายในเดือน พ.ย.2550

ผลงานวิจัย

ก. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Rojnuckarin P, Chanthawibun W, **Noiphrom J**, Pakmanee N, Intragumtornchai T. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antivenom for local effects of green pit viper bites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Sep;100(9):879-84. Epub 2006 Feb 8.

2. Chiobamroongkiat M, Pakmanee N, **Noiphrom J**, Jaijarernsub W, Sutthisri R. King cobra venom antibody in serum of king cobra handlers in Koksnga village. *Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin*, 2003 Apr; 2(1): 9-19.

3. Nuchprayoon I, Sai-Ngam A, Suntrarachun S, **Noiphrom J**, Pakmanee N, Chanhome L, Nuchprayoon S, Sitprija V. Molecular cloning of phospholipase A2 from a Thai Russell's viper venom gland cDNA library. *J Med Assoc Thai.* 2001 Jun;84 Suppl 1:S99-105.

ข. ผลงานวิจัยที่นำไปใช้ประโยชน์ได้

ค. ผลงานวิจัยอื่น ๆ (เช่น ตำรา บทความ สิทธิบัตร ฯลฯ)

ง. สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง (ตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

Pharmacology

ชื่อ (ภาษาไทย) สัตวแพทย์หญิง ลาวัลย์ จันทร์โสม

(ภาษาอังกฤษ) Ms. Lawan Chanhome

เพศ หญิง

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้เชี่ยวชาญสัตวแพทย์ระดับ 8

ที่อยู่(ที่ทำงาน) สวนงู สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

1871 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 143 โทรสาร 02-2540212

E-mail: lchanhome@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

สพ.บ. (เกียรตินิยมอันดับ 2) สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่สำเร็จ 2531

กำลังศึกษาต่อหลักสูตร สัตวแพทย์คุณภูมิบัณฑิต ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานวิจัย

ก. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Pornmanee P, Sánchez EE, López G, Petsom A, Khow O, Pakmanee N, Chanhome L, Sangvanich P, Pérez JC. Neutralization of lethality and proteolytic activities of Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom with North American Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) serum. *Toxicon*. 2008 Jul;52(1):186-9.
2. Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Boongird K, Wanghongsa S, Chanhome L, Rollin P, Stockton P, Rupprecht CE, Ksiazek TG, Hemachudha T. Bat Nipah virus, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2005 Dec;11(12):1949-51.
3. Yanoshita R, Ogawa Y, Murayama N, Omori-Satoh T, Saguchi K, Higuchi S, Khow O, Chanhome L, Samejima Y, Sitprija V. Molecular cloning of the major lethal toxins from two kraits (*Bungarus flaviceps* and *Bungarus candidus*). *Toxicon*. 2006 ;47(4):416-24.
4. Rojnuckarin P, Muanpasitporn C, Chanhome L, Arpijuntarangkoon J, Intragumtornchai T. Molecular cloning of novel serine proteases and phospholipases A2 from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom gland cDNA library. *Toxicon*. 2006 ;47(3):279-87.
5. Lumlertdacha B, Wacharapluesadee S, Chanhome L, Hemachudha T. Bat lyssavirus in Thailand. *J Med Assoc Thai*. 2005 Jul;88(7):1011-4. Thai.

6. Lumlerdacha B, Boongird K, Wanghongsa S, Wacharapluesadee S, Chanhome L, Khawplod P, Hemachudha T, Kuzmin I, Rupprecht CE. Survey for bat lyssaviruses, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2005 Feb;11(2):232-6.
7. Khow O, Chanhome L, Omori-Satoh T, Ogawa Y, Yanoshita R, Samejima Y, Kuch U, Mebs D, Sitprija V. Isolation, toxicity and amino terminal sequences of three major neurotoxins in the venom of Malayan krait (*Bungarus candidus*) from Thailand. *J Biochem.* 2003 Dec;134(6):799-804.
8. Kuch U, Molles BE, Omori-Satoh T, Chanhome L, Samejima Y, Mebs D. Identification of alpha-bungarotoxin (A31) as the major postsynaptic neurotoxin, and complete nucleotide identity of a genomic DNA of *Bungarus candidus* from Java with exons of the *Bungarus multicinctus* alpha-bungarotoxin (A31) gene. *Toxicon.* 2003;42(4):381-90.
9. Chanhome L, Khow O, Omori-Satoh T, Sitprija V. Antihemorrhagin in the blood serum of king cobra (*Ophiophagus hannah*): purification and characterization. *Toxicon.* 2003 Jun;41(8):1013-9.
10. Chanhome L, Puempunpanich S, Omori-Satoh T, Chaiyabutr N, Sitprija V. A pilot experiment for production of Malayan krait antivenom: immunization of rabbits with *Bungarus candidus* venom. *J Nat Toxins.* 2002 Dec;11(4):353-6.
11. Salakij C, Salakij J, Apibal S, Narkkong NA, Chanhome L, Rochanapat N. Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). *Vet Clin Pathol.* 2002;31(3):116-26.
12. Chanhome L, Khow O, Omori-Satoh T, Sitprija V. Capacity of Thai green pit viper antivenom to neutralize the venoms of Thai *Trimeresurus* snakes and comparison of biological activities of these venoms. *J Nat Toxins.* 2002 Aug;11(3):251-9.
13. Chanhome L, Khow O, Omori-Satoh T, Sitprija V. Isolation of the major lethal toxin in the venom of *Bungarus flaviceps*. *Toxicon.* 2002 Apr;40(4):463-9.
14. Khow O, Chanhome L, Omori-Satoh T, Puempunpanich S, Sitprija V. A hemorrhagin as a metalloprotease in the venom of *Trimeresurus purpureomaculatus*: purification and characterization. *Toxicon.* 2002 Apr;40(4):455-61.
15. Nuchprayoon I, Sai-Ngam A, Suntrarachun S, Noiphrom J, Pakmanee N, Chanhome L, Nuchprayoon S, Sitprija V. Molecular cloning of phospholipase A2 from a Thai Russell's viper venom gland cDNA library. *J Med Assoc Thai.* 2001 Jun;84 Suppl 1:S99-105.
16. Khow O, Chanhome L, Omori-Satoh T, Sitprija V. Effectiveness of Thai cobra (*Naja kaouthia*) antivenom against sea snake (*Lapemis hardwickii*) venom: verification by affinity purified F(AB')₂ fragments. *J Nat Toxins.* 2001 Aug;10(3):249-53.

17. Chanhom L, Jintakune P, Wilde H, Cox MJ. Venomous snake husbandry in Thailand. *Wilderness Environ Med.* 2001 Spring;12(1):17-23.
18. Suntrarachun S, Pakmanee N, Tirawatnpong T, Chanhom L, Sitprijia V. Development of a polymerase chain reaction to distinguish monocellate cobra (*Naja khouthia*) bites from other common Thai snake species, using both venom extracts and bite-site swabs. *Toxicon.* 2001 Jul;39(7):1087-90.
19. Chanhom L, Wongtongkam N, Khoo O, Pakmanee N, Omori-Satoh T, Sitprijia V. Genus specific neutralization of Bungarus snake venoms by Thai Red Cross banded krait antivenom. *J Nat Toxins.* 1999 Feb;8(1):135-40.
20. Pochanugool C, Wildde H, Bhanganada K, Chanhom L, Cox MJ, Chaiyabutr N, Sitprijia V. Envenomation of mice by Thai cobra (*Naja kaouthia*) venom: tolerable venom concentration and exposure time. : Venomous snakebite in Thailand. II: Clinical experience. *Mil Med.* 1998 May;163(5):318-23.
22. Chanhom L, Cox MJ, Wilde H, Jintakoon P, Chaiyabutr N, Sitprijia V. Venomous snakebite in Thailand. I: Medically important snakes. *Mil Med.* 1998 May;163(5):310-7. Review.
23. Khoo O, Pakmanee N, Chanhom L, Sriprapat S, Omori-Satoh T, Sitprijia V. Cross-neutralization of Thai cobra (*Naja kaouthia*) and spitting cobra (*Naja siamensis*) venoms by Thai cobra antivenom. *Toxicon.* 1997 Nov;35(11):1649-51.

ข. ผลงานวิจัยที่นำไปใช้ประโยชน์ได้

โครงการเพาะเลี้ยงงูพิษในประเทศไทย

ค. ผลงานวิจัยอื่น ๆ (เช่น ตำรา บทความ วิทยานิพนธ์ ฯลฯ)

1. หนังสือ *งูพิษในประเทศไทย* 2538 จำนวน 175 หน้า
2. ลาวัญย์ จันทร์โสม. ความรู้เกี่ยวกับงูในประเทศไทย. ใน: *สถานเสาวภา สภากาชาดไทย. สนวนงู. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คอกเบี้ย, 2550:20-65.*
3. ลาวัญย์ จันทร์โสม และ โอลิเวียร์ เพาเวลล์. บัญชีรายชื่องูในประเทศไทย. ใน: *สถานเสาวภา สภากาชาดไทย. สนวนงู. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คอกเบี้ย, 2550:66-83.*
4. ลาวัญย์ จันทร์โสม. การรีดพิษงู. ใน: *สถานเสาวภา สภากาชาดไทย. สนวนงู. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คอกเบี้ย, 2550:84-88.*
5. ลาวัญย์ จันทร์โสม. การเพาะเลี้ยงงูพิษ. ใน: *สถานเสาวภา สภากาชาดไทย. สนวนงู. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คอกเบี้ย, 2550:89-107.*

ง. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (ตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

Herpetology and Physiology

โครงการที่ 2

การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาส่วนประกอบที่มี
ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการภาษาไทย	การแยกส่วนพิษงูจงอาง เพื่อหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ	Fractionation of neuromuscular blocking activity compound from king cobra (<i>Ophiophagus hannah</i>) venom
หน่วยงานที่รับผิดชอบ	ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย 1871 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
ชื่อผู้ร่วมวิจัย	นางสาวอรรรณ แซ่ไคว้ นางสาวจรีพร น้อยพรหม รศ. โสภิต ธรรมอารี

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัยครั้งนี้ โดยเป็นทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2549

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. สฤณี กลั่นทกานนท์ ทองทรง ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนแนวคิดต่าง ๆ เกี่ยวกับเทคนิควิธีการทดลองที่ใช้ mouse phrenic nerve – hemidiaphragm preparation ในงานวิจัย รวมถึงความช่วยเหลืออื่น ๆ ในการทำการวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความร่วมมือ ช่วยเหลือและสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ และเจ้าหน้าที่อาคารสัตว์ทดลอง สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ดูแลและให้ความสะดวกเกี่ยวกับสัตว์ทดลอง เพื่อนำมาใช้ในการวิจัย

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สัตว์ทดลองทุกชีวิต ที่เสียสละเพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จ ถู่วงได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

บทคัดย่อ

พิษงูจงอางจัดอยู่ในกลุ่มพิษต่อระบบประสาท ผู้ที่ถูกงูจงอางกัดจะเกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรงและเป็นอัมพาต ด้วยฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำพิษงูจงอางมาพัฒนาเป็นยาเพื่อประโยชน์ทางการรักษา ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาส่วนกิ่งบริสุทธิ์ของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิ์นี้ ซึ่งได้ทำการแยกส่วนพิษงูจงอางด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี โดยผ่านพิษงูจงอางลงในคอลัมน์ Q-Sepharose, Cellulofine GCL-1000 sf และ SP-Sepharose ได้ส่วนกิ่งบริสุทธิ์ 4 ส่วน (F 1.2.1, F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ส่วนย่อย F1.2.2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อดีที่สุด มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากพิษงูที่ไม่ได้แยกส่วน 18 เท่า เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 8.2 กิโลดาลตัน ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ได้ทำการศึกษาใน phrenic nerve – hemi-diaphragm preparations ที่แยกได้จากกายนูเมาส์ ซึ่งจะทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อที่ตอบสนองต่อการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ผลการศึกษาพบว่าพิษงูจงอาง (crude) มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ เวลาที่ใช้ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% inhibition) ของ crude venom (80 $\mu\text{g/ml}$) และ F1.2.2 (4.4 $\mu\text{g/ml}$) ได้แก่ 4.2 ± 0.1 และ 7.4 ± 0.4 นาที ตามลำดับ การศึกษากลไกเบื้องต้นของ F1.2.2 พบว่ามีการออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

Abstract

King cobra venom (KCV) causing muscle paralysis is classified as neurotoxic venom. The neuromuscular (NM) blocking effect of KCV may be of interest for developing a therapeutic agent. Therefore this study aimed at investigating the semi-purified fractions of king cobra venom possessing the neuromuscular blocking action and their mechanisms. Neuromuscular blocking proteins (semi-purified fractions, F1.2.1-F1.2.4) were purified from king cobra venom by chromatography technique using Q-Sepharose, Cellulofine GCL-1000 sf and SP-Sepharose column. F1.2.2 was the most potent fraction, having 18-fold purification of crude with an overall yield of 52.6% of the activity. The molecular weight determined by gel electrophoresis was 8.2 kDa. For NM blocking test using the isolated mouse's phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation, the effect of the test compounds on muscle contraction induced by electrical stimulation of the phrenic nerve was measured. The crude venom showed dose-dependent NM blocking effect. The time taken to produce 50% inhibition of twitch tension was 4.2 ± 0.1 and 7.4 ± 0.4 min for crude venom (80 $\mu\text{g/ml}$) and F1.2.2 (4.4 $\mu\text{g/ml}$), respectively. The study for mechanism of action of F1.2.2 showed postsynaptic action with no direct effect on muscle.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
สารบัญเรื่อง	V
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	IX
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	XII
บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
กรอบแนวคิดการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	4
แนวคิดและทฤษฎี	5
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
วิธีดำเนินการวิจัย	14
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	14
วิธีดำเนินการวิจัย	19
- การแยกส่วนพินิจงองอาจ	19
- การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	21
- ศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธี (F1.2.2-F1.2.4) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	23
- การวิเคราะห์ข้อมูล	27
ผลการวิจัย	28
- การแยกส่วนพินิจงองอาจและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	28
- การทดสอบตำแหน่งการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธีที่บริเวณ	
pre- หรือ Postsynaptic	38
- การทดสอบการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธีในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า	45

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	53
- อภิปรายผลการวิจัย	53
- สรุปและข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก	60
ภาคผนวก ก	61
ภาคผนวก ข	63
ภาคผนวก ค	66
ภาคผนวก ง	80
ประวัติคณะผู้วิจัย	81

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1 – F7 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	31
2. ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.1 – F1.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	33
3. ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.2.1 – F1.2.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	35
4. สรุปรูปการแยกส่วนพิษงูจงอางในขั้นตอนต่าง ๆ	37
5. ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (control)	66
6. เวลา (min.) ที่ใช้ในการทำให้เกิด 50% inhibition ของพิษงูจงอาง	66
7. ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1 – F7	67
8. ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1.1 – F1.3	67
9. ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.1 – F1.2.4	68
10. Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า (Control)	68
11. Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2	69
12. Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3	69
13. Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4	70
14. เวลา (min.) ที่ใช้ในการทำให้เกิด 95% inhibition ของ Tubocurarine chloride	70
15. Twitch tension (%) ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ Tubocurarine chloride $20 \mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า	71
16. ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า	71
17. ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ Unipolar electrode และ Bipolar electrode หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride	72
18. Twitch tension (%) ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้าโดยตรง และกลุ่ม control	74

ตารางที่

หน้า

- | | |
|---|----|
| 19. ปริมาณ โปรตีนของพืชงูที่แยกส่วนในแต่ละขั้นตอน | 75 |
| 20. การเตรียม 12.5% gel electrophoresis | 79 |

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. การสื่อสารที่บริเวณ neuromuscular junction	7
2. กระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังการสื่อกระแสประสาท	8
3. จูจิงอาน (<i>Ophiophagus hannah</i>)	9
4. ขั้นตอนการแยกส่วนพิษจูจิงอาน	17
5. ชุดเครื่องมือสำหรับศึกษา phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation ที่แยกจาก กายหนูเมาส์	18
6. ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 2.2	22
7. ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 2.3 และ 2.4	23
8. ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 3.1	25
9. ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 3.2.3 และ 3.2.4	27
10. การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage โดยใช้ suction electrode	28
11.ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษจูจิงอานที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 $\mu\text{g/ml}$ และกลุ่ม control	29
12. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 50% inhibition กับความเข้มข้นของพิษจูจิงอาน	29
13. กราฟแสดงการแยกส่วนพิษจูจิงอานด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose	30
14.ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1 – F7	32
15. กราฟแสดงการแยกส่วน F1 ด้วยคอลัมน์ Cellulofine GCL-100 sf	33
16.ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1.1 – F1.3	34
17. กราฟแสดงการแยกส่วน F1.2 ด้วยคอลัมน์ SP-Sepharose	35
18.ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F12.1 – F1.2.4	36
19. การตรวจสอบพิษจูจิงอานที่แยกได้ด้วยวิธี gel electrophoresis	37
20. การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมที่ละความเข้มข้น (control)	39
21. การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมที่ละความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (control)	40

22. การหาค่าของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2	41
23. การหาค่าของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3	42
24. การหาค่าของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4	43
25. การหาค่าของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2	44
26. การหาค่าของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3	44
27. การหาค่าของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4	45
28. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 95% inhibition กับความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride	47
29. ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ Tubocurarine chloride	48
30. การหาค่าของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า	49
31. การหาค่าของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine	50
32. การเปรียบเทียบการหาค่าของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ใช้ Tubocurarine chloride และใช้ Tubocurarine chloride เพื่อปิดกั้น neuromuscular transmission	51
33. ผลของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหาค่าของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรง ด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride	52
34. การเปรียบเทียบการหาค่าของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ Unipolar electrode และ Bipolar electrode	73

35. แสดงตัวอย่าง chromatogram ของการแยกส่วนพิษงูจงอางด้วย Q-Sepharose column 76
36. แสดงตัวอย่าง chromatogram ของการแยกส่วน F1 ด้วย Cellulofine GCL-1000 sf column 77
37. แสดงตัวอย่าง chromatogram ของการแยกส่วน F1.2 ด้วย SP-Sepharose column 78
38. กราฟโปรตีนมาตรฐานและการหาน้ำหนักโมเลกุลของพิษงูกึ่งบริสุทธิ์ 79

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ach	=	Acetylcholine
Ca ²⁺	=	Calcium ion
K ⁺	=	Potassium ion
Na ⁺	=	Sodium ion
CO ₂	=	Carbondioxide
O ₂	=	Oxygen
°C	=	องศาเซลเซียส
M	=	molar
mM	=	millimolar
μM	=	micromolar
L	=	liter
ml	=	milliliter
μl	=	microliter
g	=	gram
n	=	sample size
SR	=	sarcoplasmic reticulum
%	=	percent
/	=	per
kDa	=	kilodalton

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พิษงูเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ มีทั้ง enzymatic protein เช่น phospholipase A₂, acetylcholinesterase, protease เป็นต้น และ non-enzymatic protein โดยเฉพาะสารพิษ (toxins) เช่น neurotoxin, cardiotoxin, myotoxin เป็นต้น โปรตีนต่าง ๆ ในพิษงูมีบทบาทด้านชีวเคมีและเภสัชวิทยาต่าง ๆ เพื่อประโยชน์ในการหาอาหารของงู นักวิจัยหลายกลุ่มทำการศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพิษงูเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนายาใหม่ ตัวอย่างยาที่ถูกพัฒนาขึ้นมา ได้แก่ ยา ACE inhibitor : captopril (1) เป็นยาชนิดแรกที่พัฒนามาจาก bradykinin potentiating peptides แยกได้จากพิษงู *Bothrops jararaca* ซึ่งเป็นงูพิษชนิดหนึ่งพบในต่างประเทศ

ยาที่พัฒนาจากองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตถูกพัฒนาขึ้น เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคหรืออาการผิดปกติต่าง ๆ ปัจจุบันมีการนำพิษจากแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* (Botulinum toxin) มาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านรักษาโรค และใช้ด้านความงามอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ซึ่งออกฤทธิ์ที่บริเวณ presynaptic เกี่ยวกับการบีบตัวของกล้ามเนื้อที่ผิดปกติ Botulinum toxin ถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในโปรแกรมการรักษาเพื่อช่วยบรรเทาอาการปวดหรืออาการผิดปกติของกล้ามเนื้อ (2) เช่น อาการกระพริบตาไม่หยุด (blepharism) และใช้ด้านความงามเพื่อลดรอยเหี่ยวย่น โดยทำให้กล้ามเนื้อที่บีบตัว เกิดการคลายตัวให้ผลลดริ้วรอยเหี่ยวย่นเป็นที่น่าพอใจ

พิษงูในกลุ่มที่เป็นพิษต่อระบบประสาท มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อด้วยเช่นกัน ซึ่งเมื่อได้รับพิษงูในกลุ่มนี้ เช่น ถูกงูจงอางกัด จะเกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาตก พูดไม่ชัด กลืนลำบาก เป็นอัมพาต และหายใจเองไม่ได้ ส่วนของพิษงูที่สำคัญในการทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ คือ neurotoxin ด้วยฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อที่มีในพิษงู จึงอาจนำส่วนของพิษงูมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคหรืออาการต่างๆ เกี่ยวกับกล้ามเนื้อบีบตัวผิดปกติได้ ซึ่งนอกจากจะนำไปใช้ในลักษณะคล้ายกับ Botulinum toxin แล้ว ยังอาจนำไปใช้ในด้านอื่น เช่น มีการนำ neurotoxin มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางการยับยั้งการติดเชื่อไวรัสในเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ประสาท (muscular and neuronal cells) และการศึกษาเพื่อการเข้าใจถึงการเกิดโรค Myasthenia gravis โดยอาศัยโครงสร้างและการจับกับ nicotinic acetylcholine receptor ของ neurotoxin รวมถึงการนำ neurotoxin มาใช้เป็นเครื่องมือ (probe) สำหรับการติดฉลากเพื่อจำแนก neuronal nicotinic receptor : $\alpha 7$ -subtype ในโรคต่าง ๆ เช่น Alzheimer's disease เป็นต้น (3)

งูพิษที่อยู่ในวงศ์ (Family) Elapidae เป็นงูพิษที่พิษมีฤทธิ์ต่อระบบประสาท มีการศึกษา neurotoxin ที่แยกได้จากพิษงูใน Family นี้ ซึ่งพบ neurotoxin ทั้งที่ออกฤทธิ์บริเวณ presynaptic และ postsynaptic ตัวอย่างเช่น neurotoxin จากงูเห่าได้หวนออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อที่บริเวณ postsynaptic และ neurotoxin จากงูสามเหลี่ยมได้หวนออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับ

กล้ามเนื้อที่บริเวณ presynaptic เป็นต้น (4) ในประเทศไทยงูพิษใน Family นี้มีหลายชนิด ได้แก่ งูเห่าไทย (*Naja kaothia*), งูเห่าพ่นพิษ (*Naja siamensis*), งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*), งูสามเหลี่ยม (*Bungarus fasciatus*), งูทับสมิงคลา (*B. candidus*) และงูทะเลชนิดต่าง ๆ เป็นต้น งูจงอางเป็นงูพิษที่น่าสนใจ เนื่องจากงูจงอางเป็นงูพิษที่มีขนาดใหญ่ มีพิษรุนแรง ต่อมพิษใหญ่ ปริมาณพิษย่อมมากตามไปด้วย สามารถเพาะเลี้ยงได้โดยสถานเสาวภา และการศึกษาเกี่ยวกับพิษงูจงอางในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาส่วนของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (neuromuscular blockade) เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

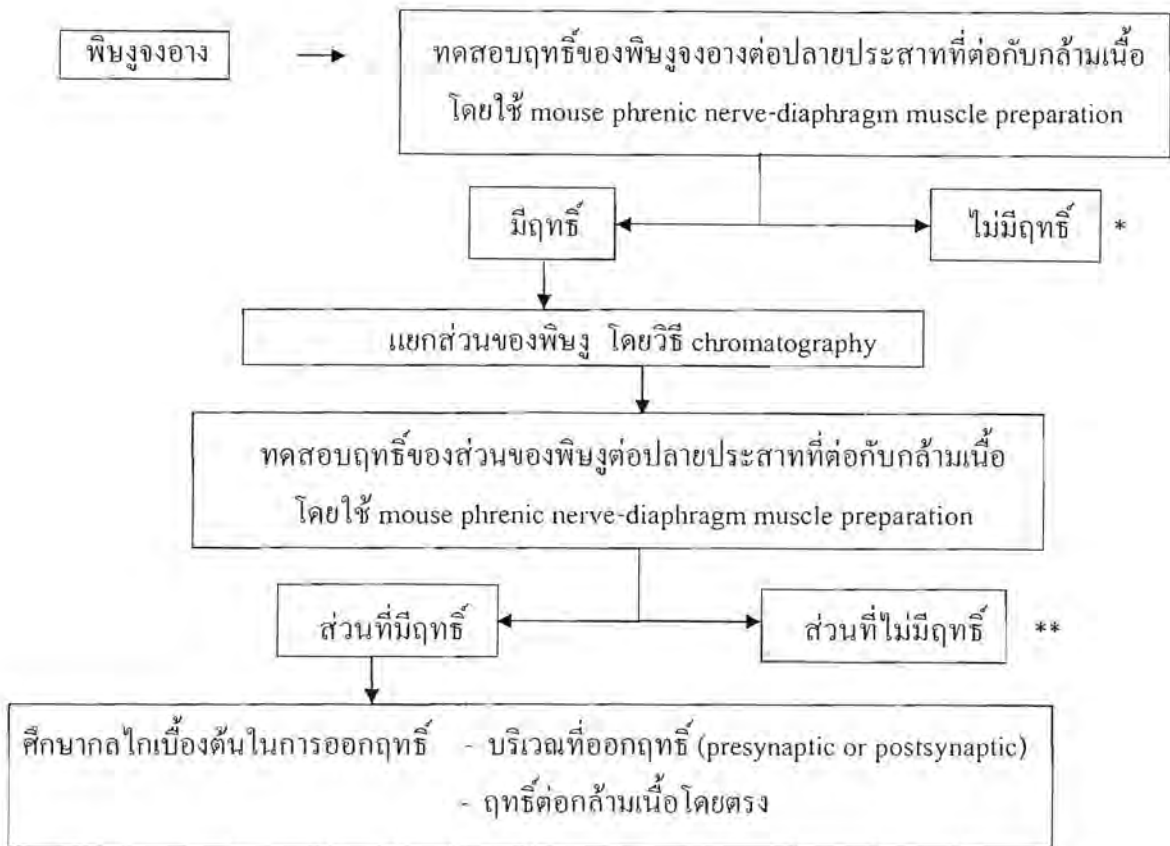
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. แยกส่วนพิษงูจงอางให้มีความบริสุทธิ์
2. ศึกษาฤทธิ์ของพิษงูจงอาง และส่วนกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified fraction) ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
3. ศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของส่วนกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพิษงูจงอาง

สมมติฐานการวิจัย

พิษงูจงอางมีส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ โดยส่วนกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพิษงูจงอางนั้นนอกจากออกฤทธิ์ที่ postsynaptic แล้ว อาจมีส่วนที่ออกฤทธิ์บริเวณ preynaptic ด้วย

กรอบแนวคิดการวิจัย



* ทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการไม่พบฤทธิ์ และค้นหาเหตุผล

** อาจนำไปศึกษาในแง่มุมอื่นต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้จะทำการศึกษาฤทธิ์ของพินูจาง ส่วน (fraction) ของพินูจาง และส่วนกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified fraction) ของพินูจาง ในการยับยั้งการสื่อประสาทที่ปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (neuromuscular junction) นอกจากนี้ยังศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของส่วนกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ โดยทำการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อเมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า และศึกษาว่าส่วนกึ่งบริสุทธิ์นั้นออกฤทธิ์ที่บริเวณ pre- หรือ postsynaptic ซึ่งตลอดการวิจัยจะใช้ mouse phrenic nerve-diaphragm preparation ในการศึกษาทดลอง

ปัญหาทางจริยธรรม (จรรยาบรรณการใช้สัตว์ในงานทางวิทยาศาสตร์)

ผู้วิจัยจะปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ในงานทางวิทยาศาสตร์และหลักการ The Three R's โดยพิจารณาความจำเป็นในการใช้สัตว์ทดลอง ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต่อปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (Neuromuscular effect) มีความจำเป็นต้องใช้ nerve-muscle preparation ที่เตรียมจากสัตว์ทดลอง จำนวนสัตว์ทดลองจะใช้ในปริมาณน้อยที่สุดที่คาดว่าจะให้ผลมีนัยสำคัญทางสถิติ และจะปฏิบัติต่อสัตว์อย่างมีมนุษยธรรม ซึ่งจะทำให้การสลบสัตว์ทดลองด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (95% CO₂ + 5% O₂) ให้สลบลึกจนหมดความรู้สึกและเสียชีวิตในที่สุด แล้วจึงทำการผ่าตัดแยก phrenic nerve-diaphragm เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง สัตว์ทดลองจะถูกส่งไปที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อกำจัดซากโดยวิธีมาตรฐาน นอกจากนี้สัตว์ทดลองจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ และได้รับการดูแลเลี้ยงดูในสถานะที่เหมาะสม ทั้งนี้การดำเนินการวิจัยได้ทำหลังจากโครงการวิจัยผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ส่วนกิ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพิษงูเองที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ซึ่งสามารถนำไปศึกษาเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป
2. พัฒนาวิธีการศึกษาทดลองโดยใช้ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation ซึ่งสามารถนำรูปแบบการศึกษานี้ไปใช้ได้ในการศึกษาโครงการอื่นๆ ต่อไป
3. ได้ข้อมูลวิจัยพื้นฐานเกี่ยวกับพิษงูเองเพื่อใช้ในการศึกษาและพัฒนาต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

การทำงานของส่วนต่าง ๆ ของร่างกายจะถูกควบคุมด้วยระบบประสาท ซึ่งระบบประสาทที่รับความรู้สึกจากตัวรับ (receptor) ที่ผิวหนังและอวัยวะรับสัมผัสเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง และส่งคำสั่งจากระบบประสาทส่วนกลางไปยังกล้ามเนื้อลาย คือ ระบบประสาทร่างกาย (Somatic Nervous System, SNS) โดยส่วนที่ทำหน้าที่นำสัญญาณความรู้สึกเข้าระบบประสาทส่วนกลางและส่งคำสั่งออกจากระบบประสาทส่วนกลาง คือ เส้นประสาท (nerve) ส่วนปลายสุดของเส้นประสาท คือ ปลายประสาท (Nerve endings) ซึ่งจัดแบ่งตามหน้าที่ได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ ปลายประสาทรับความรู้สึก (Sensory nerve endings) และ ปลายประสาทสั่งการ (Motor nerve endings) ปลายประสาทสั่งการจะเชื่อมต่อกับเซลล์กล้ามเนื้อชนิดต่าง ๆ หรือเซลล์ต่อมที่เป็นเซลล์เป้าหมาย

Synapse เป็นบริเวณที่เซลล์ประสาทส่งผ่านกระแสประสาทไปยังเซลล์อื่น synapse บริเวณปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (neuromuscular junction) จะเกิดการสื่อสารจากปลายประสาทสั่งการสู่กล้ามเนื้อ (ภาพที่ 1) การทำงานของกล้ามเนื้อลายจะถูกสั่งจากปลายประสาทสั่งการโดยการส่งผ่านกระแสประสาท ซึ่งจะเริ่มขึ้นเมื่อกระแสประสาท (action potential) ถูกส่งมาตามเส้นใยประสาท การเปลี่ยนแปลงที่บริเวณส่วนปลายของเส้นใยประสาทสั่งการ (presynaptic membrane) และส่วนของเซลล์กล้ามเนื้อที่เส้นใยประสาทมาสิ้นสุด (postsynaptic membrane) เกิดขึ้นดังนี้ (5)

1. บริเวณ Presynaptic membrane

เกิดการหลั่งสารสื่อประสาท โดยเมื่อกระแสประสาทเคลื่อนมาถึงส่วนปลายของเส้นใยประสาท (axon terminal) จะทำให้ voltage-gated calcium channels เปิด Ca^{2+} จากภายนอกไหลเข้าสู่ presynaptic knob การเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} ภายใน axon terminal ส่งผลให้ presynaptic vesicles เชื่อมรวมกับ plasma membrane สารสื่อประสาท (neurotransmitter) ได้แก่ acetylcholine ที่บรรจุอยู่ภายใน presynaptic vesicles ถูกปล่อยออกมาถึง synaptic cleft ด้วยขบวนการ exocytosis acetylcholine จะแพร่ข้าม synaptic cleft มาจับกับ acetylcholine receptor ซึ่งอยู่บนผิวของ plasma membrane ของกล้ามเนื้อ calcium ion ที่ไหลเข้าสู่ axon terminal จะถูกปั๊มออกไป การจับกันของ acetylcholine กับตัวรับ ทำให้เพิ่มการสื่อนำกระแส (conductance) โดยเปลี่ยนแปลง ion permeability ส่งผลให้เกิด depolarization ที่บริเวณ motor end plate และเริ่มการส่ง action potential กระจายต่อ ๆ ไป depolarization ที่เกิดขึ้นจะเกิดแบบชั่วคราว เนื่องจาก acetylcholine จะถูก hydrolyze เปลี่ยนเป็น choline และ acetate อย่างรวดเร็วโดย acetylcholinesterase ซึ่งมีอยู่มากที่ postsynaptic membrane และถูกขนส่งกลับสู่ axon terminal เพื่อใช้สร้าง acetylcholine ขึ้นมาใหม่ในเส้นประสาท และเก็บไว้ใน presynaptic vesicles (ภาพที่ 1) (5, 6)

2. บริเวณ Postsynaptic membrane

เกิดการหดตัว (contraction) ของกล้ามเนื้อ โดยเมื่อ acetylcholine มาจับ nicotinic acetylcholine receptor ที่บริเวณ motor end plate ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ion permeability ของ Na^+ และ K^+ โดยทำให้ voltage-gated Na^+ channels เปิด เกิดการไหลเข้าของ Na^+ และจากนั้น voltage-gated K^+ channels ก็จะเปิด เกิดการไหลออกของ K^+ กระแสไอออน (Ionic currents) ของ Na^+ และ K^+ ส่งผลให้เกิด depolarization ที่บริเวณ motor end plate เกิด end-plate potential ซึ่งจะเปิด voltage-gated Na^+ channels ที่อยู่ใกล้เคียง เป็นผลให้เกิด depolarization ต่อ ๆ ไป เกิดการส่งต่อ action potential และ action potential จะถูกส่งกระจายไปตาม sarcolemma ในทุกทิศทางและลงมายัง T tubules ทำให้ calcium ion ถูกปล่อยออกมาจาก terminal cisternae ของ sarcoplasmic reticulum (SR) เข้าสู่ cytosol ไปจับกับ Troponin C ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบอยู่ในเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งทำให้ Tropomyosin บน Actin filament เคลื่อนตัว เผย myosin-binding sites ทำให้ Myosin filament เข้ามาจับกับ Actin filament และดึงไปในแนวกลางของ sarcomere ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว จากนั้นเกิดการปล่อยพลังงานออกมา เป็นผลให้ Actin และ Myosin filament แยกออกจากกัน และเข้าสู่ระยะพัก ถ้าระดับ calcium ion ยังคงสูง Actin และ Myosin filament ก็จะกลับมาจับกันใหม่ เมื่อ action potential สิ้นสุด ระดับ calcium ion ลดต่ำลง calcium ion จะแยกตัวออกจาก Troponin C และถูกปั๊มกลับเข้าสู่ SR Actin และ Myosin filament กลับเข้าสู่ภาวะปกติ การหดตัวของกล้ามเนื้อสิ้นสุดลง muscle fiber คลายตัว (ภาพที่ 2) (5, 6)

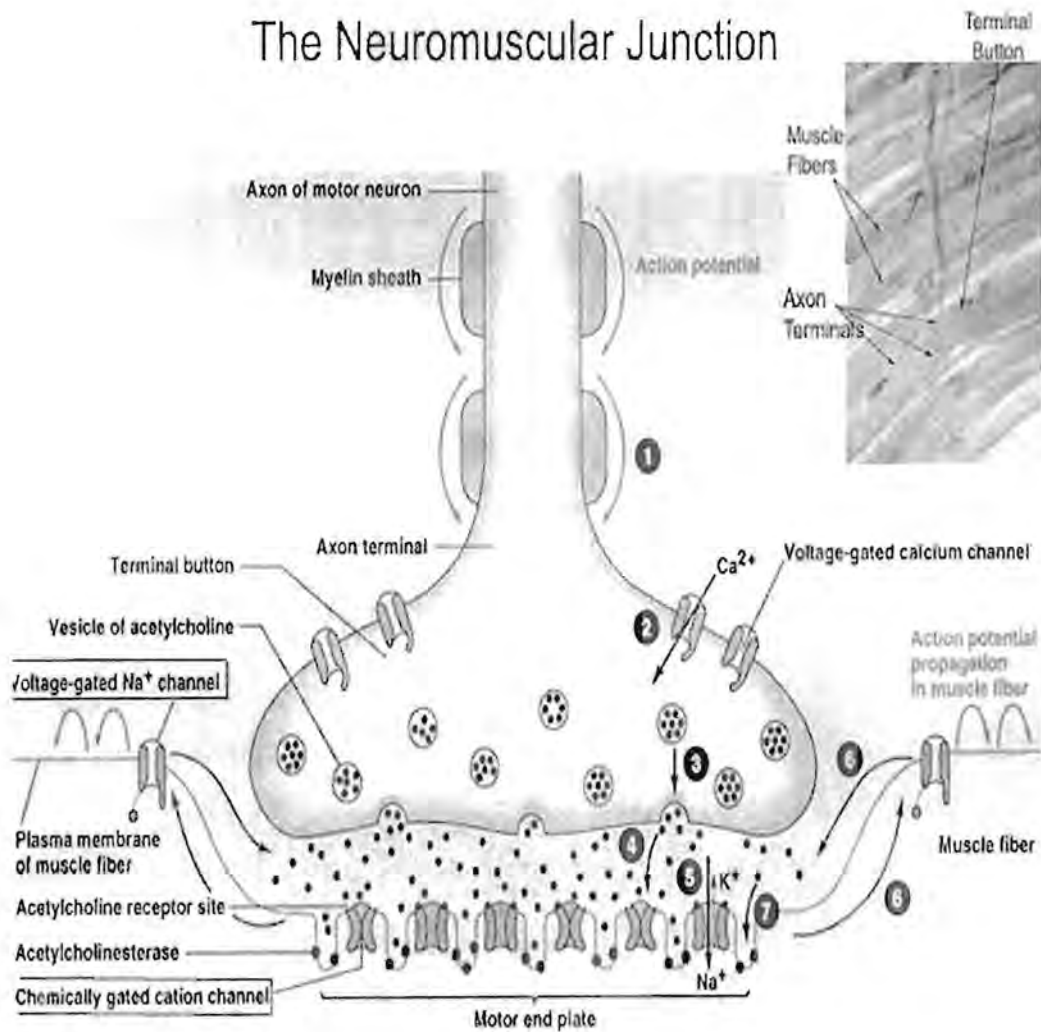
ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ โดยออกฤทธิ์ที่บริเวณ presynaptic ตัวอย่างเช่น Botulinum toxin ออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ โดยยับยั้งการปล่อยสารสื่อประสาทออกจาก presynaptic axon terminal โดยจับกับ neuronal acceptor บน nerve terminal axolemma และเข้าไปยัง nerve terminal จากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformation) ในส่วน heavy chain ของ toxin ทำให้ส่วน light chain ไปอยู่ใน cytoplasm ส่งผลให้ metallo-protease ของ light chain ทำงาน ซึ่งจะออกฤทธิ์ที่ SNAREs proteins ใน nerve terminal ชนิดของ SNAREs proteins และตำแหน่งบน SNAREs proteins ที่ toxin ไปออกฤทธิ์นั้น ขึ้นกับแต่ละ subtype ของ toxin ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้ synaptic vesicles ไม่สามารถเชื่อมรวมเข้ากับ plasma membrane ที่ปลายประสาท ยับยั้งการปล่อยสารสื่อประสาท ทำให้เกิดการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อต่อไป (7)

ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ โดยออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic ตัวอย่างเช่น Tubocurarine chloride ซึ่งเป็น competitive neuromuscular blocker ที่เป็นยาคลายกล้ามเนื้อ และเคยถูกนำมาใช้ร่วมกับยาสลบก่อนทำการผ่าตัด จะออกฤทธิ์โดยแย่งจับกับ acetylcholine receptor ที่อยู่บน motor end plate ซึ่ง acetylcholine receptor ประกอบไปด้วย 4 subunits คือ 2α , β , γ และ δ ประกอบกันเป็น pentamer บริเวณที่ acetylcholine เข้ามาจับคือ α -subunits ซึ่งเป็นบริเวณที่ tubocurarine เข้ามาจับด้วยเช่นกัน แต่ subunits อื่นก็มีผลต่อการจับด้วย ตัวอย่างเช่น α -subunits 1 unit ร่วมกับ γ -subunits ทำให้การ

จับกับ acetylcholine สูงขึ้น แต่ถ้า α -subunits ร่วมกับ δ -subunits จะทำให้การจับกับ acetylcholine ต่ำลง ใน adult muscle γ -subunits จะถูกแทนที่ด้วย ϵ -subunits ซึ่ง ϵ -subunits นี้จะไวต่อ tubocurarine มากกว่า การแย่งจับกับ acetylcholine receptor นี้ทำให้ยับยั้งการทำงานของ acetylcholine ซึ่งจะ ทำให้ไม่เกิดการส่ง action potential ต่อไปได้ ส่งผลให้กล้ามเนื้อไม่เกิดการหดตัว (8)

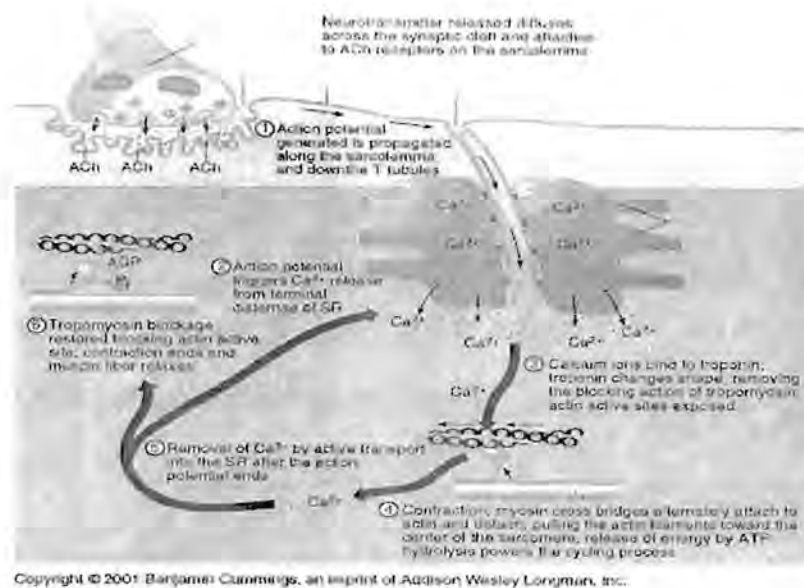
นอกจากนี้ ยาที่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อที่บริเวณ postsynaptic โดยออกฤทธิ์โดยตรงที่กล้ามเนื้อ ตัวอย่างเช่น ยา Dantrolene Sodium (hydantoin derivative) เป็นยากล้ามเนื้อที่ใช้ควบคุมการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ ที่เกี่ยวข้องกับมาจากการบาดเจ็บที่ spinal cord, stroke, cerebral palsy หรือ multiple sclerosis และยังใช้ป้องกันและรักษา malignant hyperthermia ด้วย ซึ่งออกฤทธิ์โดยรบกวนการปล่อย Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum และมีผลต่อ CNS ทำให้เกิด drowsiness, dizziness และทำให้เกิดการอ่อนแรง (9)

The Neuromuscular Junction



ภาพจาก www.colorado.edu

ภาพที่ 1 การสื่อสารประสาทที่บริเวณ neuromuscular junction



ภาพจาก <http://thebrain.mcgill.ca>

ภาพที่ 2 กระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังการสื่อกระแสประสาท

พิษงู ประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ มีทั้ง enzyme และ toxin โดยทั่วไป enzyme ในพิษงูจะออกฤทธิ์ 1) ทำให้หลอดเลือดฝอยเฉพาะที่ (local capillary) เสียหายและเกิดเนื้อตาย (tissue necrosis) ได้แก่ proteinases, phospholipase, arginine ester hydrolase และ hyaluronidase เป็นต้น 2) เปลี่ยนแปลงกระบวนการแข็งตัวและไม่แข็งตัวของเลือด ได้แก่ proteinases ชนิดต่าง ๆ และ phospholipase A เป็นต้น 3) ชักนำให้เกิดความดันต่ำ (hypotension) และความเจ็บปวดอย่างรุนแรงอันเนื่องมาจาก vasoactive peptides เช่น kinin-releasing enzyme (kininogenase) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมี enzyme อื่น ๆ ที่มีการรายงานว่าเป็นองค์ประกอบที่เป็นพิษ เช่น 5'-nucleotidase, phosphodiesterase และ enzyme อื่นที่เกี่ยวข้อง, cholinesterase และ L-amino acid oxidase เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับ enzyme เหล่านี้ที่แยกได้เป็น fractions โดยวิธี chromatography และ electrophoresis นั้นไม่ก่อให้เกิดพิษอย่างรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต เหตุที่พิษงูกัดจะเสียชีวิตเนื่องจากความล้มเหลวของระบบหายใจ หรือระบบไหลเวียนโลหิต ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของ neurotoxin, cardiotoxin, coagulation factors และสารอื่น ๆ ที่ออกฤทธิ์เดี่ยว ๆ หรือออกฤทธิ์ร่วมกัน ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูต่อเส้นประสาทและกล้ามเนื้อซึ่งมีผลเกี่ยวข้องกับระบบหายใจ มีความซับซ้อนเนื่องจากการออกฤทธิ์ร่วมกันขององค์ประกอบในพิษงู เช่น membrane toxin และ phospholipase A อาจจะมีผลต่อโครงสร้างของเส้นประสาทและกล้ามเนื้อ และ neurotoxin มีผลในการยับยั้งการส่งผ่านกระแสประสาทที่บริเวณปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ neurotoxin แบ่งได้ 2 ชนิดคือ presynaptic neurotoxin และ postsynaptic neurotoxin โดย postsynaptic neurotoxin แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ short neurotoxin ซึ่งมี 60-62 amino acid residues (4 disulfide bonds) และ long neurotoxin ซึ่งมี 71-74 amino acid residues (5 disulfide bonds) postsynaptic neurotoxin จะจับกับ acetylcholine receptor ที่บริเวณ motor end-plate ได้ อย่างเจาะจงและเหนียวแน่น ซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิด depolarization อันเนื่องมาจาก acetylcholine ยับยั้งการ

สื่อกระแสประสาท ตัวอย่างเช่น Cobrotoxin ที่แยกได้จากพิษงูเห่าได้หัววัน สำหรับ presynaptic neurotoxin ประกอบด้วย polypeptide chains 2 ชนิดที่ไม่เหมือนกัน คือ A chain ซึ่งมี 120 amino acid residues และ B chain มี 60 amino acid residues presynaptic neurotoxin ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการหลั่ง acetylcholine จาก motor nerve terminal และยังพบ phospholipase A₂ activity นอกจากนี้ presynaptic neurotoxin บางชนิดสามารถออกฤทธิ์เป็น myonecrotic toxins ทำให้เกิดเนื้อตายได้ ตัวอย่างเช่น β -Bungarotoxin ที่แยกได้จากพิษงูสามเหลี่ยมได้หัววัน (4, 10)



ภาพจาก <http://202.28.50.45/~neebio/biodiversity/show11.php?Page=15>

ภาพที่ 3 งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*)

Ion-Exchange Chromatography

หลักการของการแยกสารจะขึ้นกับสัมพรรคภาพของไอออนในสารละลายกับไอออนที่มีประจุตรงกันข้ามซึ่งอยู่ที่ผิวของเฟสอยู่กับที่ ion exchanger ประกอบด้วยของแข็งที่มีรูพรุนซึ่งปกติแล้วจะเป็นพวกเรซิน (resin) ที่มี ionic group ต่ออยู่ด้วยพันธะทางเคมี เฟสเคลื่อนที่ปกติแล้วจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) ซึ่งประกอบด้วย counter ion ที่มีประจุตรงกันข้ามกับ group ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่บรรจุอยู่ นั่นก็คือ ไอออนในเฟสเคลื่อนที่ที่มีประจุเหมือนกับไอออนที่ต้องการแยก ซึ่งไอออนดังกล่าวนี้จะรวมกับ group ที่อยู่บนผิวของเรซินในลักษณะเป็น ion pair เพื่อให้ประจุทั้งหมดอยู่ในสถานะสมดุล การแข่งขันกันระหว่างไอออนในสารละลายกับ counter ion เพื่อเข้าครอบครองตำแหน่งที่มีประจุบนผิวของเรซินจะมีผลทำให้เกิดการยึดเกาะขึ้น ion exchange chromatography ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เพื่อใช้แยกพวกไอออนของโลหะ และยังใช้ประโยชน์ในการแยกสารประกอบทางชีวภาพที่ละลายในน้ำได้อีกด้วย เช่นแยกพวกโปรตีนและกรดอะมิโน เป็นต้น

Size exclusion Chromatography

บางครั้งเรียกว่า gel Permeation Chromatography หรือ Gel filtration Chromatography กลไกการแยกสารจะเกี่ยวข้องกับที่สารจะถูกเลือกให้แพร่ผ่านรูพรุนของ packings ที่มีลักษณะเป็น network 3 มิติ และ packings นี้อาจจะเป็นพวก gel หรือของแข็งที่มีรูพรุน ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ การที่สารจะถูกยึดเหนี่ยวให้อยู่ในคอลัมน์นานหรือไม่นานขึ้นอยู่กัขนาดของโมเลกุล เมื่อเทียบกับขนาดของรูของอนุภาคที่ถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ โมเลกุลเล็กสามารถที่จะแพร่ผ่านเข้าไปในรูที่เล็ก โมเลกุลที่มีขนาดกึ่งกลางไม่ใหญ่มากนักจะแพร่ผ่านได้เฉพาะบางส่วนของรูที่อยู่ในอนุภาคเท่านั้น และจะถูกกีดกันจากรูที่เล็กมาก ๆ สำหรับ

โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะถูกกีดกันออกไป และไม่สามารถแพร่เข้าไปในรูได้ ดังนั้น โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะเดินทางเร็วมาก และจะออกมาจากคอลัมน์เป็นพวกแรก ดังนั้น size exclusion chromatography จะมีประโยชน์มากสำหรับการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น polymer และ biopolymers ออกจากโมเลกุลเล็ก ๆ

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งูจงอาง (ภาพที่ 3) เป็นงูพิษใน Family (วงศ์) Elapidae เป็นงูพิษที่ยาวที่สุดในโลก มีนิสัยค่อนข้างดุ สามารถแผ่แม่เบี้ยได้เช่นเดียวกับงูเห่า แต่แม่เบี้ยของงูจงอางจะเล็กกว่างูเห่าเมื่อเทียบกันตามสัดส่วน แม่เบี้ยของงูจงอาง ไม่มีลายดอกจันอย่างในงูเห่า แต่จะมีลายจาง ๆ พาดตามขวางเป็นบั้ง ๆ แทน นอกจากนี้งูจงอางยังมีเกล็ดบนหัวคู่พิเศษ 1 คู่ อยู่ด้านหลังของเกล็ดกระหม่อม เกล็ดคู่พิเศษนี้มีชื่อเรียกว่า occipitals ซึ่งในงูเห่าจะไม่มีเกล็ดคู่นี้ งูจงอางเป็นงูที่ออกหากินได้ทั้งในเวลากลางวันแดดไม่ร้อนจัดและในเวลาพลบค่ำ อาหารหลักคืองูชนิดอื่น ๆ แม้กระทั่งงูเหลือมที่ตัวไม่โตนักก็เคยพบว่าเป็นเหยื่อของงูจงอาง นอกจากกินงูแล้ว บางครั้งงูจงอางอาจกินสัตว์จำพวกตะกวด กิ้งก่า ตุ๊กแก เป็นอาหาร การแพร่กระจายของงูจงอางในประเทศไทยพบได้ในป่าทุกภาค แต่พบทางใต้มากกว่า งูจงอางมีพิษทางระบบประสาทที่รุนแรงมาก เมื่อถูกงูจงอางกัดจะเกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาตก พุดไม่ชัด กลืนลำบาก เป็นอัมพาต และหายใจเองไม่ได้ (11) งูจงอางมี neurotoxin เป็น โปรตีนหลักที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

มีรายงานการแยกองค์ประกอบของพิษงูจงอางเพื่อนำมาศึกษา ดังนี้

Joubert และคณะ (12) ได้ทำการแยก toxin 2 ชนิดจากพิษงูจงอางด้วยเทคนิค ion-exchange chromatography โดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ carboxymethyl (CM)-cellulose ได้ส่วนของพิษงู 4 ส่วน ส่วนที่ 2 และ 3 ซึ่งมีความเป็นพิษสูงถูกนำไปแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการใช้เทคนิค gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex G-50 เป็นตัวกลางในการแยก ส่วนที่ 2 แยกได้ 4 ส่วนย่อย มี 1 ส่วนย่อยที่เป็น major toxin (toxin a) ส่วนที่ 3 แยกได้ 3 ส่วนย่อย และมี 1 ส่วนย่อยที่เป็น major toxin (toxin b) Toxin a และ b ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 7,800 ดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และมีค่าความเป็นพิษ (Lethal dose₅₀, LD₅₀) เท่ากับ 0.3 และ 0.35 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ

Tan และคณะ (13) ได้ทำการแยกพิษงูจงอางด้วยวิธี ion-exchange chromatography โดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ diethylaminoethyl (DEAE)-Sephacel ได้ส่วนของพิษงู 6 ส่วน ทำการหา enzyme activity ในส่วนของพิษงูที่แยกได้ พบว่า ส่วนที่เป็น major lethal toxin อยู่ในส่วนประกอบย่อยที่ 1 ซึ่งมี activity ของ 5'-Nucleotidase และ Phosphodiesterase

Chang และคณะ (14) ได้ทำการแยก postsynaptic neurotoxin (α -neurotoxin) จากพิษงูจงอางโดยใช้ sulfopropyl (SP)-Sephadex C-25, Sephadex G-50, CM-52 และ Reverse-phase – High performance liquid chromatography (RP-HPLC) neurotoxin ที่แยกได้เป็น basic polypeptide ที่มี pI (isoelectric point) 9.05 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 ตัว และ cysteine 10 ตัว toxin ที่แยกได้มีความคล้ายคลึงกับ α -bungarotoxin ที่แยกได้จากพิษงูสามเหลี่ยมได้หวนถึง 60% และมีคุณสมบัติในการจับกับ nicotinic acetylcholine receptor ของปลาไหลไฟฟ้า (*Torpedo californica*)

Lin และคณะ (15) ได้ทำการแยก neurotoxin 2 ชนิด ได้แก่ Oh-6A และ Oh-6B จากพิษงูจงอางโดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ SP-Sephadex C-25, CM-52 และ SynChropakRP-P Neurotoxin ที่แยกได้ประกอบด้วย กรดอะมิโน 70 ตัว และ cysteine 10 ตัว 46-53% ของลำดับกรดอะมิโนใน neurotoxin นี้มีความคล้ายคลึงกับ Oh-4, Oh-5, Toxin a และ Toxin b จากพิษงูเดียวกัน

Chang และคณะ (16) ได้แยก Oh9-1 ซึ่งเป็น neurotoxin ชนิดใหม่ มีโครงสร้างต่างจาก α -neurotoxin 6 ชนิดที่ได้มีการแยกมาแล้วก่อนหน้านี้ Oh9-1 แยกได้จากพิษงูจงอางโดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ SP-Sephadex C-25 ได้ส่วนของพิษงู 9 ส่วน จากนั้นส่วนที่มี neurotoxin activity นำไปแยกต่อด้วยวิธี RP-HPLC โดยใช้ SynChropak RP-P ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน ส่วนย่อยที่ 1 เป็นส่วนที่เป็น neurotoxin เมื่อนำไปหาลำดับกรดอะมิโน พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 ตัว และ cysteine 8 ตัว Oh9-1 สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ถูกชักนำโดย carbachol แบบย้อนกลับไม่ได้ (irreversible) โดยไปจับกับ nicotinic acetylcholine receptor ที่ postsynaptic ความสามารถในการยับยั้งการหดตัวที่ 50% นี้คิดเป็น 4 เท่าของ α -bungarotoxin

De P และคณะ (17) ได้ทำการแยก CM36 จากพิษงูจงอาง โดยใช้ CM-Sephadex และ High performance liquid chromatography (HPLC) neurotoxin ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 15 กิโลดาลตัน มีค่าความเป็นพิษ 3.5 ไมโครกรัมต่อหนู 20 กรัม เมื่อฉีดพิษเข้าทางหลอดเลือดดำที่หางหนู กลไกความเป็นพิษต้องอาศัย Ca^{2+} แต่ไม่พบว่ามี phospholipase A_2 activity toxin CM36 ไม่มีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจของหนูตะเภา ไม่มีผลต่อความดันเลือดของแมวและหนูขาว แต่มีผลต่อระบบหายใจในหนูแรทและหนูตะเภา

He และคณะ (18) ได้ทำการแยกส่วนพิษงูจงอางด้วยวิธี gel filtration โดยใช้ Sephadex G-50 ได้ส่วนของพิษงู 4 ส่วน ในส่วนที่ 4 มี neurotoxin activity จากนั้นนำส่วนที่ได้ไปแยกต่อโดยผ่านใน AKTA Source 15 S ได้ส่วนย่อย 9 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ถึง 6 ได้ทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย RP-HPLC สุดท้ายได้ α -neurotoxin 7 ชนิด นำไปหาลำดับกรดอะมิโน เพื่อเปรียบเทียบกับ neurotoxin ที่ได้จากการ clone จากต่อมพิษงู

Pu และคณะ (19) ได้ทำการศึกษา hannalgesin ซึ่งเป็น neurotoxin ที่มี analgesic activity จากพิษงูจงอาง โดยทำการแยกพิษงูจงอางด้วย Sephadex C-25, G-50 column และ HPLC นำ hannalgesin มาทดสอบ analgesic effect ด้วย hot-plate test ซึ่งพบว่าเพิ่ม latency time ทดสอบ Rota-rod test พบว่าไม่ทำให้เกิด motor impairment แต่ในการทดสอบ Maximal electroshock seizure test ไม่พบฤทธิ์ป้องกันการชัก นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ analgesic activity ของ hannalgesin มีส่วนเกี่ยวข้องกับ opioid และ nitric oxide

ดังที่กล่าวแล้ว พิษงูจงอางมีฤทธิ์เป็นพิษต่อระบบประสาท มีรายงานการศึกษาพิษงูชนิดอื่นรวมถึงพิษแมงมุมที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อระบบประสาท โดยเกี่ยวข้องกับ การยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ดังนี้

Reali และคณะ (20) ทำการศึกษาพิษต่อประสาท (neurotoxic) และกล้ามเนื้อ (myotoxic) ของพิษงูเห่า (*Naja naja kaouthia*) โดยทดสอบใน rat isolated phrenic nerve-diaphragm preparation และ chick biventer cervicis muscle preparation ทดสอบหา bioelectrical potentials และ phospholipase A₂ activity รวมถึงศึกษา morphometry ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง พบว่าพิษงูเห่ามีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ โดยออกฤทธิ์ที่ postsynaptic รวมถึงพบ phospholipase A₂ activity ซึ่งพบว่ามี ความเกี่ยวข้องในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และพบความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อด้วย

Cooper และ Reich (21) ได้ทำการแยก neurotoxin จากพิษงูเห่าพ่นพิษ (*Naja naja siamensis*) ด้วย phosphocellulose, Sephadex G-50 และ carboxymethylcellulose ทำการตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ที่ pH 4.3 และ pH 7.0 neurotoxin ถูกดีดผลากด้วย pyridoxal phosphate ตามด้วยการ reduction ของ Schiff's base ด้วย tritiated sodium borohydride การดีดผลากที่ toxin ทำให้เหลือ ความแรงของพิษ 50% ซึ่งยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้ง acetylcholine ที่บริเวณ motor end plate ของปลาไหลไฟฟ้า (*Electrophorus electricus*), rodents และ amphibia

Nirathan และคณะ (22) ได้ทำการแยก mikatoxin (α -neurotoxin) จากพิษงู *Micropechis ikaheka* ด้วยวิธี gel filtration และ reverse-phase chromatography และนำมาตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE, Electrospray ionization mass spectrometry และหา N-terminal amino acid sequence จากนั้นทดสอบ enzyme activity พบว่าไม่มี phospholipase A₂ activity และ acetylcholinesterase activity นอกจากนี้พบว่า mikatoxin สามารถยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ มีฤทธิ์ antagonism จับกับ postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors โดยทดสอบใน chick biventer cervicis muscle preparation และ mouse phrenic nerve-hemidiaphragm muscle preparation แต่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้ง ganglionic transmission ใน guinea pig ileum และไม่พบการยับยั้ง muscarinic responses ใน rat anococcygeus

Rossetto และคณะ (23) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับ presynaptic neurotoxin เกี่ยวกับกลไก การออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ใน Clostridium neurotoxins และ Snake neurotoxins ที่มี

phospholipase A₂ activity โดยจะกล่าวถึงโครงสร้างของ toxin กลไกการออกฤทธิ์ และการนำไปใช้ทางคลินิก ซึ่ง Clostridium neurotoxins มีกลไกการออกฤทธิ์ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น สำหรับ Snake neurotoxins ที่มี phospholipase A₂ activity กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเป็นไปได้ว่ามีการเริ่มต้นโดย phospholipase A₂ neurotoxin ชักนำให้เกิดการเชื่อมรวมกันของ synaptic vesicles กับ plasma membrane โดยไม่มีการคืนกลับสู่สภาพเดิม (retrieval) toxin จะจับกับ membrane ผ่านทาง neurotoxin receptor และผลิตภัณฑ์ (products) ที่ได้จากปฏิกิริยา hydrolysis ของ phospholipase A₂ จะปรับเปลี่ยน physiological function ในแนวทางที่ส่งเสริมให้เกิด neuroexocytosis นอกจากนี้ fatty acid และ lysophospholipid ซึ่งคาดว่าถูกผลิตโดย phospholipase A₂ จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ของ organelles ต่าง ๆ ที่อยู่บริเวณ synaptic terminal

Kuruppu และคณะ (24) ได้ทำการศึกษา presynaptic neuromuscular activity ของพิษงู *Glyphodon tristis* โดยทดสอบใน chick biventer cervicis muscle preparation ทดสอบหา phospholipase A₂ activity และ ศึกษา morphology พบว่าพิษงูมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อโดยออกฤทธิ์ที่ presynaptic และพบความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อด้วย

Damico และคณะ (25) ได้ทำการศึกษาพิษต่อประสาท (neurotoxic) และกล้ามเนื้อ (myotoxic) ของพิษงู *Lachesis muta muta* โดยทดสอบใน mouse phrenic nerve-diaphragm muscle preparation และ chick biventer cervicis muscle preparation ทดสอบ creatine kinase release และ phospholipase A₂ activity รวมถึงศึกษา morphometry ด้วยกล้อง Light microscope พบว่าพิษงูมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ โดยออกฤทธิ์ที่ postsynaptic แต่ต้องใช้พิษงูที่ความเข้มข้นสูง จึงเป็นไปได้ว่าอาจออกฤทธิ์ที่ presynaptic ด้วย และพบว่าพิษงูมีความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อ

Fontana และคณะ (26) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษแมงมุม *Theraphosa blondii* ใน mouse phrenic-nerve diaphragm โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า และกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า และวัด Intracellular bioelectrical potential ที่บริเวณ endplate ของกล้ามเนื้อกระบังลม พบว่าพิษแมงมุมมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และถูกต้านฤทธิ์ด้วย neostigmine ได้เล็กน้อย เมื่อทำการล้างพิษออกไป กล้ามเนื้อสามารถกลับมาหดตัวได้บ้างเล็กน้อย แต่พิษแมงมุมไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า membrane potential ของ muscle fibers ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงไปโดยพิษแมงมุม แต่พิษแมงมุมมีผลในการลด endplate potential และทำให้หมดไปในที่สุด

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. พืชจางอาน

พืชจางอานที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในเขตจังหวัดเพชรบูรณ์ชนิดผงแห้ง ริดและเก็บพืชที่สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการแยกพืชจางอาน

- 2.1 คอลัมน์แก้ว Econo-column (Bio-Rad, USA)
- 2.2 Spectrophotometer Becman coulter DU650
- 2.3 Fraction collector Redifrac Pharmacia Biotech
- 2.4 Gradient mixer GM-1 (GE-Healthcare, Sweden)
- 2.5 Q-Sepharose fast flow (GE-Healthcare, Sweden)
- 2.6 SP-Sepharose (GE-Healthcare, Sweden)
- 2.7 Cellulofine GCL-1000 super fine (Seikagaku Co., Tokyo)
- 2.8 ชุดเครื่องมือสำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซิส แบบ slab gel (Hoffer, USA)

3. สัตว์ทดลอง

หนูพันธุ์ Swiss albino mice เพศผู้ น้ำหนัก 30-40 กรัม สั่งซื้อจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย (มาตรฐาน GMP) พักสัตว์ก่อนทำการทดลองที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (มาตรฐาน SPF) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้อุณหภูมิ 12 ชั่วโมง light/dark cycle โดยไม่จำกัดอาหารและน้ำ

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

- 4.1 ชุดอุปกรณ์ Organ bath แบบ Double Walled Harvard Type ขนาด 25 ml

ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น มีช่องเปิดให้ Gas Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) ไหลผ่านเข้าสู่ชั้นในซึ่งใช้บรรจุ Physiological Solution สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนอยู่เพื่อควบคุมอุณหภูมิของ Oxygenated Physiological Solution ที่อยู่ชั้นในให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง โดยใช้ Thermo regulating water pump

- 4.2 ถังบรรจุก๊าซ Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂)
- 4.3 เครื่องรับสัญญาณสำหรับวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ

- 4.4 เครื่องแปลงสัญญาณ
- 4.5 เครื่องปรับแต่งสัญญาณ Bridge Amp
- 4.6 เครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผลรุ่น Biopac Lab Pro MP100
- 4.7 เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (stimulator)
- 4.8 Suction electrode และ unipolar electrode
- 4.9 ชุดเครื่องมือผ่าตัดเด็ก
- 4.10 เครื่องชั่งแบบละเอียด
- 4.11 โหลมีฝาปิดซึ่งมีท่อต่อไปยังถังก๊าซ carbogen

5. สารเคมี

5.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลาย Krebs solution

- Sodium chloride (Merck, Germany); Potassium chloride (Merck, Germany); Calcium chloride (Merck, Germany); Magnesium sulphate (Merck, Germany); Potassium dihydrogen Phosphate (Merck, Germany); Sodium hydrogen carbonate (Merck, Germany); Glucose (Merck, Germany)

5.2 Acetylcholine iodide (Sigma, U.S.A)

5.3 Tubocurarine chloride (Sigma, U.S.A)

5.4 Trisma base (Sigma, USA)

5.5 สารเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียม gel electrophoresis

-acrylamide , Bis acrylamide (Sigma, USA)

-1.875M Tris-HCl pH 8.8

-1.875 M Tris-HCl pH 6.8

-Sodiumdodacyl sulfate (SDS) (Sigma, USA)

-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Sigma, USA)

-ammonium persulfate

-Electrode buffer pH 8.3 : 0.025 M Tris, 0.192 M glycine,

-Sample solution : 50% sucrose, 0.1% bromphenolblue

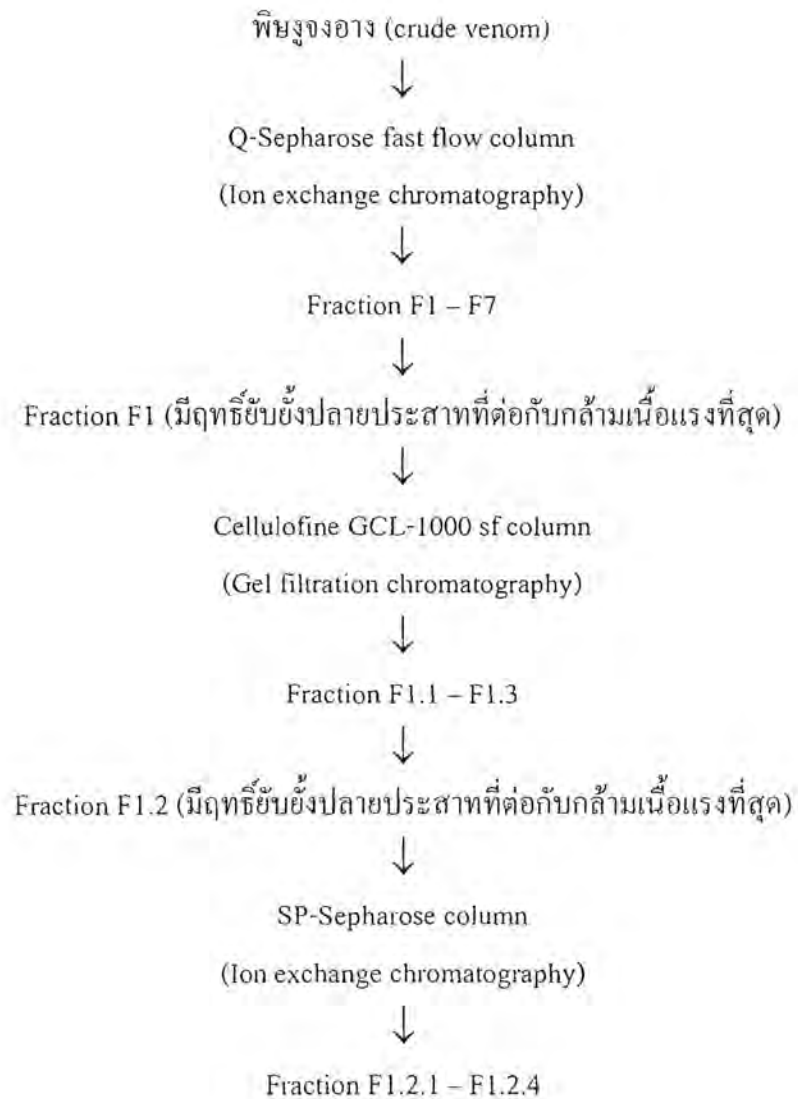
-Staining solution : 0.2% Coomassie blue R in

acetic acid : methanol : water = 7 : 46.5 : 46.5

-Destaining solution : acetic acid : methanol : water = 12.5 : 25 : 62.5

-โปรตีนมาตรฐาน Kaleidoscope Prestained (Bio-Rad, USA)

ประกอบด้วย myosin น้ำหนักโมเลกุล 210 กิโลดาลตัน, beta-galactosidase น้ำหนักโมเลกุล 131 กิโลดาลตัน, bovine serum albumin น้ำหนักโมเลกุล 89 กิโลดาลตัน, carbonic anhydrase น้ำหนักโมเลกุล 41.3 กิโลดาลตัน, soybean trypsin inhibitor น้ำหนักโมเลกุล 31.8 กิโลดาลตัน, lysozyme น้ำหนักโมเลกุล 18.1 กิโลดาลตัน, aprotinin น้ำหนักโมเลกุล 7.1 กิโลดาลตัน,



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการแยกส่วนพิษงูจงอาง



เครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผล



เครื่องแปลงสัญญาณและเครื่องปรับแต่งสัญญาณ



เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า



เครื่องรับสัญญาณการหดตัวของเนื้อเยื่อ



Organ bath ขนาด 25 ml สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ภาพที่ 5 ชุดเครื่องมือสำหรับศึกษา phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation ที่แยกจากกายหนูเม้าส์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกส่วนพิษงูจงอาง

พิษงูจงอาง (crude venom) จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย อยู่ในรูปผงแห้ง สีเหลืองอ่อน ได้จากการรีดและเก็บน้ำพิษของงูจงอางที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในเขตจังหวัดเพชรบูรณ์ ตามวันที่ที่รีดน้ำพิษ จำนวน 8 ขวด น้ำหนักพิษแห้งทั้งหมดรวม 12 กรัม ทำพิษงูจงอางที่ได้ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยนำพิษงูทั้งหมดไปละลายน้ำกลั่น 24 มิลลิลิตร แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 6 มิลลิลิตร ทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง เก็บขวดพิษงูจงอางผงแห้งในกล่องดูความชื้น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1 การแยกส่วนพิษงูจงอางด้วย ion-exchange chromatography

ในการแยกส่วนพิษงูแต่ละครั้งใช้พิษงูจงอาง 100 มิลลิกรัมละลายด้วย Tris buffer ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร pH 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผ่านสารละลายพิษงูลงในคอลัมน์ Q-Sepharose fast flow (2.5X 28 เซนติเมตร) ที่อยู่ในสมดุลของบัฟเฟอร์ ชะสารละลายพิษงูจากคอลัมน์ด้วย Tris buffer pH 7.4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 โมลต่อลิตรแบบ linear gradient ปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ปริมาตรหลอดละ 3 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน อัตราเร็วในการชะ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายทุกหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับหลอดที่เก็บแยกส่วน ทำการรวมหลอดที่แยกได้ภายใต้พีคเดียวกัน หากค่าปริมาณ โปรตีน โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เทียบกับพิษงูจงอางที่ไม่ได้แยกส่วน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าการดูดกลืนแสง 1.1130 พิษงูที่แยกได้ทุกพีคนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ทำการคิด % yield ของโปรตีนของแต่ละส่วนที่ได้ โดยคิดเปอร์เซ็นต์ตามปริมาณโปรตีนของแต่ละส่วน โดยให้ปริมาณโปรตีนของพิษงูก่อนทำการแยกส่วนเป็น 100%

การแยกส่วนด้วยวิธี Ion exchange chromatography นี้อาศัยหลักการแยกส่วนตามความแตกต่างของจำนวนประจุผลัทธิ (net charge) บนโมเลกุลของสารต่าง ๆ ที่ต้องการแยก ซึ่ง Q-Sepharose จะทำหน้าที่เป็น Anion exchanger มีคุณสมบัติในการจับกับสารที่มีประจุลบ การแยกเกิดขึ้นได้เนื่องจากสารต่างชนิดกันมีความสามารถในการจับกับ Anion exchanger แตกต่างกันตามความแตกต่างของจำนวนประจุลบบนโมเลกุลของสารเหล่านั้น (27)

1.2 การแยกส่วนพิษงูโดยวิธี gel filtration

นำพิษงูแยกส่วนจากข้อ 2.1.1 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อไปทำให้เข้มข้นขึ้น โดยใช้ Collodion bag ผ่านสารละลายพิษงูที่ได้ลงในคอลัมน์ Cellulofine GCL-1000 sf (2.8 x 29 เซนติเมตร) ชะด้วย ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร pH 8.0 ที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ปริมาตรหลอดละ 1.5 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน อัตราเร็วในการชะ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายทุกหลอดไปวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ 280 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับหลอดที่เก็บแยกส่วน ทำการรวมหลอดที่แยกได้ภายใต้พีคเดียวกัน หาปริมาณโปรตีนโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พืชที่แยกได้ทุกพีคนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ทำการคิด % yield ของโปรตีนของแต่ละส่วนที่ได้ โดยคิดเปอร์เซ็นต์ตามปริมาณโปรตีนของแต่ละส่วน โดยให้ปริมาณโปรตีนก่อนทำการแยกส่วนเป็น 100%

การแยกส่วนนี้ มีหลักการแยกส่วนตามขนาดและน้ำหนักของโมเลกุลโดยอาศัยการกรองผ่านรูพรุน (molecular sieving) ของตัวค้ำจุนที่เรียกว่า gel ซึ่ง Cellulofine GCL-1000 sf จะทำหน้าที่เป็นตัวค้ำจุนขนาดของรูพรุน (pore size) ที่อยู่ภายในเม็ด gel จะป็นตัวกำหนดขนาดโมเลกุลของสารที่จะลอดผ่านได้ โดยสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าขนาดของรูจะลอดผ่านไม่ได้ แต่จะเคลื่อนผ่านลงมาตามช่องว่างระหว่างเม็ด gel จึงสามารถแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันออกจากกันได้ (27)

1.3 การแยกส่วนพืชงูจงอางด้วย cation-exchange chromatography

พืชงูจงอางจากข้อ 2.1.2 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นและกำจัดเกลือด้วยวิธี dialysis ใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร pH 6.25 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พืชที่เข้มข้นขึ้นหลังการกำจัดเกลือ นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ion-exchange chromatography โดยผ่านบนคอลัมน์ SP-Sepharose (1.5 x 21.5 เซนติเมตร) ที่อ้อมตัวด้วยบัฟเฟอร์ จะสารละลายพืชงูจากคอลัมน์ด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.25 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 0.2 โมลต่อลิตรแบบ linear gradient ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ปริมาตรหลอดละ 1.5 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน อัตราเร็วในการชะ 7.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายทุกหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับหลอดที่เก็บแยกส่วน ทำการรวมหลอดที่แยกได้ภายใต้พีคเดียวกัน หาค่าปริมาณโปรตีนโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เทียบกับพืชงูจงอางที่ไม่ได้แยกส่วน พืชที่แยกได้ทุกพีคนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ทำการคิด % yield ของโปรตีนของแต่ละส่วนที่ได้ โดยคิดเปอร์เซ็นต์ตามปริมาณโปรตีนของแต่ละส่วน โดยให้ปริมาณโปรตีนก่อนทำการแยกส่วนเป็น 100%

การแยกส่วนนี้ใช้ SP-Sepharose ทำหน้าที่เป็น Cation exchanger ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับสารที่มีประจุบวก การแยกเกิดขึ้นได้เนื่องจากสารต่างชนิดกันมีความสามารถในการจับกับ Cation exchanger แตกต่างกันตามความแตกต่างของจำนวนประจุบวกบน โมเลกุลของสารเหล่านั้น (27)

พืชงูจงอางที่แยกส่วนในแต่ละขั้นตอนจะนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการทำให้แห้ง การทดสอบฤทธิ์ของพืชงูจะละลายแต่ละส่วนด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ ความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่ใช้ จะคำนวณตามสัดส่วนของพืชที่แยกได้ในแต่ละขั้นตอน ตัวอย่างเช่น สารตั้งต้นคือ พืชงูจงอาง ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 80 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อแยกส่วนแล้ว ได้ F1 ซึ่งมี % yield ของโปรตีนคือ 38.1% คำนวณความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ของ F1 โดย 38.1% ของ 80 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าเท่ากับ 30.5 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นจึงใช้ F1 ที่ความเข้มข้น 30.5 $\mu\text{g/ml}$ ในการทดลอง เป็นต้น

1.4 การตรวจสอบพิษของอ่างที่แยกได้ด้วยวิธี Gel electrophoresis

เตรียมเจล separating ความเข้มข้น 12.5% และ stacking ความเข้มข้น 4% ในชุดอุปกรณ์สำหรับเตรียมเจล จากนั้นนำไปต่อเข้ากับชุดสำหรับแยกโปรตีน ใส่ตัวอย่างโปรตีนจากพิษงูที่ละลายใน sample buffer และ โปรตีนมาตรฐาน ลงในเจลภายใต้ electrode buffer ต่อชุดอุปกรณ์เข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 30 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีที่อยู่ในตัวอย่างอยู่ห่างจากขอบล่างของเจล 0.5 เซนติเมตร นำเจลออกจากกระบอก ย้อมด้วย staining solution เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กำจัดสีส่วนเกินจากแผ่นเจลด้วย destaining solution หาอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างการเคลื่อนที่ของโปรตีนต่อระยะที่สารเคลื่อนที่ทั้งหมด (Rf) เขียนกราฟระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า Rf ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด เปรียบเทียบค่า Rf ของโปรตีนพิษงูจากกราฟเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของพิษงูที่แยกส่วน

2. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

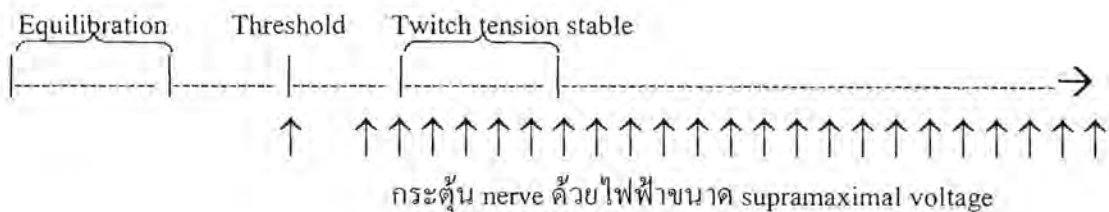
2.1. เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation

- ทำการสลบหนูด้วย CO_2 (95% CO_2 + 5% O_2) โดยใส่หนูลงในโหลมีฝาปิดที่ต่อกับถังบรรจุก๊าซ CO_2 เปิดให้ก๊าซ CO_2 เข้าไปในโหล และเฝ้าสังเกตว่าหนูสลบถึงจนหมดความรู้สึก และตายในที่สุด จากนั้นทำการผ่าตัดแยก mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm (28) ทันทัน
- นำ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm มาใส่ใน organ bath ที่บรรจุ oxygenated (95% O_2 + 5% CO_2) Krebs solution ซึ่งส่วนประกอบและวิธีเตรียมแสดงไว้ในภาคผนวก สำหรับเลี้ยงกล้ามเนื้อกระบังลม ผูกปลายล่างของกล้ามเนื้อยึดกับก้น organ bath ผูกปลายบนกับตะขอที่ต่อกับ transducer เชื่อมกล้ามเนื้อกระบังลมไว้ภายใต้แรงดึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 0.8 กรัม และอุณหภูมิ 37°C ส่วนเส้นประสาท phrenic nerve จะถูกดูดไว้ใน suction electrode เพื่อไม่ให้เกิดการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงเมื่อทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

2.2 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า โดยใช้ suction electrode (control, n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 2.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibrium) 30 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาดต่างๆ โดยเริ่มต้นที่ 0.5 โวลต์ ในความถี่ (frequency) 0.1 Hertz (Hz) และระยะเวลาในการกระตุ้น (duration) 0.2 millisecond (ms) โดยใช้ suction electrode
- สังเกตกระแสไฟฟ้าที่ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (ระดับ Threshold) และบันทึกค่าแรงดึงที่เกิดขึ้นจากการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension)
- คำนวณหา supramaximal voltage (4 x Threshold) จากกระแสไฟฟ้าระดับ Threshold
- หยุดกระตุ้นด้วยไฟฟ้าและพักประมาณ 5 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode

- บันทึกค่า twitch tension ตามเวลาต่าง ๆ จนกระทั่งไม่มีการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension มีค่าเท่ากับ resting tension) แสดงว่ากล้ามเนื้อไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา จะได้ระยะเวลาที่กล้ามเนื้อมีความคงทนสามารถเกิดการหดตัวได้เมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า เลือกช่วงเวลาที่กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวคงที่มาใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 6 ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 2.2

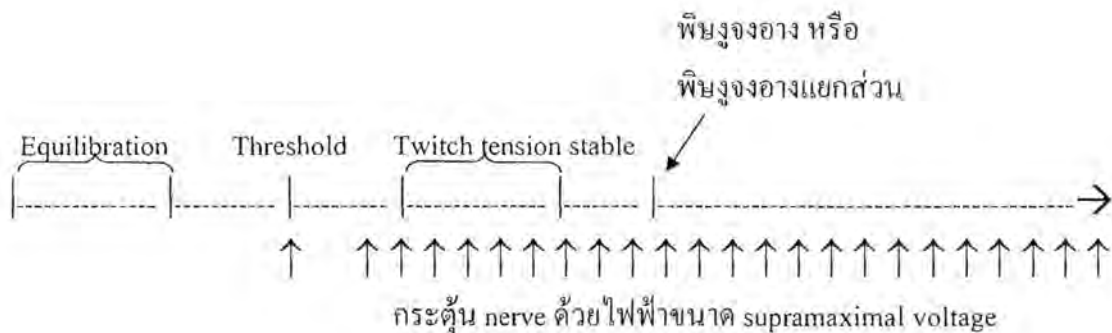
2.3 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษงูจงอาง (n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 2.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้น ทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode
- บันทึกค่า twitch tension และปล่อยให้ twitch tension มีความคงที่ (stable) 10 นาที
- ทำการทดสอบผลของพิษงูจงอางต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยใช้พิษงูจงอางที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μ l ให้ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 หรือ 160 μ g/ml ใน organ bath
- บันทึกค่า twitch tension ที่เปลี่ยนแปลงหลังให้พิษงูจงอางในแต่ละความเข้มข้น สังเกตผลต่อไปจนกระทั่ง twitch tension คงที่ (ระยะเวลาที่ดูผลจะอยู่ในช่วงที่ twitch tension มีความคงที่)
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับความเข้มข้นของพิษงูจงอางที่ใช้ ทำการเลือกความเข้มข้นของพิษงูจงอางน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อมากที่สุด และความเข้มข้นนั้นต้องให้ผลคงที่เช่นเดิมเมื่อมีการทำซ้ำใหม่ (reproducible)
- ใช้ความเข้มข้นของพิษงูจงอางที่เลือกไว้เป็นค่าตั้งต้นในการคำนวณหาความเข้มข้นของ F1 – F7 ซึ่งจะคำนวณตาม % yield ของโปรตีน ที่ได้จากการแยกส่วนของแต่ละ fraction

2.4 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษงูจงอางแยกส่วน (n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 2.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้น ทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode

- บันทึกค่า twitch tension และปล่อยให้ twitch tension มีความคงที่ (stable) 10 นาที
- ทำการทดสอบผลของพิษงูจงอางแยกส่วนต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยใช้พิษงูจงอางแยกส่วนที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μl ให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath ตามที่คำนวณได้ตาม % yield ของโปรตีน
- บันทึกค่า twitch tension ที่เปลี่ยนแปลงหลังให้แต่ละ fractions สังเกตผลต่อไปจนกระทั่ง twitch tension คงที่ (ระยะเวลาที่ดูผลจะอยู่ในช่วงที่ twitch tension มีความคงที่)
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา
- สำหรับ F1 – F7 และ F1.1 – F1.3 เลือก fraction ที่ใช้เวลาน้อยที่สุดในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อ 50% (50% inhibition) เพื่อนำไปทำการแยกส่วนให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นต่อไป
- สำหรับ F1.2.1 – F1.2.4 เลือก semi-purified fractions ที่มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ เพื่อนำไปศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ต่อไป



ภาพที่ 7 ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 2.3 และ 2.4

3 ศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของส่วนกึ่งบริสุทธิ์ (F1.2.2 – F1.2.4) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

3.1 ทดสอบการออกฤทธิ์ที่บริเวณ pre- หรือ postsynaptic ของส่วนกึ่งบริสุทธิ์

3.1.1 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า (control, n = 5)

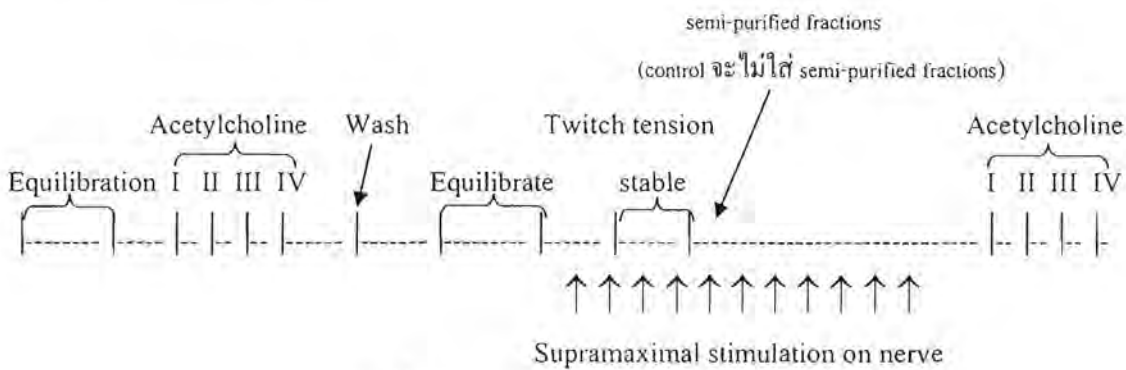
- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 2.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้นใส่ acetylcholine iodide ที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μl ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน organ bath ทุก 5 นาที แบบสะสมที่ละความเข้มข้น

- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดขึ้น หลังกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine iodide ในแต่ละความเข้มข้น นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- ทำการล้างเนื้อเยื่อทุก 3 นาที จำนวน 10 ครั้ง โดยทิ้ง oxygenated Krebs solution ที่มีอยู่เดิมใน organ bath และเติม oxygenated Krebs solution ใหม่ลงไป
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้นกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode
- บันทึกค่า twitch tension และปล่อยให้การหดตัวของกล้ามเนื้อดำเนินไป 60 นาที จากนั้นหยุดกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าและพักประมาณ 5 นาที
- ใส่ acetylcholine iodide อีกครั้ง ที่ปริมาตร 100 μ l ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน organ bath ทุก 5 นาที แบบสะสมทีละความเข้มข้น
- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดจากการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine iodide ในแต่ละความเข้มข้น นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- เปรียบเทียบ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

3.1.2 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก semi-purified fractions ($n = 5$)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 2.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้นใส่ acetylcholine iodide ที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μ l ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน organ bath ทุก 5 นาที แบบสะสมทีละความเข้มข้น
- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดขึ้น หลังกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine iodide ในแต่ละความเข้มข้น นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- ทำการล้างเนื้อเยื่อทุก 3 นาที จำนวน 10 ครั้ง โดยทิ้ง oxygenated Krebs solution ที่มีอยู่เดิมใน organ bath และเติม oxygenated Krebs solution ใหม่ลงไป
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้นกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode
- ปล่อยให้ twitch tension มีความคงที่ (stable) 10 นาที จึงใส่แต่ละ semi-purified fractions ปริมาตร 100 μ l ให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับที่ใช้ในข้อ 2.4

- เมื่อเกิด neuromuscular blockade แล้วยังคงกระตุ้นเส้นประสาทต่อไปจนครบ 60 นาที จากนั้นหยุดกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าและพักประมาณ 5 นาที
- ใส่ acetylcholine iodide อีกครั้ง ที่ปริมาตร 100 μl ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน organ bath ทุก 5 นาที แบบสะสมที่ละความเข้มข้น
- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดจากการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine iodide ในแต่ละความเข้มข้น นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- เปรียบเทียบ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจากแต่ ละ semi-purified fractions



ภาพที่ 8 ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 3.1

3.2 ทดสอบการออกฤทธิ์ของส่วนกึ่งบริสุทธิ์ ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

3.2.1 ทดสอบหาความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride (n = 3)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 2.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้น ทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode
- บันทึกค่า twitch tension และปล่อยให้ twitch tension มีความคงที่ (stable) 10 นาที
- ทำการทดสอบผลของ Tubocurarine chloride ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยใส่ Tubocurarine chloride ที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μl ให้ได้ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 or 20 μM ใน organ bath
- บันทึกค่า twitch tension ที่เปลี่ยนแปลงหลังให้ Tubocurarine chloride ในแต่ละความเข้มข้น เมื่อ twitch tension ลดลงจนเหลือ 5% หรือน้อยกว่า หรือจนกระทั่งที่ สังเกตผลต่อไปจนครบ 2 ชั่วโมง

(Tubocurarine chloride สามารถจับกับ acetylcholine receptor ได้ตลอดจนครบระยะเวลาที่ทำการทดลอง ซึ่ง neuromuscular transmission จะถูกปิดกั้นไว้ตลอดจนครบระยะเวลาที่ทำการทดลองด้วยเช่นกัน)

- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride ที่ใช้ และเลือกความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อมากที่สุด และความเข้มข้นนั้นต้องให้ผลคงที่เช่นเดิมเมื่อมีการทำซ้ำใหม่

3.2.2 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าโดยใช้ unipolar electrode (n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 2.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้น ทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าที่ระดับ supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 2 ms โดยใช้ unipolar electrode
- บันทึกค่า twitch tension ตามเวลาต่าง ๆ จนกระทั่งไม่มีการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension มีค่าเท่ากับ resting tension) แสดงว่ากล้ามเนื้อไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา จะได้ระยะเวลาที่กล้ามเนื้อมีความคงทนสามารถเกิดการหดตัวได้เมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

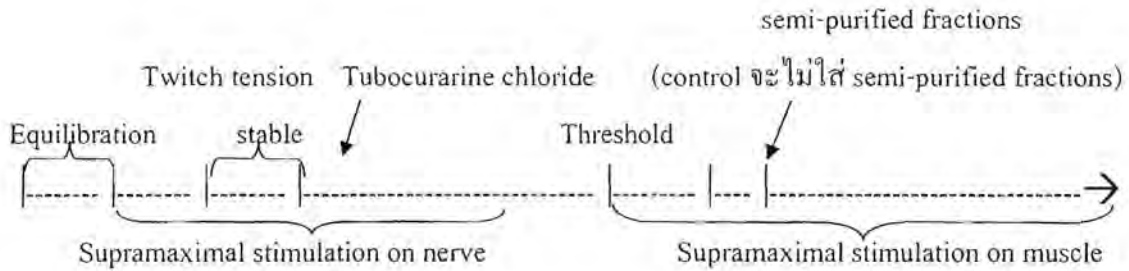
3.2.3 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าโดยใช้ unipolar electrode หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission (control, n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 2.1
- ปิดกั้น neuromuscular transmission โดยใช้ Tubocurarine chloride ตามความเข้มข้นที่เลือกไว้ ในวิธีทดลองข้อ 3.2.1
- หยุดกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า จากนั้นทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ที่ระดับ supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 2 ms โดยใช้ unipolar electrode
- บันทึกค่า twitch tension ตามเวลาต่าง ๆ จนกระทั่งไม่มีการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension มีค่าเท่ากับ resting tension) แสดงว่ากล้ามเนื้อไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา จะได้ระยะเวลาที่กล้ามเนื้อมีความคงทนสามารถเกิดการหดตัวได้เมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

3.2.4 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลมของ semi-purified fractions เมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า (n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 2.1
- ปิดกั้น neuromuscular transmission โดยใช้ Tubocurarine chloride ตามความเข้มข้นที่เลือกไว้ ในวิธีทดลองข้อ 3.2.1
- หยุดกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า จากนั้นทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ที่ระดับ supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 2 ms โดยใช้ unipolar electrode

- เมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าที่ระดับ supramaximal voltage แล้ว 5 นาที จึงใส่แต่ละ semi-purified fractions ปริมาตร 100 μ l ให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับที่ใช้ในข้อ 2.4
- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดขึ้น สังเกตผลต่อไปจนครบ 1.5 ชั่วโมง
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา
- พิจารณาการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ใส่และไม่ใส่ semi-purified fractions ลงไป



ภาพที่ 9 ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 3.2.3 และ 3.2.4

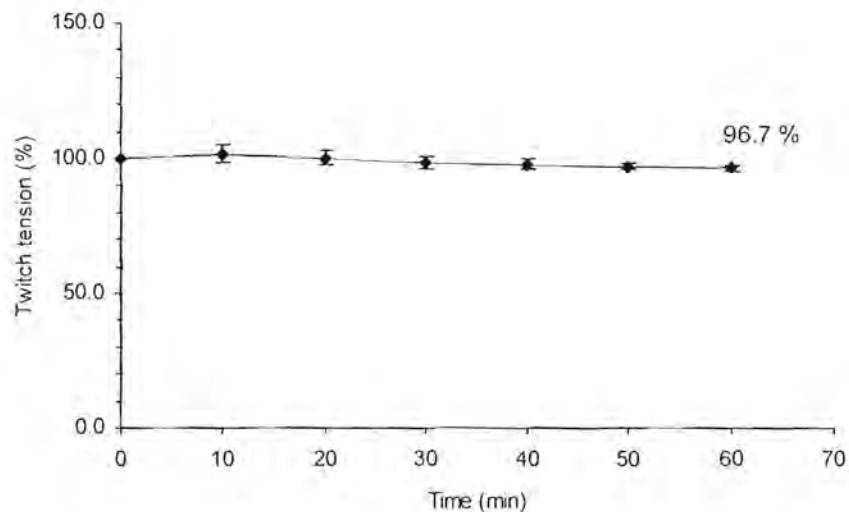
4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษงูหรือส่วนของพิษงู โดยพิจารณาค่า twitch tension (%) กับเวลา แสดงผลโดยใช้ค่าเฉลี่ยร้อยละ \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean \pm S.E.M.) ทดสอบค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA (Tukey) และ paired t-Test พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. การแยกส่วนพิษงูจงอางและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ได้ทำการทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 0.2 msec) โดยใช้ suction electrode ซึ่งมี supramaximal voltage อยู่ในช่วง 4-10 โวลต์ พบว่ากล้ามเนื้อกระบังลมสามารถหดตัวได้มากกว่า 4 ชั่วโมง โดยการหดตัวจะค่อย ๆ ลดลงทีละน้อย การหดตัวของกล้ามเนื้อมีการหดตัวลดลงถึง (ไม่เกิน 5%) ภายในระยะเวลา 60 นาที คิดเป็น 96.7% จากเวลาดั้งเดิม ดังนั้นจึงใช้ช่วงเวลานี้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 10)

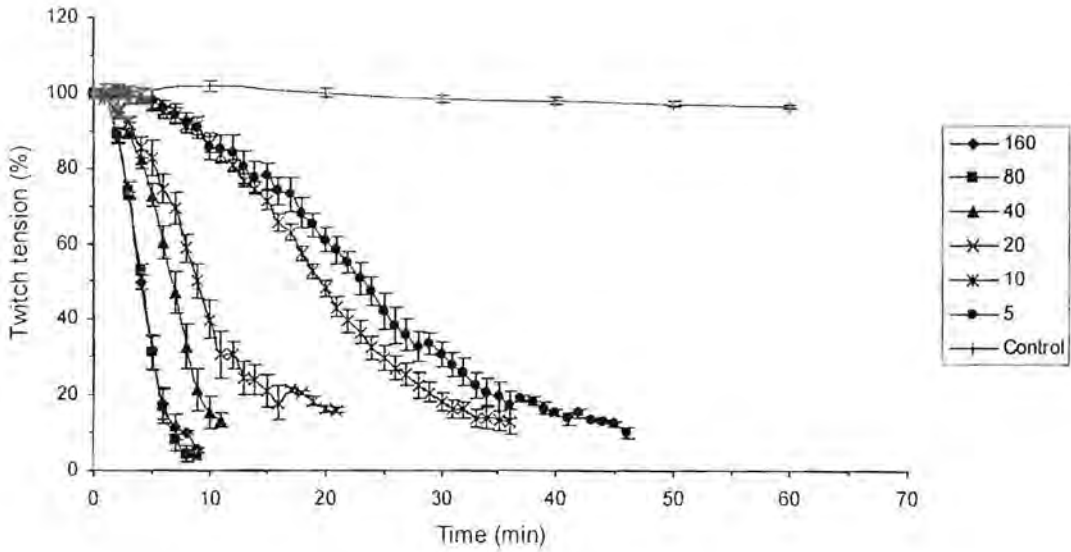


ภาพที่ 10 การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage โดยใช้ suction electrode แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

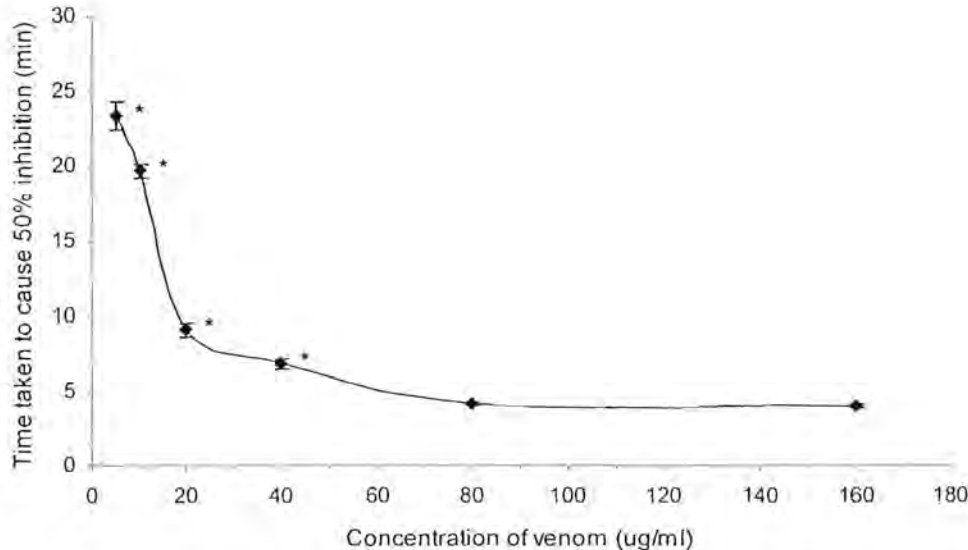
1.1 ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษงูจงอาง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษงูจงอาง (crude venom) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิด 50% inhibition ได้แก่ 23.4 ± 0.9 , 19.7 ± 0.5 , 9.1 ± 0.4 , 6.9 ± 0.3 , 4.2 ± 0.1 และ 4.0 ± 0.1 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 11) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับความเข้มข้นของพิษงู พบว่าพิษงูจงอางที่ความเข้มข้น 80 $\mu\text{g/ml}$ เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ให้ฤทธิ์มากที่สุด และให้ฤทธิ์ยับยั้งไม่ต่างกับพิษงูจงอางที่ความเข้มข้น

160 µg/ml อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12) ดังนั้นจึงใช้พิษขององที่ความเข้มข้น 80 µg/ml เป็นค่าตั้งต้นในการ
คำนวณหาความเข้มข้นของ Fraction F1 – F7 ที่จะใช้ศึกษาต่อไป



ภาพที่ 11 ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษขององที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 µg/ml และกลุ่ม control แสดงค่าเป็น Mean ± S.E.M (n = 5)



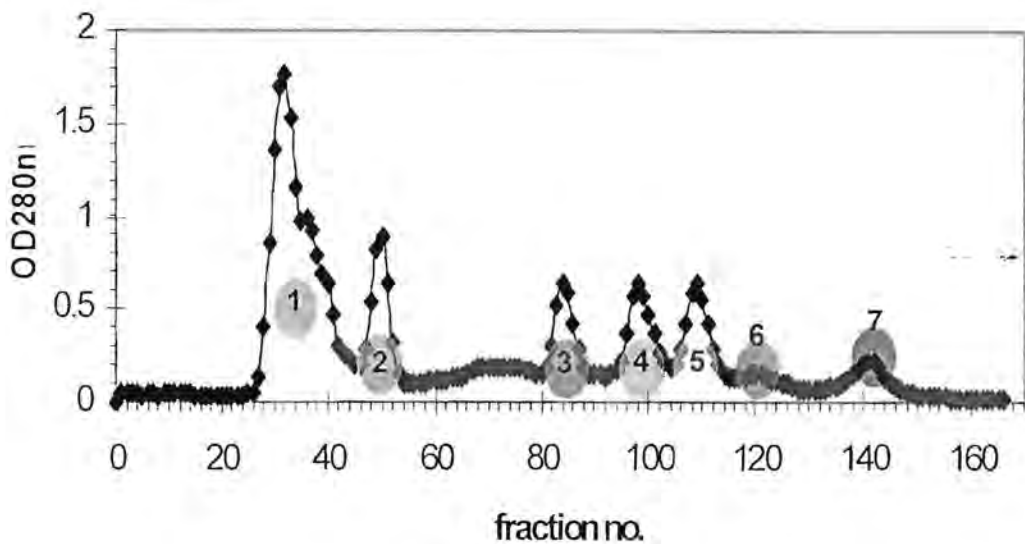
ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 50% inhibition กับความเข้มข้นของพิษงู แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 160 µg/ml (ANOVA, Tukey, p < 0.05)

1.2 ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1-F7

เมื่อนำพิษงูจงอางไปแยกส่วนด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose fast flow แยกพิษงูได้ 7 พีค ให้ชื่อ F1, F2, F3, F4, F5, F6 และ F7 ตามลำดับ ผลการแยกพิษงูดังแสดงในภาพที่ 13

Fractionation of KV on Q-sepharose column



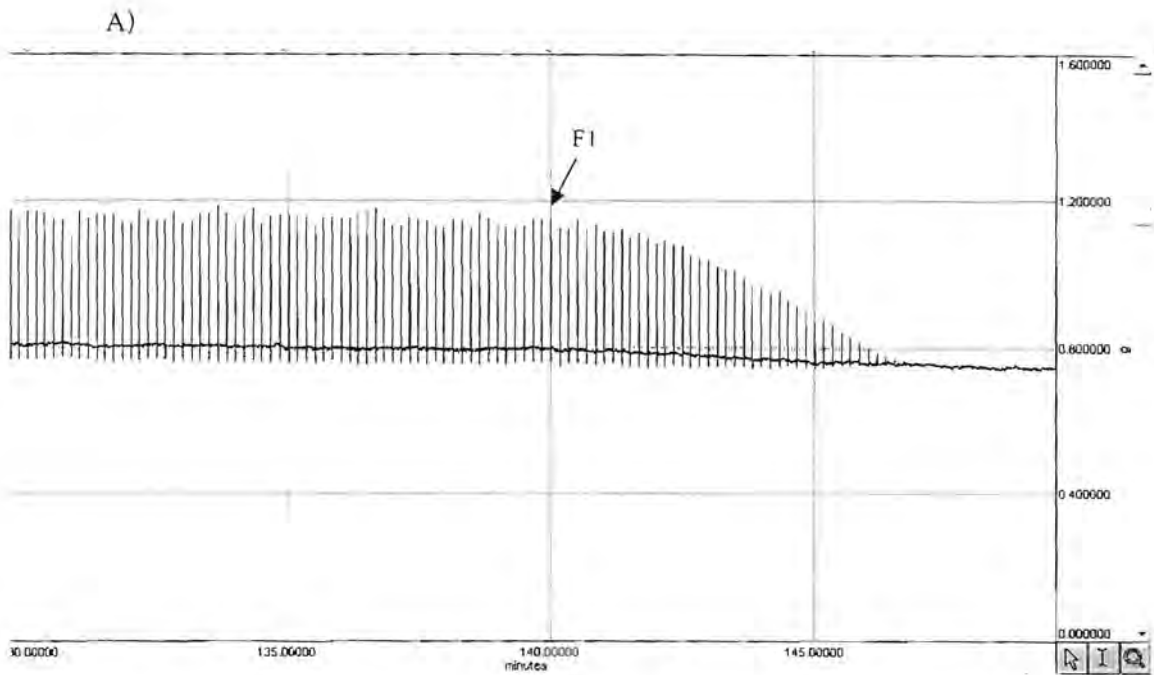
ภาพที่ 13 กราฟแสดงการแยกส่วนพิษงูจงอางด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1-F7 โดยการคำนวณความเข้มข้นของ F1 - F7 ตามสัดส่วนโปรตีนที่แยกได้จากพิษงู crude (ตารางที่ 1) ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1 - F7 ดังแสดงในภาพที่ 14 พบว่า F1 มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อดีที่สุด ดังนั้นจึงทำการแยก F1 เพื่อให้ได้ส่วนที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไป

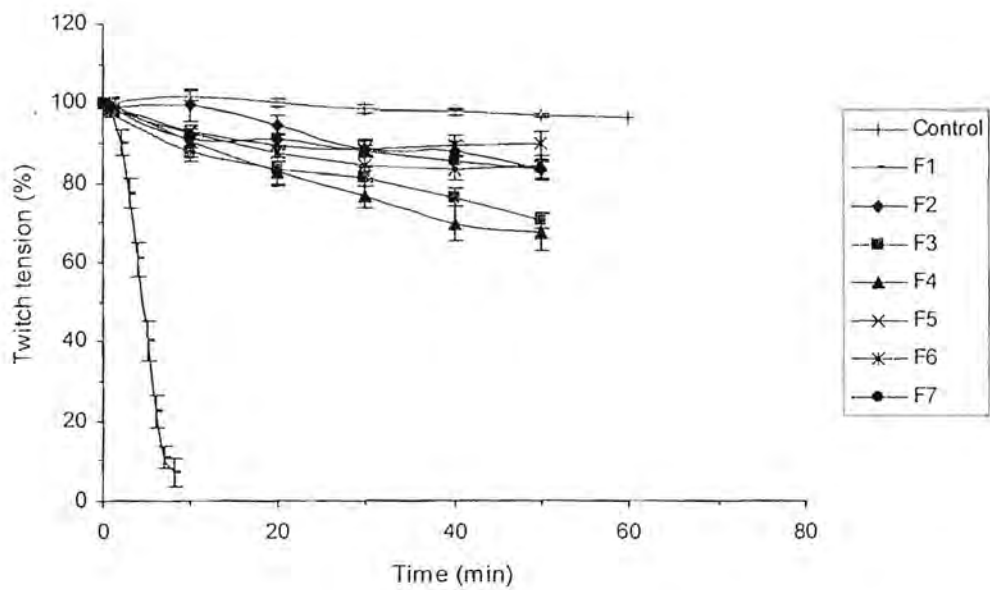
ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1 – F7 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)



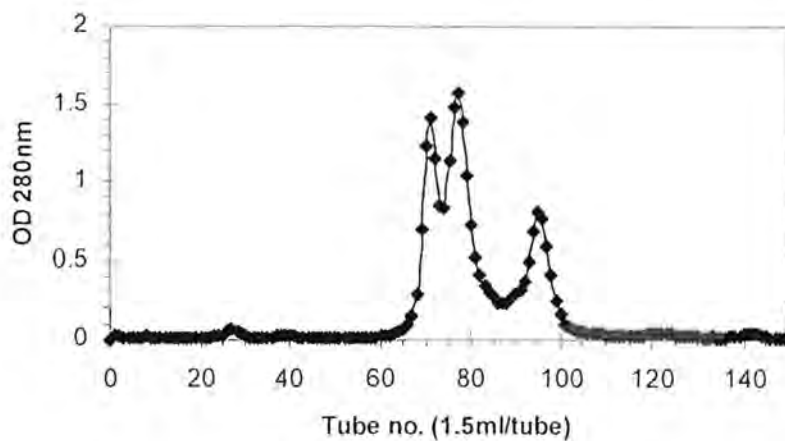
B)



ภาพที่ 14ฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1 - F7, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1, B) กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ control และ F1 - F7 แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

1.3 ฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1.1 – F1.3

Fraction F1 จากการแยกพิษงูของางด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose fast flow นำไปทำให้เข้มข้นขึ้น และผ่านลงในคอลัมน์ Cellulofine GCL-1000 sf แยกได้ 3 พิค ให้ชื่อ F1.1, F1.2 และ F1.3 ตามลำดับ ผลการแยกพิษงูดังภาพที่ 15 เมื่อนำทุกพิคที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ โดยคำนวณความเข้มข้นของ F1.1 – F1.3 ที่ใช้ทดสอบ ตามสัดส่วนของ โปรตีนที่แยกได้จาก F1 (ตารางที่ 2) ได้ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อดังแสดงในภาพที่ 16 พบว่า พิค F1.2 มีฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อดีที่สุด ดังนั้นจึงทำการแยก F1.2 เพื่อให้ได้ส่วนที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไป

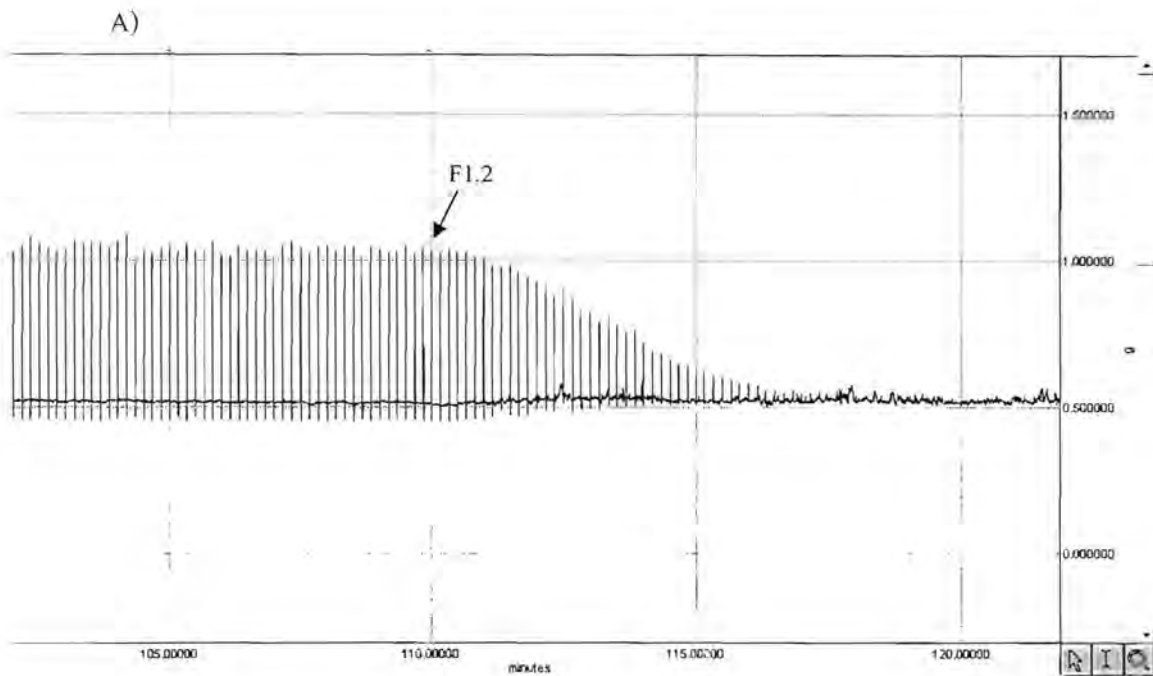


ภาพที่ 15 กราฟแสดงการแยกส่วน F1 ด้วยคอลัมน์ Cellulofine GCL-1000 sf

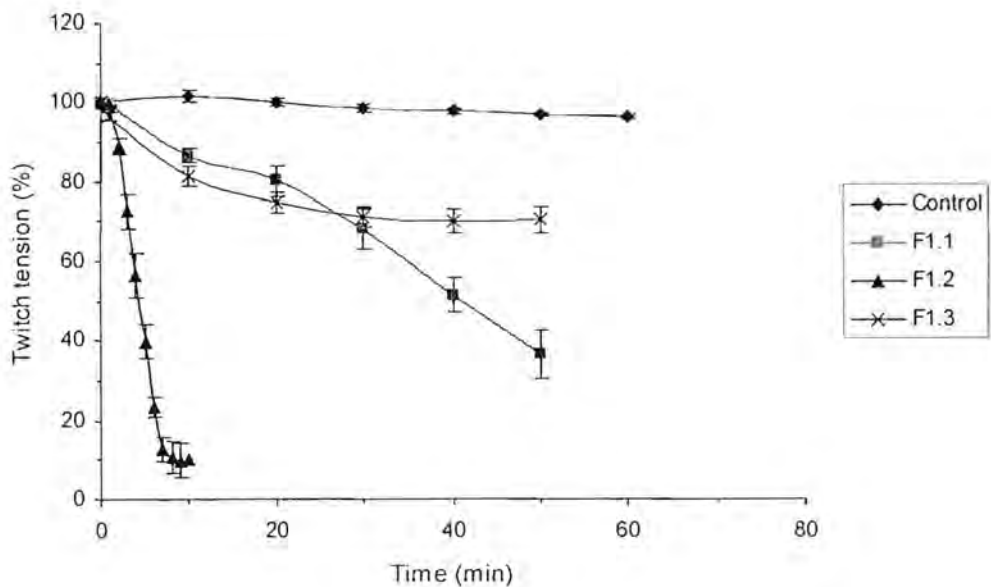
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.1 – F1.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)



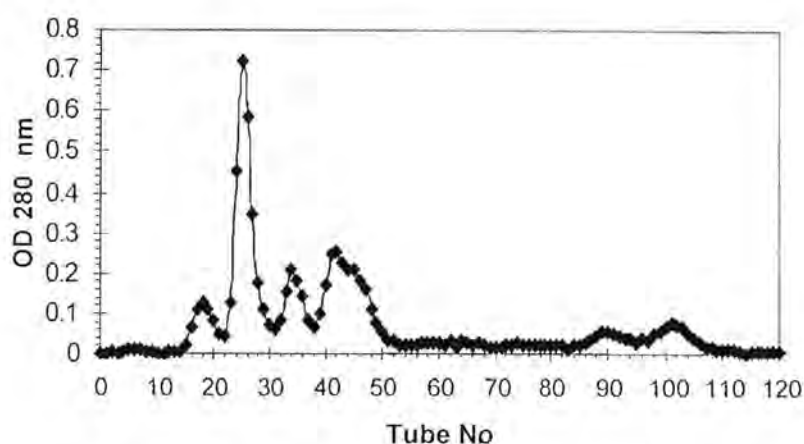
B)



ภาพที่ 16 ฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1.1 – F1.3, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1.2, B) กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ control และ F1.1 – F1.3 แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

1.4 ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ semi-purified fractions

พิษงูจงอาง fraction F1.2 จากการแยกด้วยคอลัมน์ Cellulofine GCL-1000 sf นำไปทำให้เข้มข้นขึ้น และกำจัดเกลือ โซเดียมออก จากนั้นผ่านลงในคอลัมน์ SP-Sepharose แยกโปรตีนได้ 4 พีก ให้ชื่อ F1.2.1, F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ตามลำดับ ผลการแยกพิษงูดังภาพที่ 17 เมื่อนำทุกพีกที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ โดยคำนวณความเข้มข้นของ F1.2.1 – F1.2.4 ที่ใช้ทดสอบ ตามสัดส่วนของโปรตีนที่แยกได้จาก F1.2 (ตารางที่ 3) ได้ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ดังแสดงในภาพที่ 18 พบว่า พีก F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อที่ดี และมีฤทธิ์ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงทำการศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ต่อไป

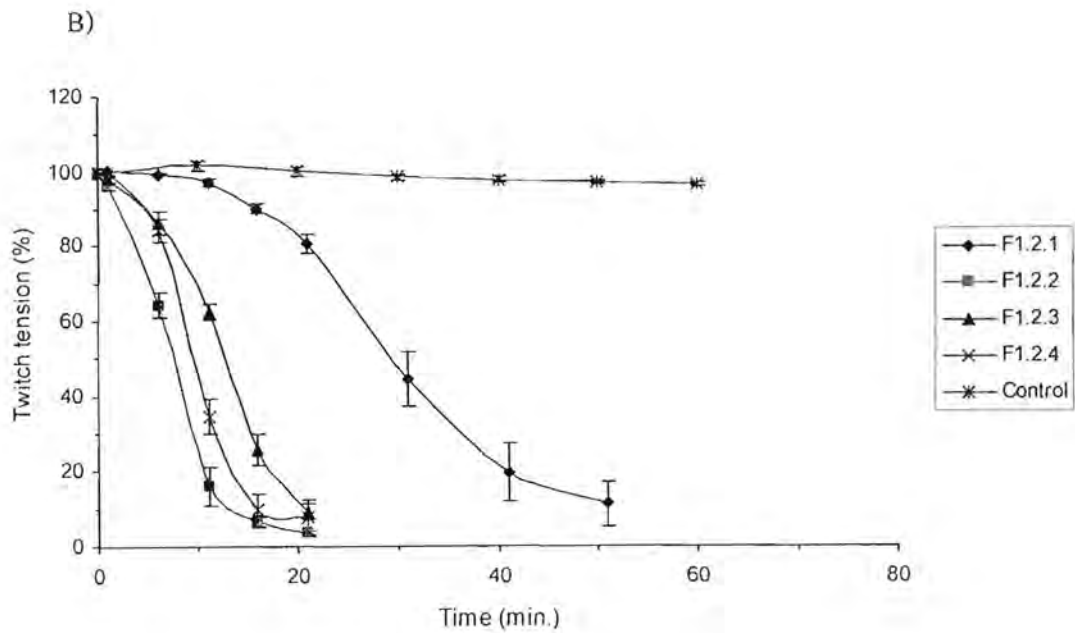
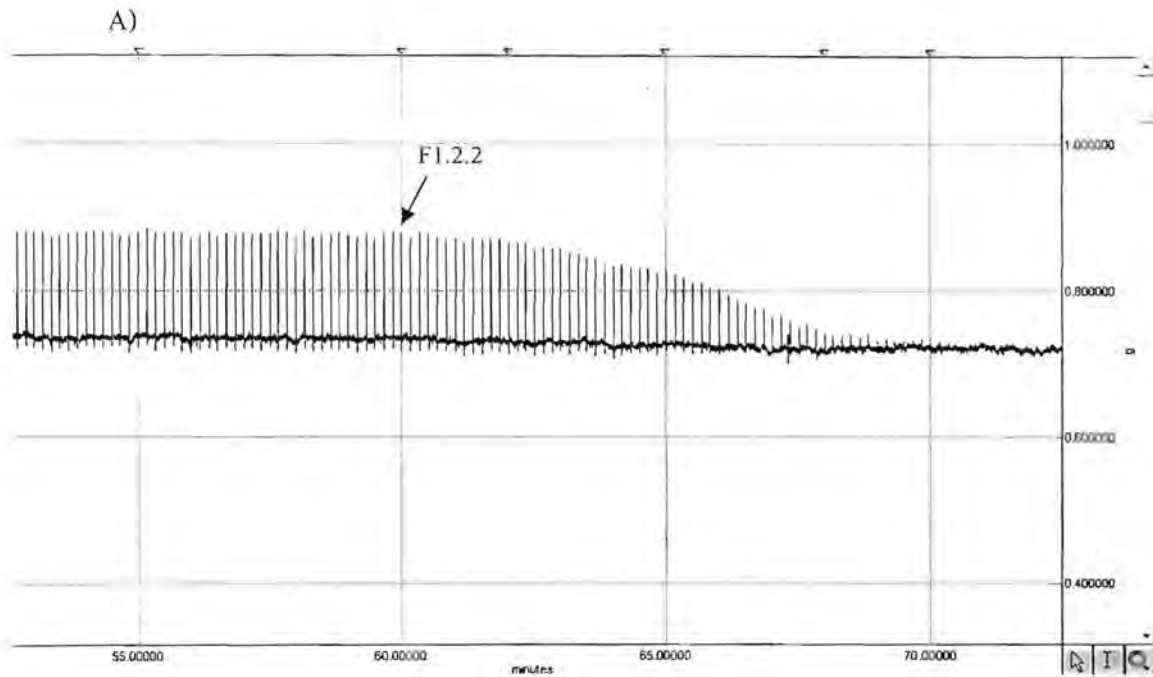


ภาพที่ 17 กราฟแสดงการแยกส่วน F1.2 ด้วยคอลัมน์ SP-Sepharose

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.2.1 – F1.2.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

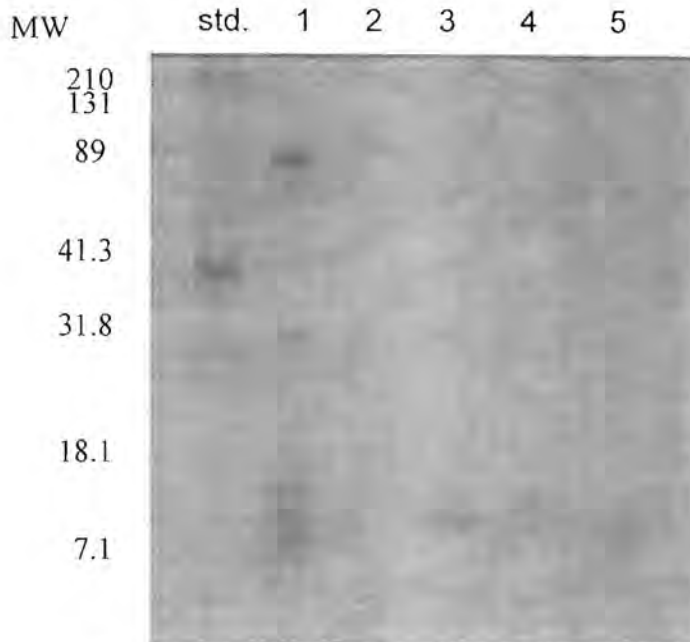
แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)



ภาพที่ 18ฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1.2.1 – F1.2.4, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1.2.2, B) กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งคลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ control และ F1.2.1 – F1.2.4 แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

1.5 การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี gel electrophoresis

พิษงูจงอาง semi-purified fractions (F1.2.1 – F1.2.4) นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับพิษงูจงอางที่ยังไม่ได้แยกส่วน ได้ผลดังภาพที่ 19 พบว่าพิษงูจงอางแยกส่วนมีแถบโปรตีนหลักอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Rf กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน พบว่า F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 มีน้ำหนักโมเลกุล 8.4, 9.0 และ 7.8 ตามลำดับ การแยกส่วนพิษงูสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4



ภาพที่ 19 การตรวจสอบพิษงูที่แยกได้ด้วยวิธี gel electrophoresis

Std = โปรตีนมาตรฐาน, MW=น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน),

1=พิษงูจงอางไม่ได้แยกส่วน, 2= F 1.2.1, 3= F1.2.2, 4= F1.2.3, 5=F 1.2.4

ตารางที่ 4 สรุปการแยกส่วนพิษงูจงอางในขั้นตอนต่าง ๆ

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	Protein (mg)	Activity ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Total activity	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude venom	1500.0	80.0	187,500	1	100
Q-Sepharose (F1)	586.3	30.5	167,514	2.6	89
Cellulofine GCL-1000 sf (F1.2)	235.2	16.6	141,686	4.8	75.6
SP-Sepharose (F1.2.2)	43.4	4.4	98,636	18.2	52.6

2. การทดสอบตำแหน่งการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิ์ที่บริเวณ pre- หรือ postsynaptic

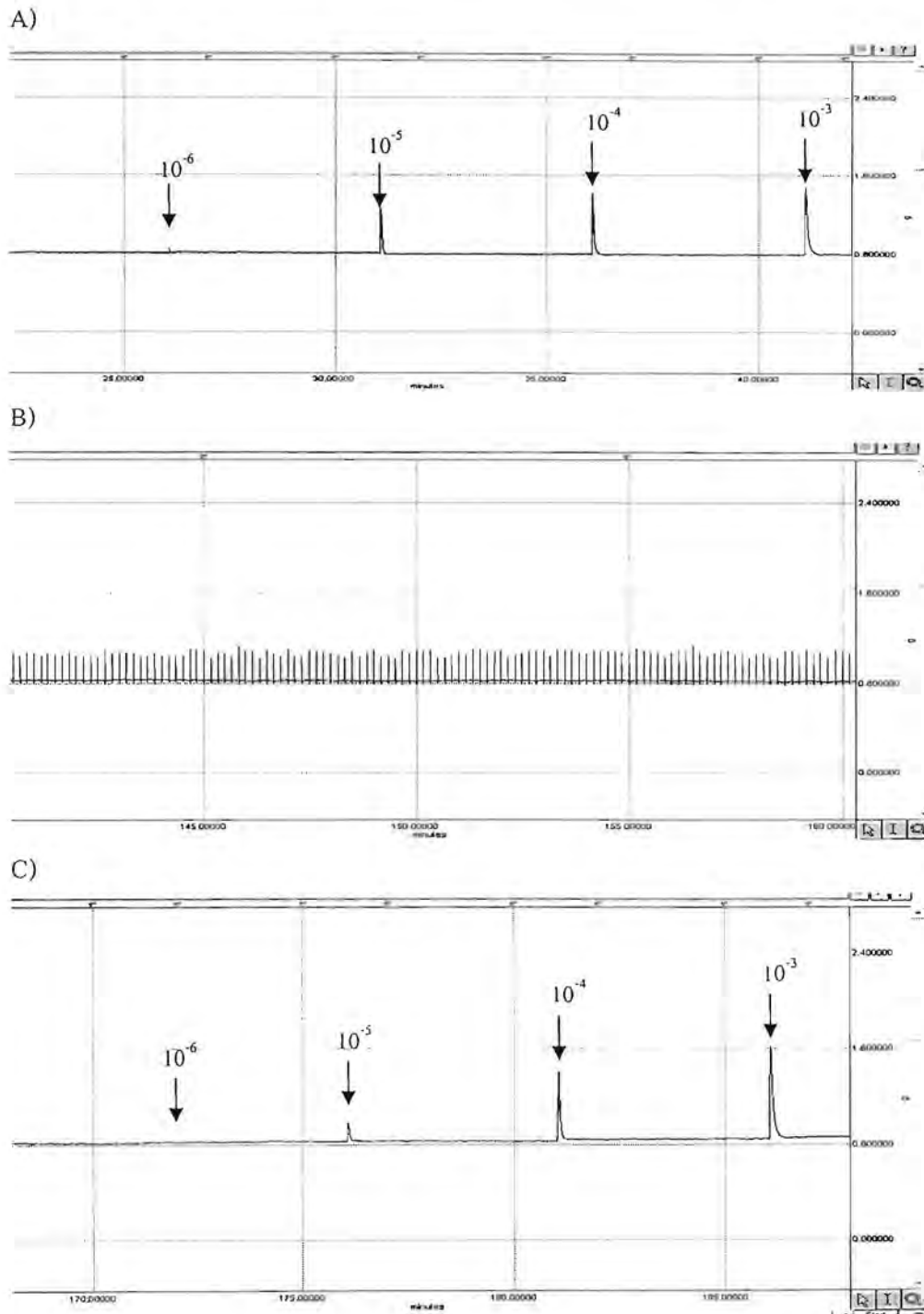
2.1 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า (control, n = 5)

การกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (ภาพที่ 20) จากการเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ทั้ง 4 ความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ในกลุ่ม control พบว่า acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} และ 10^{-3} M ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น nerve ด้วยไฟฟ้า ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น nerve ด้วยไฟฟ้า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 21) ซึ่งอาจเนื่องมาจากความผันแปรของแต่ละชิ้นเนื้อที่นำมาทำการทดสอบ

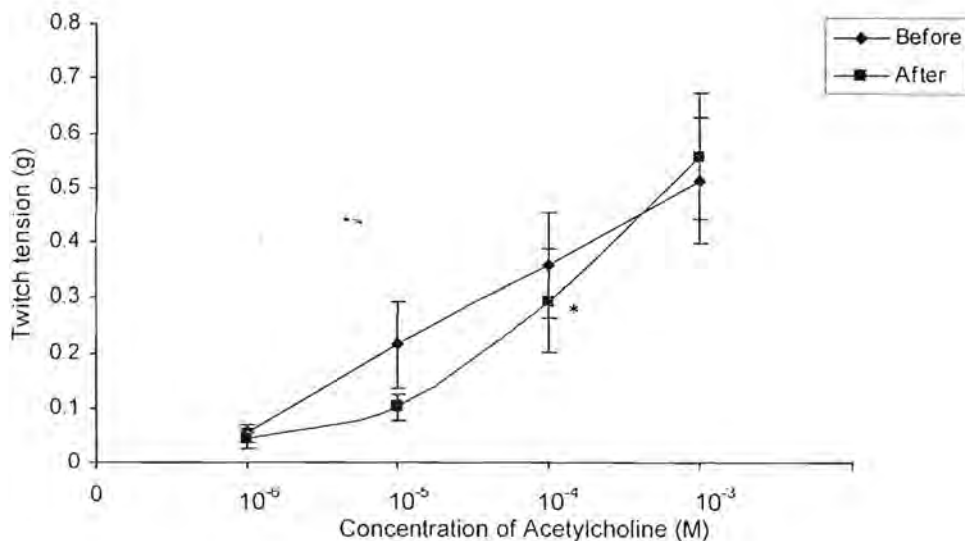
2.2 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก semi-purified fractions (n = 5)

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 22, 23 และ 24 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ทั้ง 4 ความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ให้ผลดังภาพที่ 25, 26 และ 27 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



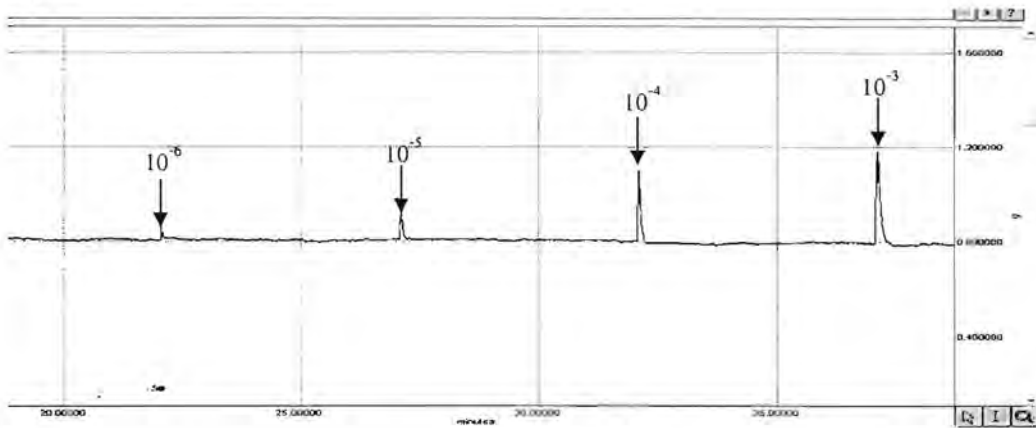
ภาพที่ 20 การหาค่าของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น (control), A) ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า, B) การกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า, C) หลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า



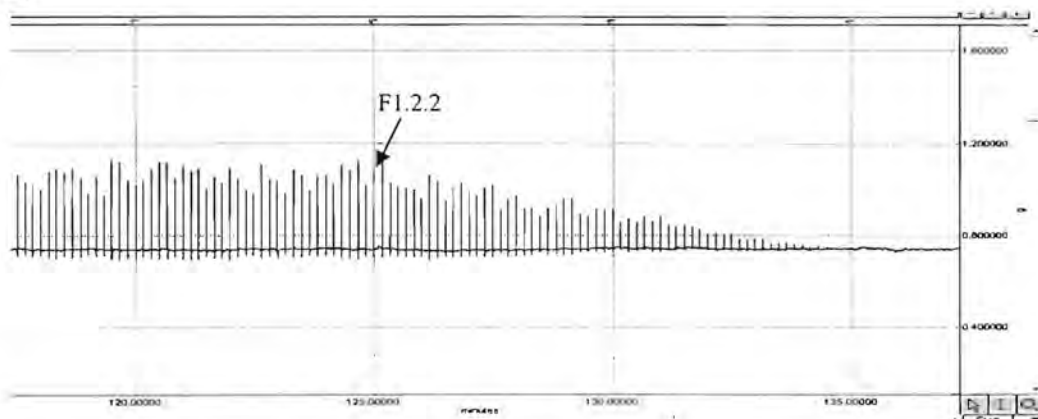
ภาพที่ 21 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (control), แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test, $p < 0.05$)

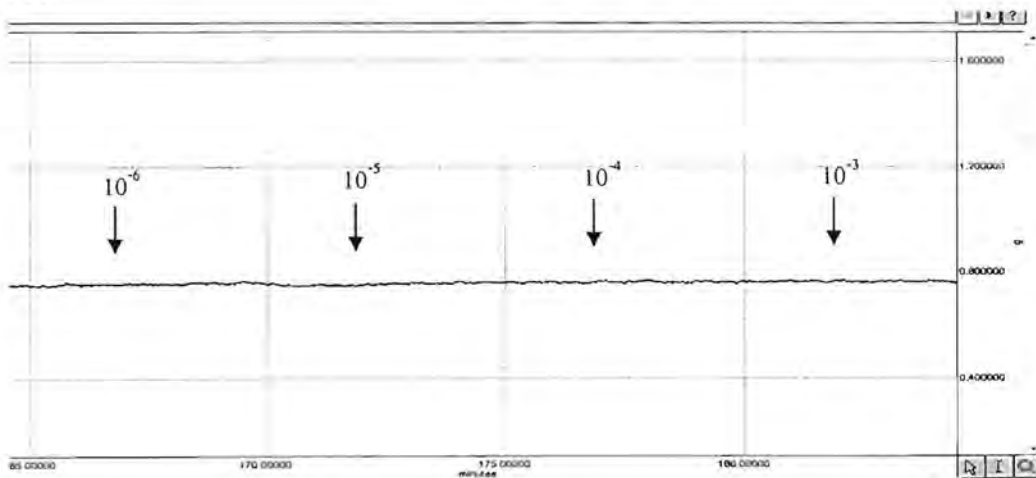
A)



B)

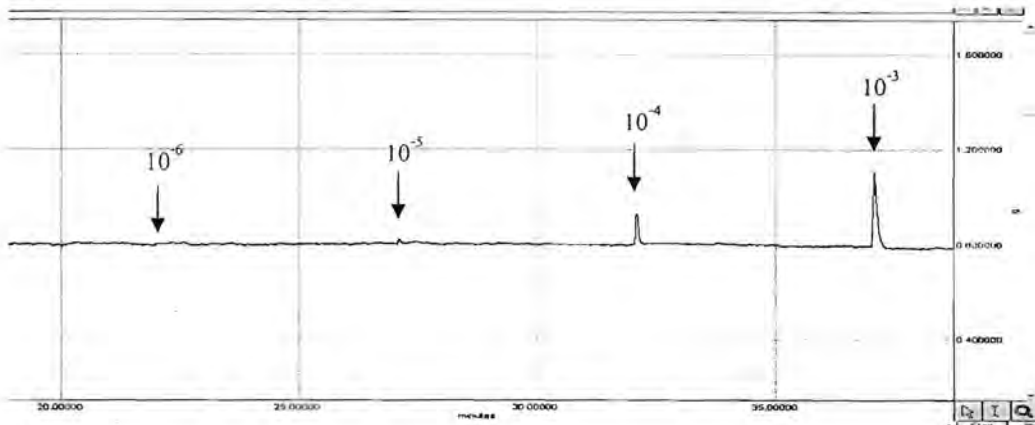


C)

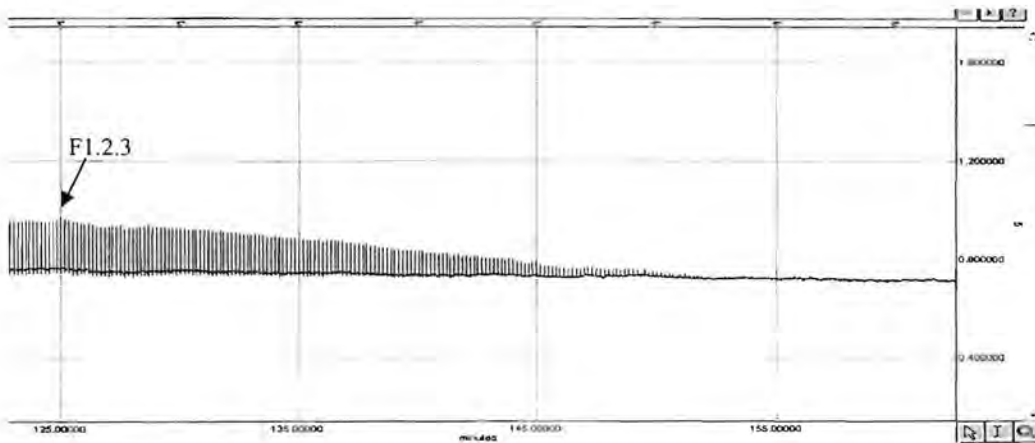


ภาพที่ 22 การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมที่ละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2, A) ก่อนการเกิด neuromuscular blockade, B) neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2, C) หลังการเกิด neuromuscular blockade

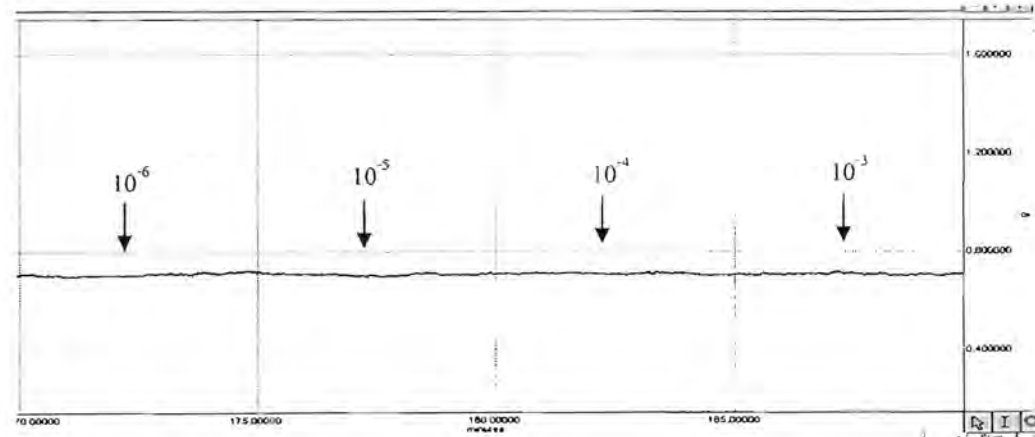
A)



B)

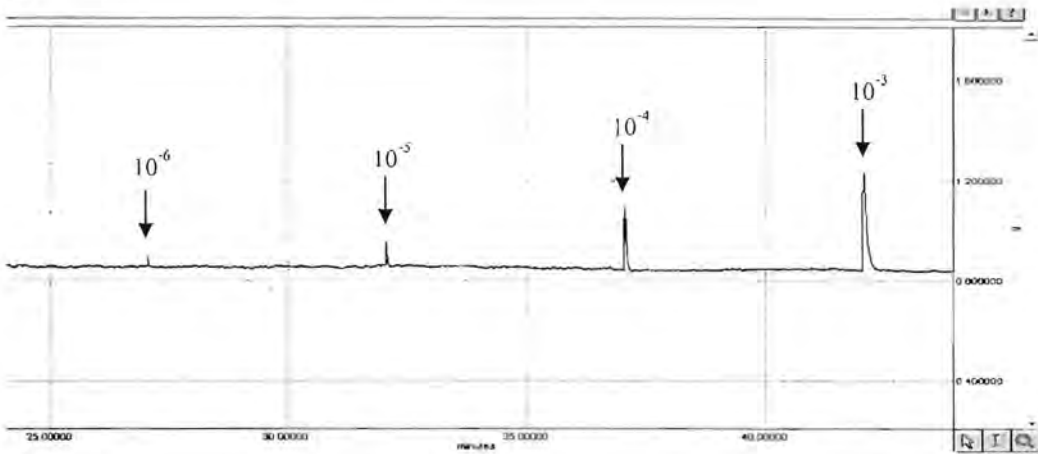


C)

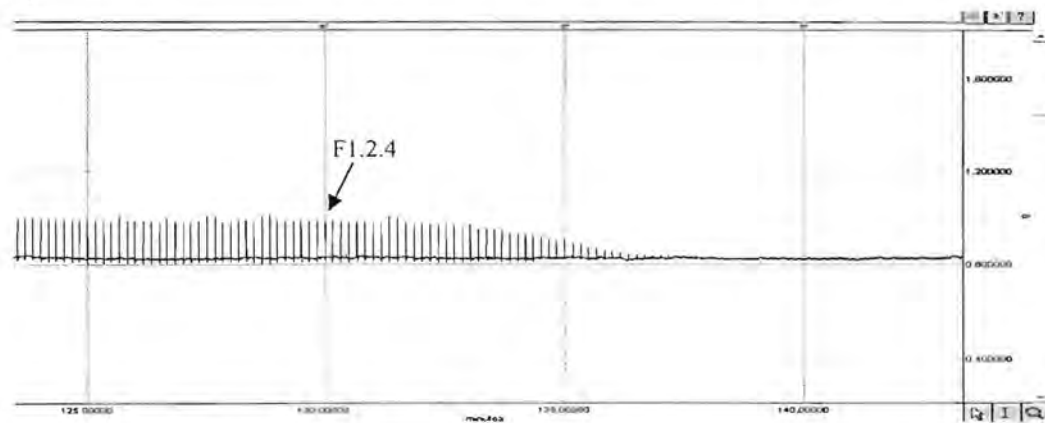


ภาพที่ 23 การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3, A) ก่อนการเกิด neuromuscular blockade, B) neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3, C) หลังการเกิด neuromuscular blockade

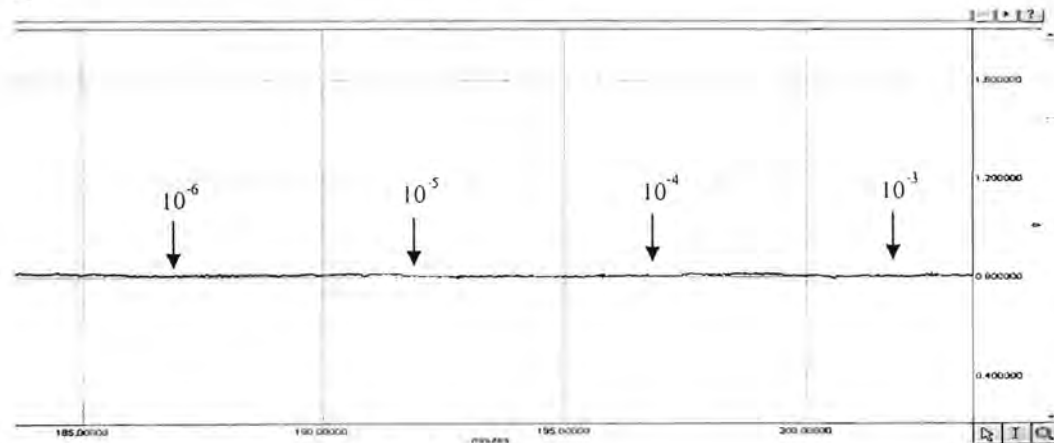
A)



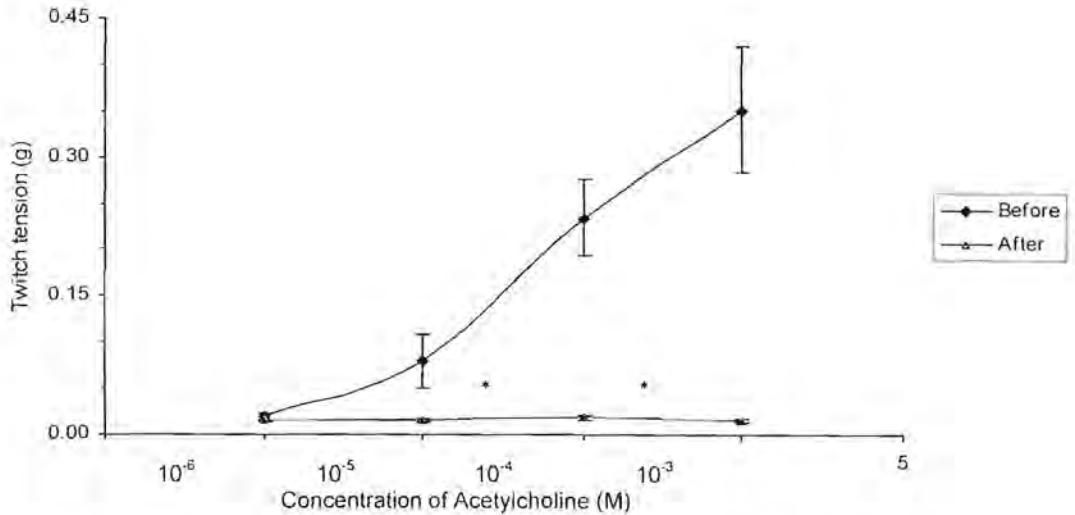
B)



C)

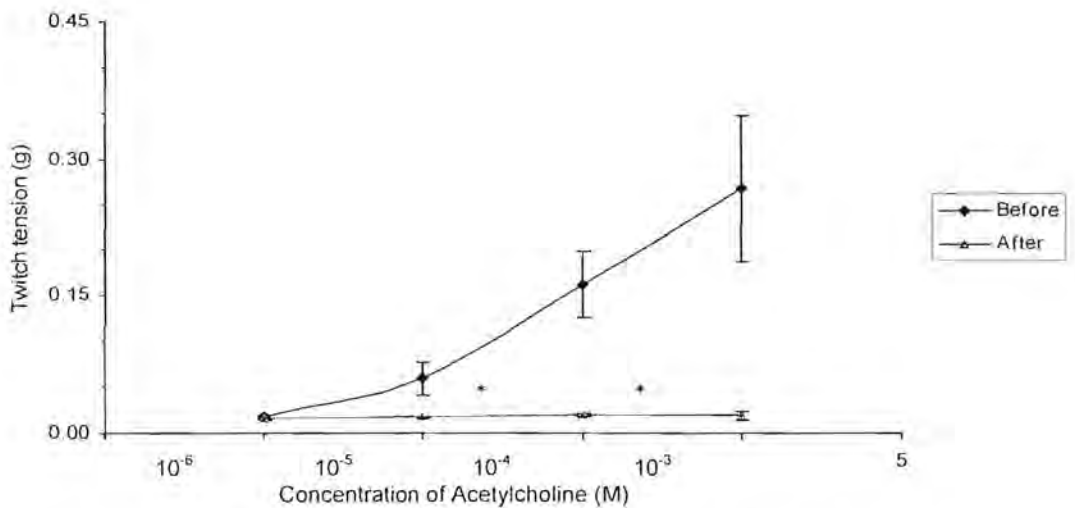


ภาพที่ 24 การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4, A) ก่อนการเกิด neuromuscular blockade, B) neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4, C) หลังการเกิด neuromuscular blockade



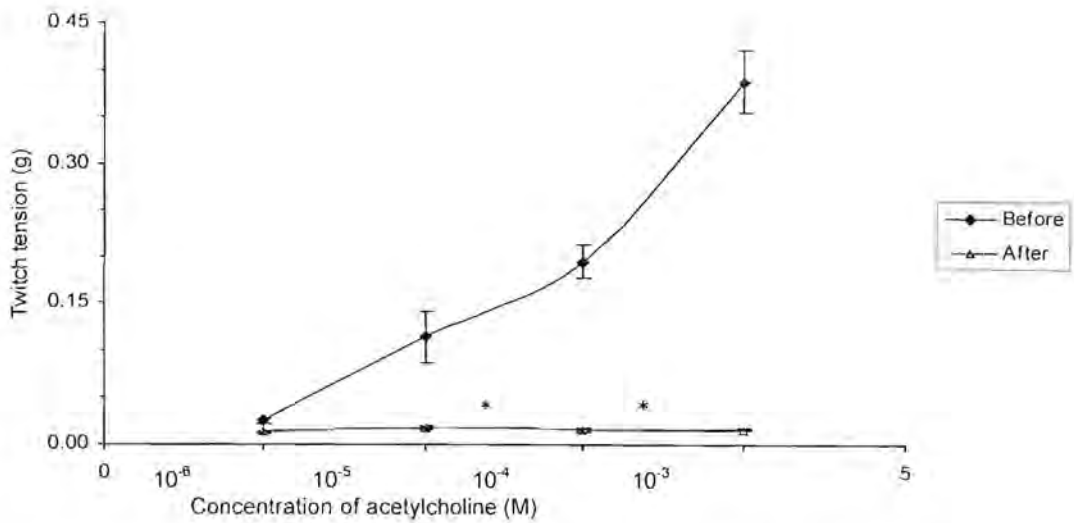
ภาพที่ 25 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2, แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test, $p < 0.05$)



ภาพที่ 26 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)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test, $p < 0.05$)



ภาพที่ 27 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)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test, $p < 0.05$)

3. การทดสอบการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

3.1 ความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride (n=3)

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 20 μ M พบว่าเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิด 95% inhibition ได้แก่ 5.7 ± 0.6 , 3.4 ± 0.3 , 2.7 ± 0.2 และ 2.5 ± 0.2 นาที ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้น 10 μ M เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อมากที่สุด (ภาพที่ 28) แต่เพื่อให้เกิดการปิดกั้น neuromuscular transmission อย่างแน่นอนจึงเลือกใช้ Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20 μ M ในการทดลองกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า เมื่อทดลองปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20 μ M และทดลองกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าต่อไปอีกจนครบ 2 ชั่วโมง ให้ผลดังภาพที่ 29 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Tubocurarine chloride 20 μ M สามารถปิดกั้น neuromuscular transmission ได้ตลอดจนครบระยะเวลาที่ทำการทดลอง

3.2 การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ unipolar electrode (n = 5)

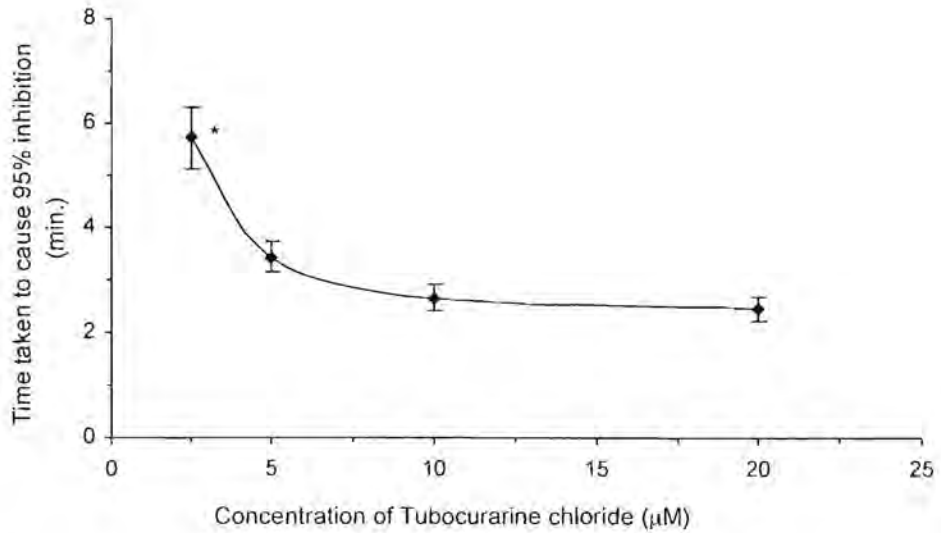
การทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 2 msec) โดยใช้ unipolar electrode ทั้งนี้ไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage จะอยู่ในช่วง 16 - 40 โวลต์ ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ภายใน 1.5 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 30

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

หลังจากทำการปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20 μM จึงทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 2 msec) โดยใช้ unipolar electrode ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ภายใน 1.5 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 31 เมื่อทำการเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ปิดกั้นและปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride (20 μM) ให้ผลดังภาพที่ 32 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

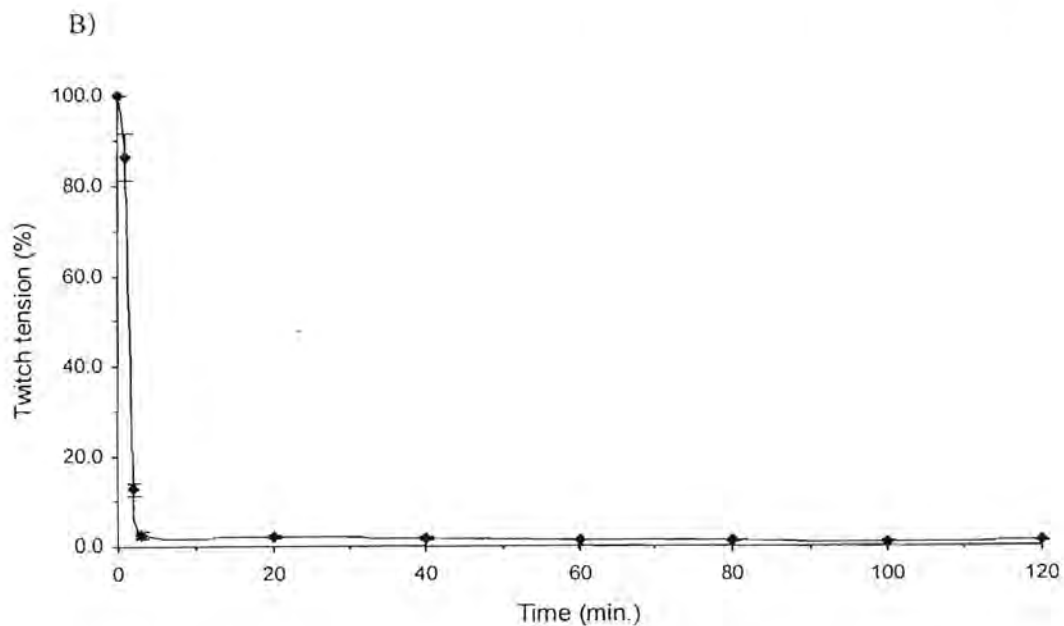
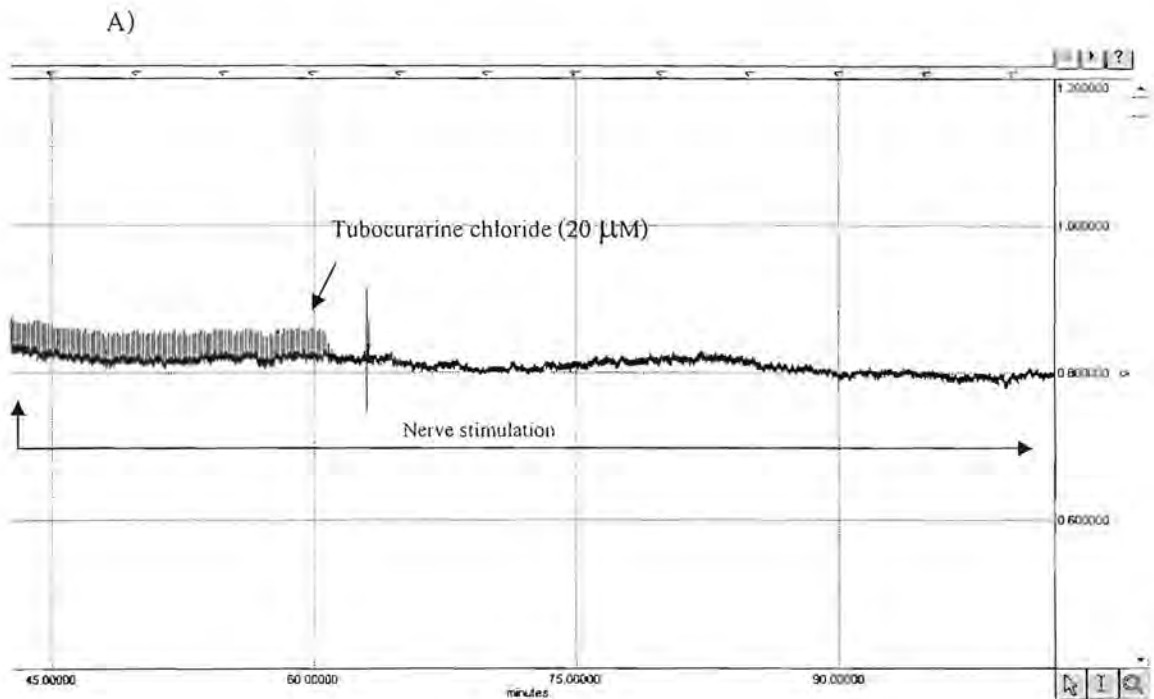
3.4 ฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อของ semi-purified fractions เมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า (n = 5)

หลังจากปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20 μM 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 33) แสดงว่า F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

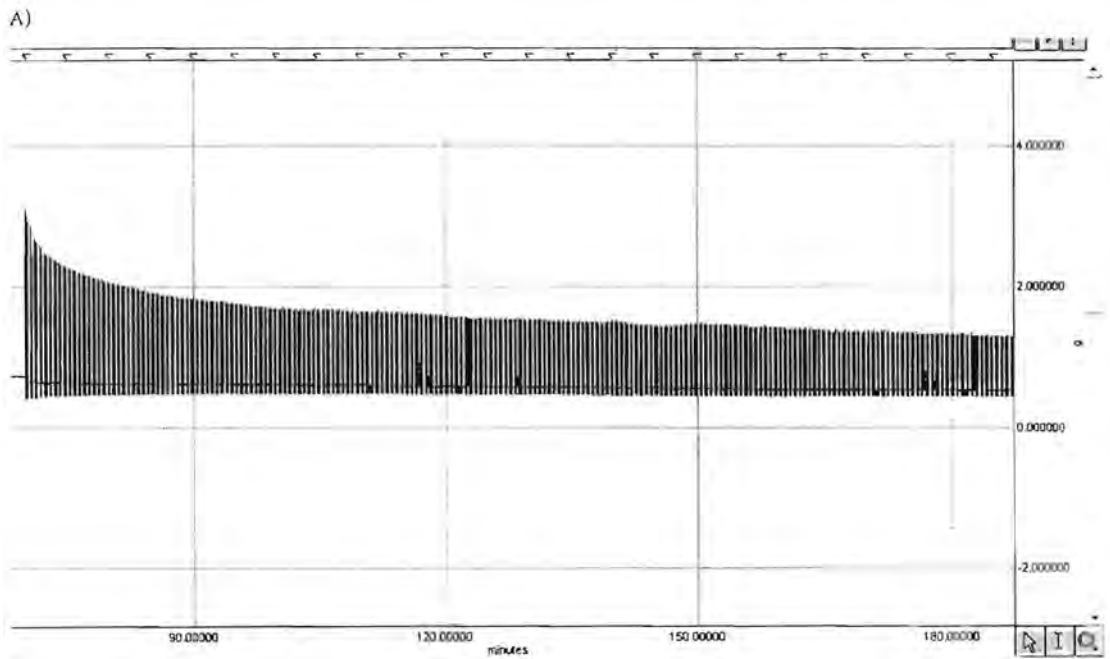


ภาพที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 95% inhibition กับความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride, แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

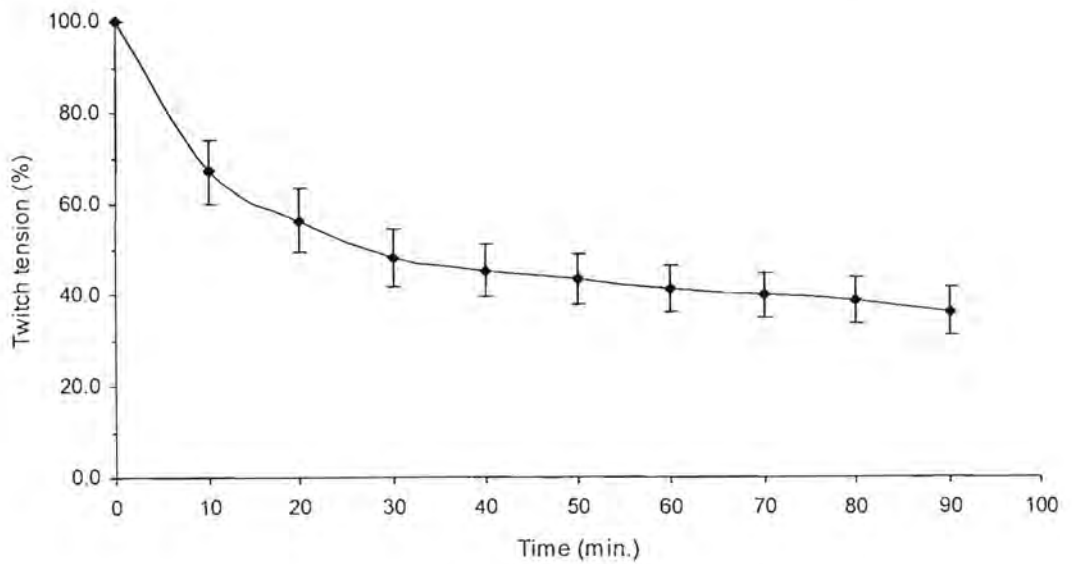
* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 20 μM (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$)



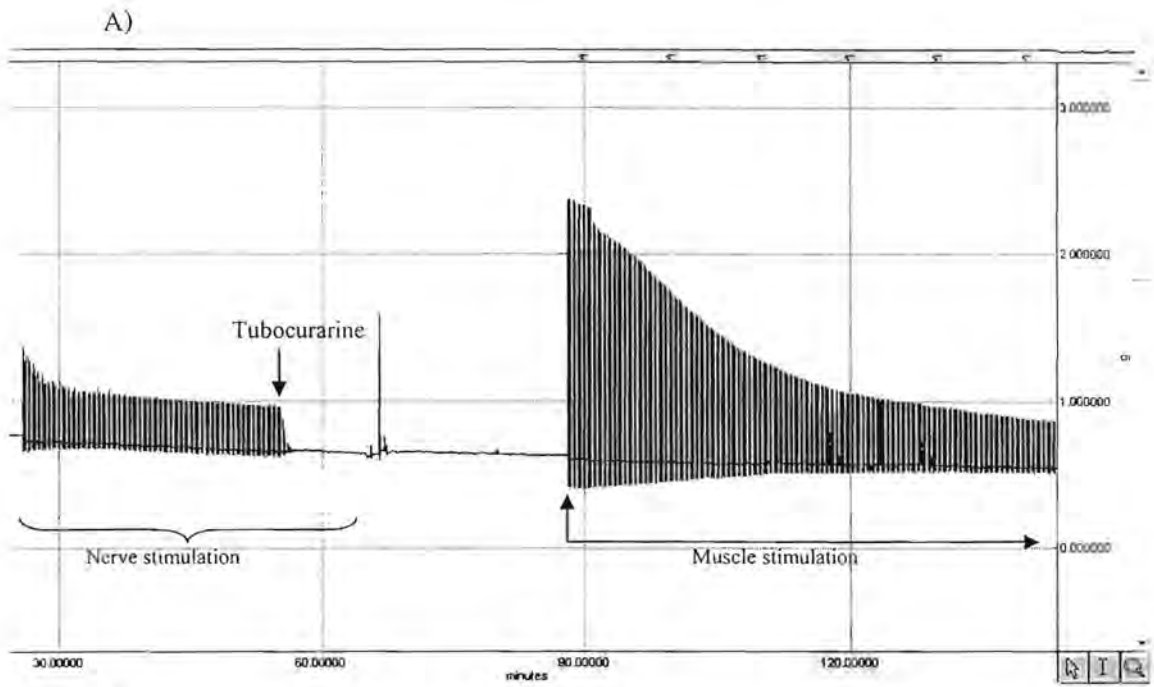
ภาพที่ 29 ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ Tubocurarine chloride, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ Tubocurarine chloride (20 μ M), B) กราฟแสดงการปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride (20 μ M) โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือ การหดตัวของกล้ามเนื้อก่อนใส่ Tubocurarine chloride จากนั้นคือการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังใส่ Tubocurarine chloride ที่เวลาต่าง ๆ, แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)



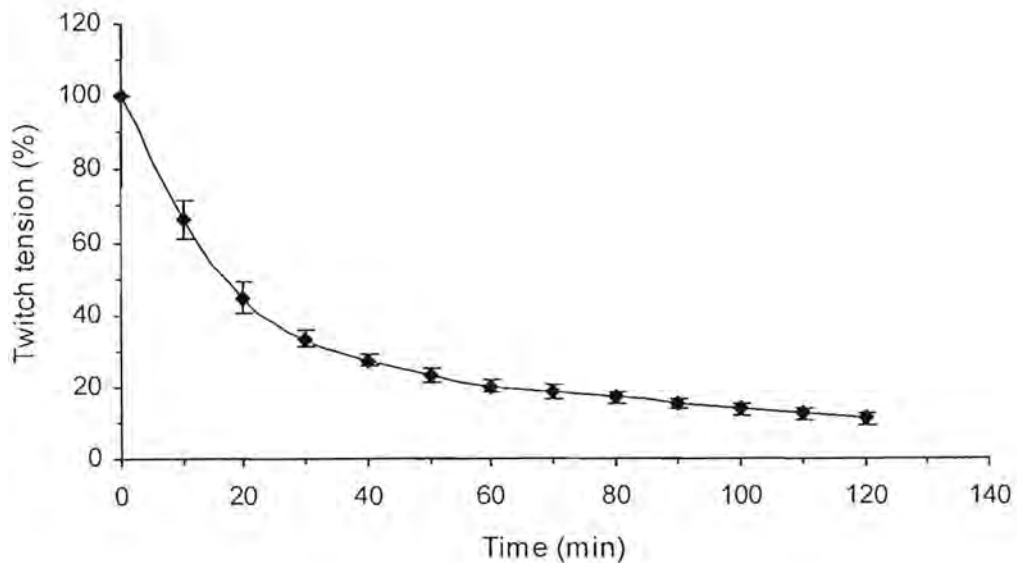
B)



ภาพที่ 30 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, B) กราฟแสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

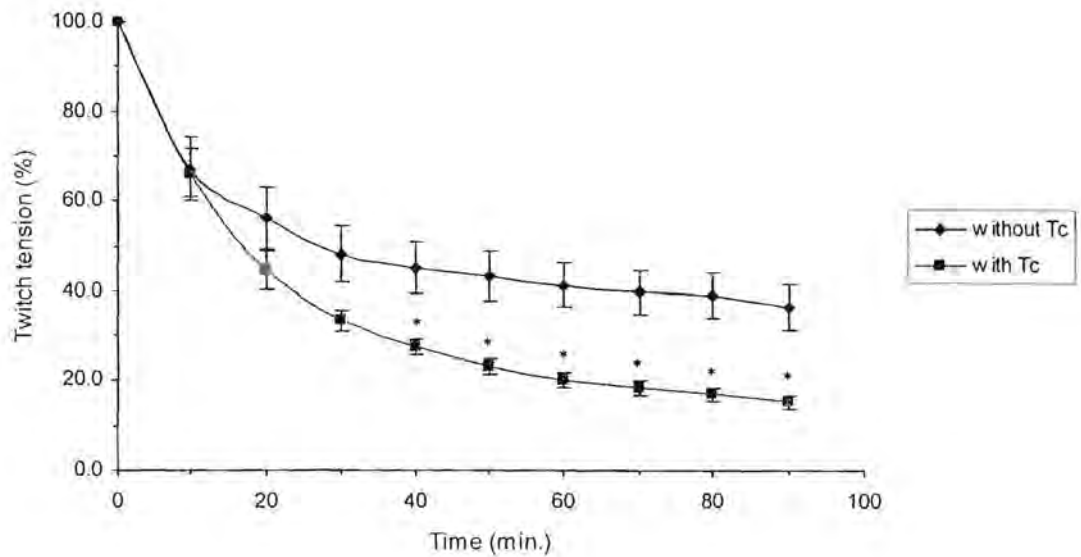


B)



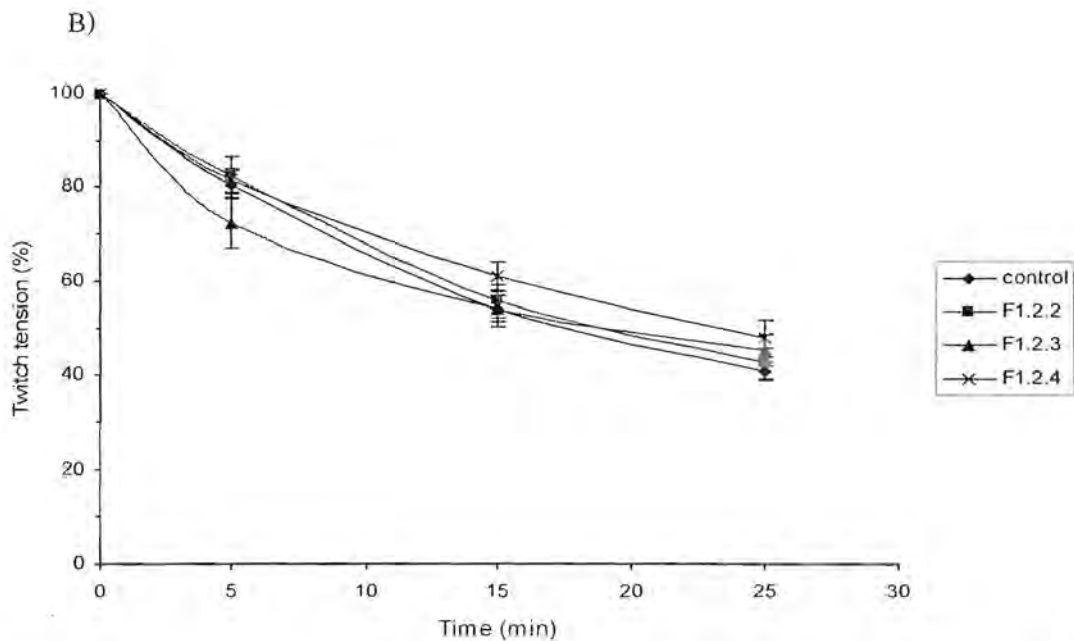
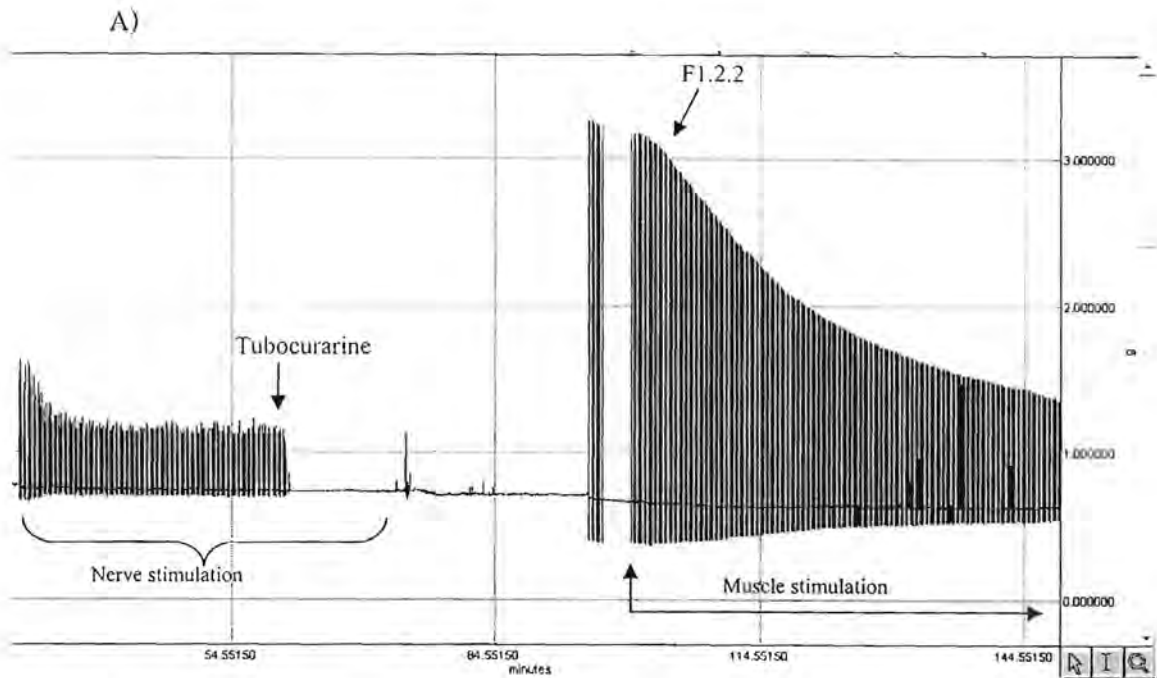
ภาพที่ 31 การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, B) กราฟแสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าที่เวลาต่าง 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 32 การเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ใช้ Tubocurarine chloride (without Tc) และใช้ Tubocurarine chloride เพื่อปิดกั้น neuromuscular transmission (with Tc), แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรง ด้วยไฟฟ้า โดยไม่ใช้ Tubocurarine chloride ที่เวลาเดียวกัน (ANOVA, $p < 0.05$)



ภาพที่ 33 ผลของ F1.2.2 - F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรง ด้วยไฟฟ้า 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)

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษงูจงอาง และส่วนของพิษงูจงอาง โดยใช้ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ประกอบด้วยกล้ามเนื้อกระบังลมที่มีเส้นประสาทติดอยู่ ซึ่งแสดงถึงการทำงานบริเวณ neuromuscular junction กล้ามเนื้อกระบังลมจะถูกเลี้ยงอยู่ในสารละลาย Krebs solution ซึ่งเป็นสถานะที่เซลล์กล้ามเนื้อและเส้นประสาทยังมีชีวิตอยู่ได้ และยังสามารถทำงานได้ กล้ามเนื้อจะถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้าโดยผ่านทาง phrenic nerve ส่งต่อมายังกล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว (contraction) ตามจังหวะความถี่ของการกระตุ้น กล้ามเนื้อสามารถหดตัวได้มากกว่า 4 ชั่วโมง แม้ว่า การหดตัวนั้นจะค่อย ๆ ลดลงทีละน้อย แต่มีช่วงเวลาที่กล้ามเนื้อหดตัวคงที่ คือลดลงไม่เกิน 5% ที่ช่วงเวลา 60 นาที ซึ่งช่วงเวลานี้จะใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และเพื่อให้แน่ใจว่า กล้ามเนื้ออยู่ในช่วงเวลาที่กล้ามเนื้อหดตัวได้คงที่ จึงปล่อยให้การหดตัวคงที่อยู่ประมาณ 10 นาที จึงเริ่มทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อด้วยพิษงูจงอางหรือ fractions ภายในเวลาไม่เกิน 50 นาที และเนื่องจากการแยกส่วนพิษงูในแต่ละครั้งจะได้ปริมาณ fraction ที่แยกได้น้อยมาก ดังนั้นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบจะสัมพันธ์กับ % yield ของโปรตีน ที่ได้ของแต่ละ fraction

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของพิษงู (crude venom) และ ส่วนของพิษงู เมื่อพิจารณาความแรงในการออกฤทธิ์แล้วจะเห็นได้ว่า พิษงูจงอางถูกแยกออกเป็นทั้ง fractions และ semi-purified fractions และความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบก็ถูกทอนส่วนลงตาม % yield ของโปรตีนที่ได้ แต่ยังคงพบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ F1 (30.5 $\mu\text{g/ml}$), F1.2 (16.6 $\mu\text{g/ml}$), F1.2.2 (4.4 $\mu\text{g/ml}$) และ F1.2.4 (3.7 $\mu\text{g/ml}$) ที่ฤทธิ์ไม่แตกต่างจาก crude venom (80 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งแสดงว่า semi-purified fractions ที่มีฤทธิ์แรงและน่าสนใจ คือ F1.2.2 และ F1.2.4

การแยกส่วนพิษงูจงอางนั้นอาจมีขั้นตอนหรือวิธีการแยกที่แตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วจะอาศัยหลักการทาง chromatography ซึ่งอาศัยความแตกต่างของประจุบนโมเลกุล (ion exchange chromatography) อาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล (gel filtration chromatography) อาศัยความสามารถในการถูกดูดซับที่ความแตกต่างกัน (affinity chromatography) เป็นต้น และใช้เทคนิค HPLC มาช่วยทำให้ ส่วนที่แยกได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งในการศึกษานี้ใช้เทคนิค ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography ในการแยกส่วน โดย semi-purified fractions ที่แยกได้ อาจเป็น neurotoxin ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันกับที่มีผู้เคยทำการแยกไว้ ซึ่งต้องทำการพิสูจน์ความบริสุทธิ์และหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป

ในการแยกส่วนพิษงูจงอางนี้เป็นการแยกส่วนโดยใช้พิษงูจงอาง (crude) ครั้งละ 100 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถแยกได้เมื่อใช้คอลัมน์ขนาด 2.5 x 28 เซนติเมตร จากนั้นจะนำส่วนที่แยกได้ไปผ่านขั้นตอนทาง chromatography ต่าง ๆ อีก 2 ขั้นตอน สุดท้ายได้ส่วนกึ่งบริสุทธิ์ 4 ส่วน (F1.2.1 – F1.2.4) เก็บและรวมส่วนกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ในแต่ละครั้งรวมกัน ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกพิษงูจงอางจำนวน 1500 มิลลิกรัม (ภาคผนวก ก, ตารางที่ 19) ได้ส่วนกึ่งบริสุทธิ์ 14.07, 43.42, 17.78 และ 31.65 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.9%, 2.9%, 1.2%, 2.1% ของพิษงูที่ยังไม่ได้แยกส่วน ตามลำดับ โดยทุกส่วนย่อยเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อได้ภายในเวลา 60 นาที แต่ที่มีฤทธิ์การยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อได้ดี (เร็ว) ที่สุดคือ F1.2.2 ซึ่งพบว่ามีควมบริสุทธิ์เพิ่มจากพิษงูที่ยังไม่แยกส่วน 18 เท่า และมีน้ำหนักโมเลกุล 8.4 กิโลดาลตัน

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าพิษงูกึ่งบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิด ใช้เวลาในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อแตกต่างจากพิษงูที่ยังไม่แยกส่วน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อในแต่ละขั้นตอนของการแยกส่วนพิษงู เป็นการนำพิษงูแต่ละครั้งของการทำให้บริสุทธิ์มาใช้ ดังนั้นการคำนวณสัดส่วนโปรตีนของส่วนแยกย่อยจึงอาจมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้โปรตีนที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อคลาดเคลื่อนไปด้วย หรือมีการสูญเสียโปรตีนไปในขั้นตอนการทำให้เข้มข้นขึ้นก่อนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป จึงทำให้การคำนวณโปรตีนที่ใช้ทดสอบฤทธิ์แตกต่างจากพิษงูที่ไม่แยกส่วน สาเหตุอีกประการที่อาจเป็นไปได้ อาจเกิดจากพิษงูกึ่งบริสุทธิ์เหล่านี้จะออกฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต้องอาศัยโปรตีนอีกชนิดหนึ่งในการเสริมฤทธิ์ (synergistic protein)

ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อของ semi-purified fractions ทำให้กล้ามเนื้อไม่เกิดการ contraction เมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้าผ่านทางเส้นประสาท บริเวณที่ fraction จะออกฤทธิ์อาจเป็นที่ presynaptic หรือ postsynaptic ซึ่งจะทำให้การทดสอบได้โดยใช้ exogenous acetylcholine หาก semi-purified fractions ออกฤทธิ์ที่บริเวณ presynaptic จะทำให้ไม่เกิดการหลั่ง endogenous acetylcholine เมื่อให้ exogenous acetylcholine ซึ่งจะเข้าไปจับที่ acetylcholine receptor ได้ ชักนำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว แต่หาก exogenous acetylcholine ไม่สามารถทำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวได้ นั่นคือไม่สามารถเข้าไปจับที่ acetylcholine receptor ได้ เนื่องจากที่ presynaptic membrane มีการหลั่ง endogenous acetylcholine แสดงว่า semi-purified fractions ออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า semi-purified fraction F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chang และคณะ (16) ที่ศึกษาในพิษงูจงอางเช่นกัน และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Reali และคณะ (20) ซึ่งศึกษาในพิษงูเห่าไทยซึ่งเป็นงูพิษที่อยู่ในวงศ์เดียวกับงูจงอาง และมีความคล้ายคลึงกับงูจงอางทั้งรูปร่าง ลักษณะภายนอก และองค์ประกอบของพิษงู (10)

การออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic นี้อาจออกฤทธิ์ได้ 2 วิธี โดย semi-purified fraction ไปจับกับ acetylcholine receptor ทำให้ acetylcholine ไม่สามารถทำงานได้จึงไม่ทำให้เกิดการ contraction ของกล้ามเนื้อ หรือ semi-purified fraction อาจออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง

เมื่อทำการทดสอบต่อไปจะทำการป้องกันไม่ให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวเนื่องจากกระแสประสาทที่ส่งมาจาก phrenic nerve โดยปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride ซึ่งจะจับกับ acetylcholine receptor ไว้ หากมีการกระตุ้นที่เส้นประสาทเกิดขึ้น และหลัง acetylcholine ออกมาก็จะไม่สามารถจับกับ acetylcholine receptor ที่กล้ามเนื้อได้ และไม่ชักนำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ Tubocurarine chloride ยังช่วยป้องกันไม่ให้ semi-purified fraction จับกับ acetylcholine receptor ด้วย เนื่องจากทั้ง acetylcholine และ tubocurarine สามารถจับกับ nicotinic acetylcholine receptor ที่บริเวณ α -subunits ได้เช่นเดียวกัน (8) ซึ่งจะทำให้แน่ใจได้ว่าการทดสอบฤทธิ์ของ semi-purified fraction ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้านั้น เป็นการทดสอบการออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง ดังนั้น เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ และทำการทดสอบด้วย semi-purified fractions หากกล้ามเนื้อยังเกิดการหดตัวได้ แสดงว่าไม่มีการออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง แต่หากยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อได้ แสดงว่า semi-purified fractions มีการออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ในกลุ่ม control มีค่าลดต่ำลงมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะการกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยไฟฟ้าโดย unipolar electrode จะสูญเสียกระแสไฟฟ้าบางส่วนไป เพราะต้องส่งกระแสไฟผ่าน physiological solution ไปยังสายกราวด์เพื่อให้ครบวงจร จึงอาจส่งผลให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวที่ต่ำลง เนื่องมาจากสูญเสียปริมาณกระแสไฟที่ใช้กระตุ้นกล้ามเนื้อไป หรืออาจเนื่องมาจากต้องใช้กระแสไฟที่มากขึ้นในการกระตุ้นกล้ามเนื้อ เพราะกระแสไฟบางส่วนต้องสูญเสียไป จึงทำให้กล้ามเนื้ออ่อนล้าลง แต่ได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลโดยใช้ bipolar electrode กระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรง ซึ่งกระแสไฟจะถูกส่งไปยังกล้ามเนื้อโดยไม่มีการสูญเสียให้กับ solution ผลการทดสอบพบว่าเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วย electrode ทั้งสองชนิดแล้ว ให้ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ไม่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ลดต่ำลงนี้ไม่ได้เกิดจากกระแสไฟฟ้า ซึ่งผลการทดลองได้แสดงไว้ในภาคผนวก แต่การหดตัวของกล้ามเนื้อที่ลดลงนี้อาจเป็นผลของ tubocurarine chloride ซึ่งนำมาใช้ปิดกั้น neuromuscular transmission ซึ่งอาจมีความเข้มข้นที่สูงเกินไป อาจทำให้กล้ามเนื้อเกิดการอ่อนล้าลง เนื่องจาก tubocurarine มีผลรบกวน mitochondrial oxidative metabolism (29) ซึ่งอาจส่งผลถึงพลังงานที่ต้องใช้ในการเกิด cross-bridge ของ actin และ myosin ในการทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ แต่อย่างไรก็ตามในช่วงเวลา 30 นาทีแรกการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยไฟฟ้า หลังการใช้ Tubocurarine chloride เทียบกับที่ไม่ได้ใช้ Tubocurarine chloride แล้วให้ผลไม่ต่างกันจึงสามารถพิจารณาการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังการทดสอบด้วย semi-purified fractions ที่เปลี่ยนแปลงไปเทียบกับ control ได้ ซึ่งผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ไม่มีการออกฤทธิ์ที่

กล้ามเนื้อโดยตรง เพราะการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ดำเนินไปตามเวลาต่าง ๆ หลังการทดสอบด้วย semi-purified fraction ทั้ง 3 fractions ให้ผลไม่ต่างจากกลุ่ม control

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า พืชงองอาจมีส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ เมื่อแยกส่วนพืชงองอาจได้ส่วนกิ่งบริสุทธิ์คือ 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 คือ ออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic และไม่มีฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง ดังนั้นจึงน่าที่จะออกฤทธิ์โดยจับกับ acetylcholine receptor บนกล้ามเนื้อ ยับยั้งไม่ให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวได้

ในการศึกษาต่อไปจึงน่าที่จะทำการศึกษาพิสูจน์ความบริสุทธิ์ ศึกษาถึงโครงสร้าง และหาลำดับกรดอะมิโนของ semi-purified fractions ที่แยกได้ เพื่อนำไปเทียบชนิดกับ neurotoxin ที่แยกได้และมีการรายงานในการศึกษาวิจัยอื่นๆ ก่อนหน้านี้นี้ และเพื่อการ clone ส่วนที่บริสุทธิ์ที่น่าสนใจ นำไปพัฒนาเป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์หรืองานวิจัยต่อไป และอาจทำการศึกษายืนยันการออกฤทธิ์ที่บริเวณ nicotinic acetylcholine receptor และยืนยันตำแหน่งในการจับว่าอยู่ที่ subunits ไค และยังคงอาจศึกษาถึงฤทธิ์อื่นๆ ของ semi-purified fractions ที่แยกได้ เช่น analgesic activity ซึ่งมีผู้รายงานไว้ว่าพบฤทธิ์นี้ใน neurotoxin ที่แยกได้จากพืชงองอาจ (19) ตลอดจนศึกษาถึง enzyme activity เช่น phospholipase A₂ ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่พบในพืชงองอาจ เนื่องจากพบการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ใน neurotoxin ที่แยกจากพืชงองอาจซึ่งเป็นพืชที่มีความคล้ายคลึงกับพืชงองอาจมาก (20) นอกจากนี้อาจศึกษาถึงความเข้มข้นของ tubocurarine chloride ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ ปิดกั้น neuromuscular transmission เพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อการทำงานของกล้ามเนื้อในการทดลองต่อไป

บรรณานุกรม

1. Harvey, A. L.; Bradley, K. N.; Cochran, S. A.; Rowan, E. G.; Pratt, J. A.; Quillfeldt, J. A. and Jerusalinsky, D. A. What can toxins tell us for drug discovery?. Toxicon 36, 11 (1998): 1635-1640.
2. Bentsianov, B.; Zalvan, C. and Blitzer, A. Noncosmetic use of Botulinum toxin. Clinics in Dermatology 22 (2004): 82-88.
3. Yee, J. S. P.; Nanling, G.; Afifiyan, F.; Donghui, M.; Lay, P. S.; Armugam, A. and Jeyaseelan, K. Snake postsynaptic neurotoxins; gene structure, phylogeny and applications in research and applications in research and therapy. Biochimie 86 (2004): 137-149.
4. Yang, C. C. Snake neurotoxins. The Snake 16 (1984): 90-103.
5. ภาควิชาสรีรวิทยา, คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หนังสือประกอบการบรรยาย วิชากายวิภาคศาสตร์และสรีรวิทยา 1 พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546.
6. Bern, R. M.; Levy, M. N.; Koeppen, B. M. and Stanton, B. M. Physiology. 5th ed. U.S.A.: Mosby, 2004.
7. Meunier, F. A.; Schiavo, G. and Molgo, J. Botulinum neurotoxins: from paralysis to recover of functional neuromuscular transmission. Journal of Physiology 96 (2002): 105-113.
8. Garland, M. C.; Foreman, R. C.; Chad, J. E.; Holden-Dye, L. and Walker, R. J. The actions of muscle relaxants at nicotinic acetylcholine receptor isoforms. European Journal of Pharmacology 357 (1998): 83-92.
9. Tatro, D. S. Drug facts 2nd ed. U.S.A.: Facts and comparisons, 2000.
10. Lee, C. Y. Snake Venom U.S.A.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1979.
11. ไพบุลย์ จินตกุล และ ลาวัณย์ จันทร์โฮม. งูพิษในประเทศไทย กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด, 2539.
12. Joubert, F. J. Snake venom toxins: The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure 317 (1973): 85-98.
13. Tan, N. H. and Saifuddin, M. N. Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom and venom fractions. Toxicon 27, 6 (1989): 689-695.
14. Chang, C.; Huang, T. Y.; Kuo, K. W.; Chen, S. W.; Huang, K. F. and Chiou, S. H. Sequence characterization of a novel α -neurotoxin from the king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom. Biochemical and Biophysical Research Communications 191, 1 (1993): 214-223.

15. Lin, S.; Chang, L. and Chang, C. Disulfide isomers of α -neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. Biochemical and Biophysical Research Communications 254 (1999): 104-108.
16. Chang, L.; Liou, J.; Lin, S. and Huang, H. Purification and characterization of a neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hanna* (king cobra) venom. Biochemical and Biophysical Research Communications 294 (2002): 574-578.
17. De, P.; Dasgupta, S. C. and Gomes, A. A lethal neurotoxic protein from Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. Indian Journal of Experimental Biology 40, 12 (2002): 1359-64.
18. He, Y. Y.; Lee, W. H and Zhang, Y. Cloning and purification of alpha-neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*). Toxicon 44, 3 (2004): 295-303.
19. Pu, X. C.; Wong, P. T. H.; and Gopalakrishnakone, P. A novel analgesic toxin (Hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) Toxicon 33, 11 (1995): 1425-1431.
20. Reali, M.; Serafım, F. G.; Cruz-Höfling, M. A. and Fontana, M. D. Neurotoxic and myotoxic actions of *Naja naja Kaothia* venom on skeletal muscle *in vitro*. Toxicon 41 (2003): 657-665.
21. Cooper, D and Reich, E. Neurotoxin from venom of the cobra, *Naja naja siamensis*. The Journal of Biological Chemistry 247, 10 (1972): 3008-3013.
22. Nirthanan, S.; Gao, P.; Gopalakrishnakone, P.; Gwee, M. C. E.; Khoo, K. E.; Cheah, L. S. and Kini, R. M. Pharmacological characterization of mikatoxin, an α -neurotoxin isolated from the venom of the New-Guinean small-eyed snake *Micropechis ikaheka*. Toxicon 40 (2002): 863-871.
23. Rössetto, O.; Rigoni, M. and Montecucco, C. Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. Toxicology Letters 149 (2004): 91-101.
24. Kuruppu, S.; Fry, B. G. and Hodgson, W. C. Presynaptic neuromuscular activity of venom from the brown-headed snake (*Glyphodon tristis*). Toxicon 45 (2005): 383-388.
25. Damico, D. C. S.; Bueno, L. G. F.; Simioni, L. R.; Marangoni, S.; Cruz-Höfling, M. A. and Novello, J. C. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. Toxicon 46 (2005): 222-229.
26. Fontana, M. D.; Lucas, H. S. M. and Vital Brazil, O. Neuromuscular blocking action of the *Theraphosa blondii* spider venom. Journal of Venomous Animals and Toxins 8 (2002): 98-101.

27. วีธีร์ อัดถทิพพหลคุณ. กอดส์มันน์โครมาโตกราฟี กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2534.
28. Bülbriing, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. British Journal of Pharmacology 1 (1946): 38-61.
29. Gallagher, C. H. and Judah, J. D. The effects of neuromuscular blocking agents on mitochondria-III Effect of d-tubocurarine and pyrrolizidine alkaloids on the uptake and depletion of cations. Biochemical pharmacology 16 (1967): 883-895.
30. Laemli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (1970): 680-685.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารละลาย Krebs solution

ประกอบด้วย :	NaCl	118	mM
	KCl	4.8	mM
	KH ₂ PO ₄	1.2	mM
	CaCl ₂	2.5	mM
	MgSO ₄	2.4	mM
	NaHCO ₃	25	mM
	D-Glucose	11	mM

วิธีการคำนวณ

NaCl 118 mM (MW = 58.44)

NaCl 1 mM เท่ากับ 58.44 mg/L

ต้องการ NaCl 118 mM เท่ากับ $58.44 \times 118 = 6895.9$ mg/L หรือ 6.8959 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง NaCl 6.8959 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

KCl 4.8 mM (MW = 74.55)

KCl 1 mM เท่ากับ 74.55 mg/L

ต้องการ KCl 4.8 mM เท่ากับ $74.55 \times 4.8 = 357.8$ mg/L หรือ 0.3578 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง KCl 0.3578 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

CaCl₂ 2.5 mM (MW = 147.02)

CaCl₂ 1 mM เท่ากับ 147.02 mg/L

ต้องการ CaCl₂ 2.5 mM เท่ากับ $147.02 \times 2.5 = 367.55$ mg/L หรือ 0.3676 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง CaCl₂ 0.3676 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

MgSO₄ 2.4 mM (MW = 246.48)

MgSO₄ 1 mM เท่ากับ 246.48 mg/L

ต้องการ MgSO₄ 2.4 mM เท่ากับ $246.48 \times 2.4 = 591.55$ mg/L หรือ 0.5916 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง MgSO₄ 0.5916 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

KH₂PO₄ 1.2 mM (MW = 136.09)

KH₂PO₄ 1 mM เท่ากับ 136.09 mg/L

ต้องการ KH₂PO₄ 1.2 mM เท่ากับ $136.09 \times 1.2 = 163.31$ mg/L หรือ 0.1633 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง KH₂PO₄ 0.1633 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

NaHCO_3 25 mM (MW = 84.01)

NaHCO_3 1 mM เท่ากับ 84.01 mg/L

ต้องการ NaHCO_3 25 mM เท่ากับ $84.01 \times 25 = 2100.3$ mg/L หรือ 2.1003 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง NaHCO_3 2.1003 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

D-Glucose 11 mM (MW = 180.16)

D-Glucose 1 mM เท่ากับ 180.16 mg/L

ต้องการ D-Glucose 11 mM เท่ากับ $180.16 \times 11 = 1981.8$ mg/L หรือ 1.9818 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง D-Glucose 1.9818 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

หมายเหตุ : น้ำหนักโมเลกุลที่ใช้ในการคำนวณเพื่อเตรียมสารละลาย ต้องเป็นน้ำหนักโมเลกุลของสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการนั้น ๆ

วิธีเตรียม

- ชั่งสารเคมีตามน้ำหนักที่คำนวณได้และละลายในน้ำกลั่นดังนี้

NaCl	6.8959 g	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml	_____ (1)
KCl	0.3578 g	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml	_____ (2)
CaCl_2	0.3676 g	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml	_____ (3)
MgSO_4	0.5916 g	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml	_____ (4)
KH_2PO_4	0.1633 g	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 300 ml	_____ (5)
D-Glucose	1.9818 g	ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml	_____ (6)
- นำ (1), (2), (3), (4), (5) และ (6) เทลงใน beaker ขนาด 1000 ml ตามลำดับความสามารถในการละลายของสารแต่ละตัวจากละลายดีมากไปยังละลายน้อย เมื่อสารผสมกันดี เติม NaHCO_3 2.1003 g ลงไปผสมให้เข้ากันหากยังไม่เข้ากันหรือยังไม่ละลายไม่ต้อางเติมน้ำกลั่นลงไปอีกประมาณ 100 ml
- เทสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 1000 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml ปิดขวดแล้วผสมสารทั้งหมดอีกครั้ง โดยกลับขวดพลิกไปมาเบาๆ 5-10 ครั้ง (สารทั้งหมดต้องละลายเป็นเนื้อเดียวกัน)
- เก็บสารละลายไว้ในตู้เย็น ซึ่งเก็บไว้ใช้ได้ประมาณ 2-3 วัน การใช้ทุกครั้งให้รินใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อในปริมาณที่ต้องการใช้แล้วจึงนำไปใช้ ถ้าใช้แล้วเหลือห้ามเทกลับใส่ขวดให้ทิ้งไปเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

ภาคผนวก ข

การเตรียม phrenic nerve – hemi-diaphragm ที่แยกจากกายหนู mouse

(Mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation)

วิธีดำเนินการ

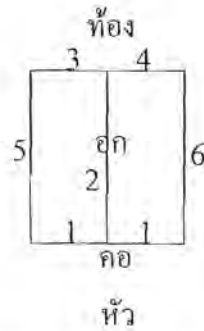
1. เตรียม Krebs solution และนำไปแช่ในตู้เย็นให้มีอุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส
2. เตรียมชุดอุปกรณ์ organ bath ให้เรียบร้อย โดยเติม Krebs solution ใส่ไว้ใน organ bath ชั้นใน เปิดเครื่อง Thermo regulating water pump เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส และเปิดท่อและถัง gas carbogen ให้ gas ไหลผ่านเข้าไปฟุ้งกระจายใน Krebs solution เตรียมรอไว้
3. เปิดเครื่องวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ เครื่องแปลงสัญญาณ เครื่องปรับแต่งสัญญาณ และเครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผล รวมถึงอุปกรณ์อื่นที่เกี่ยวข้อง ทำการ calibrate แรงดึง (tension) ด้วยค้อนน้ำหนักขนาด 5 g โดยแขวนค้อนน้ำหนักไว้กับตะขอที่ต่อกับ transducer และทำการ calibrate
4. เตรียมชุดอุปกรณ์ผ่าตัดเล็ก เข็มซึ่งมีไหมร้อยอยู่ และถาดจีฟี่สำหรับรองผ่าตัด
5. ใส่ Krebs solution ที่มีอุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส ลงในถาดจีฟี่สำหรับรองผ่าตัด เปิดท่อ gas ปลดปล่อยให้ gas carbogen ให้ไหลผ่านเข้าไปฟุ้งกระจายใน Krebs solution เตรียมรอไว้
6. สลบหนูด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใส่หนูลงในโหลมีฝาปิดซึ่งต่อกับท่อก๊าซ
7. เมื่อหนูสลบถึงหมดความรู้สึก และเสียชีวิต ทำการผ่าเปิดบริเวณช่องคอซึ่งจะตัดเส้นเลือด บีบเลือดให้ออกมากที่สุด
8. ตัดหนังช่วงอกออกไปเพื่อเปิดให้เห็นกระดูกซี่โครงทั้งซ้ายและขวา ตามภาพแสดงแนวการผ่าตัด แนวการตัดที่ 2 ให้ตัดจากคอกยาวไปจนถึงท้องช่วงต้น
9. ตัดกระดูกซี่โครงออกเพื่อเปิดให้เห็นช่องอกตามแนวการตัดในภาพแสดงแนวการผ่าตัด โดยแนวการตัดที่ 2 ให้ตัดจากคอกไปจนถึงกระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายมากที่สุด และแนวการตัดที่ 3 และ 4 ให้ตัดเกาะซิดไปตามแนวกระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายมากที่สุด
10. เมื่อช่องอกเปิดโล่งจะเห็นต่อมไธมัส หัวใจ และปอด รวมไปถึงกระบังลมซึ่งเป็นแผ่นกล้ามเนื้อบาง ๆ กั้นระหว่างช่องอกและช่องท้อง
11. ค่อย ๆ ดึงปอดแต่ละ lobe ออกมาและตัดทิ้งไปอย่างระวัง เนื่องจาก phrenic nerve จะอยู่จากกระบังลมพาดมาจนถึงต่อมไธมัส
12. ตัดหัวใจออกไปอย่างระวัง ซึ่งจะเห็น phrenic nerve ชัดเจนขึ้น

ขาหลังซ้าย

ขาหลังขวา

ขาหน้าซ้าย

ขาหน้าขวา



— แสดงแนวการตัดตามลำดับ
 ภาพแสดงแนวการผ่าตัดเปิดช่องอก

13. ตัดกล้ามเนื้อบริเวณช่องท้องด้านหลังกระบังลมทั้งด้านซ้ายและขวาออกไป โดยตัดเลาะให้ชิดไปตามแนวกระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายมากที่สุด
14. ขณะนี้จะเห็นกระบังลมซึ่งมี phrenic nerve ติดอยู่และพาดไปจนถึงต่อมไทมัส ตัดให้ชิดขั้วต่อมไทมัสให้มากที่สุด ซึ่ง phrenic nerve จะติดอยู่ด้วย
15. ตัดเส้นเลือดที่พาดผ่านกระบังลมทั้งด้านนอกและท้องออกไป โดยตัดให้ชิดกระบังลมซึ่งต้องระวังไม่ให้ตัดโดน phrenic nerve และไม่ทำให้กระบังลมขาดหรือเสียหาย
16. ตัดแยกกระบังลมซึ่งมี phrenic nerve ติดอยู่รวมถึงต่อมไทมัสออกจากกายหนู โดยตัดให้ชิดพื้นที่ท้องมากที่สุด
17. รับประทานเนื้อเยื่อที่ตัดได้ใส่ลงในถาดขี้ผึ้งสำหรับรองผ่าตัดซึ่งมี Oxygenated Krebs solution ที่มีอุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส ใส่เตรียมไว้
18. ใช้หมุดปักที่ซี่โครงเพื่อแสดงกระบังลมด้านซ้ายและขวาได้อย่างชัดเจน ทำการตัดเนื้อเยื่อที่ไม่เกี่ยวข้องกับช่องอกไปได้แก่ ต่อมไทมัส ไขมันที่อาจเกาะอยู่บนเส้นประสาท และกล้ามเนื้ออื่น ๆ ที่ติดมาด้วย
19. ตัดแยก phrenic nerve-diaphragm ซึ่งมี phrenic nerve อยู่ ทั้งด้านซ้ายและขวาออกจากกัน ซึ่งจะได้เนื้อเยื่อ 2 ชิ้น
20. ใช้เข็มร้อยตรงซี่โครงทั้งด้านบนและด้านล่างของกระบังลม ผูกมัดใหม่กับซี่โครงให้แน่นโดยปล่อยปลายเชือกด้านบนให้ยาวไว้สำหรับผูกกับตะขอที่ต่อกับ transducer และปล่อยเชือกด้านล่างไว้สำหรับผูกกับ organ bath
21. รับประทานเนื้อเยื่อไปใส่ไว้ในแต่ละ organ bath (เนื้อเยื่อ 1 ชิ้น ต่อ 1 organ bath) ที่บรรจุ Oxygenated Krebs solution อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เตรียมไว้
22. ผูกปลายล่างของกล้ามเนื้อกระบังลมยึดติดกับกัน organ bath และผูกปลายบนกับตะขอที่ต่อกับ transducer และใช้ suction electrode ดูด phrenic nerve ไว้ ซึ่งเมื่อทำการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าจะกระตุ้นผ่านทาง phrenic nerve โดยไม่เกิดการกระตุ้นที่กล้ามเนื้อโดยตรง

23. แห้งกล้ามเนื้อไว้ใน Oxygenated Krebs solution อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ tension 0.8 g เปลี่ยนถ่าย Oxygenated Krebs solution ใหม่ใน organ bath และพักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibrium) 30 นาที
24. เปิดเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (stimulator) ซึ่งเชื่อมต่อกับ suction electrode ทดลองปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านทาง phrenic nerve เพื่อกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว ด้วยความถี่ (frequency) 0.1 Hz และ ระยะเวลาในการกระตุ้น (duration) 0.2 ms โดยเริ่มต้นให้กระแสไฟฟ้าดังแต่ 0.5 V ไปจนกระทั่งกล้ามเนื้อเกิดการหดตัว
25. เมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้าผ่านทาง phrenic nerve แล้วกล้ามเนื้อกระบังลมเกิดการหดตัว แสดงว่า phrenic nerve – hemi-diaphragm ที่เตรียมนั้นยังมีชีวิตสามารถใช้ทำการทดลองต่อไปได้ แต่หากกล้ามเนื้อกระบังลมไม่เกิดการหดตัว แสดงว่า phrenic nerve – hemi-diaphragm ที่เตรียมนั้นไม่สามารถใช้ทำการทดลองต่อไปได้

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 5 ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (control)

แสดงเป็นค่า Twitch tension (%)

Time (min)	n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
10	105.0	105.1	98.4	101.1	99.3	101.8	3.2	1.4
20	103.6	101.6	96.6	99.9	98.8	100.1	2.7	1.2
30	100.4	98.7	95.6	100.5	97.7	98.6	2.0	0.9
40	97.1	100.2	95.3	99.6	97.4	97.9	2.0	0.9
50	96.6	99.0	95.6	97.8	97.4	97.3	1.3	0.6
60	97.6	97.6	95.5	97.0	95.8	96.7	1.0	0.4

ตารางที่ 6 เวลา (min.) ที่ใช้ในการทำให้เกิด 50% inhibition ของพินงูจงอาง

Concentration of venom ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	5	10	20	40	80	160
n1	20.52	19.63	9.02	7.53	4.25	3.80
n2	22.40	21.10	9.35	6.74	4.08	4.43
n3	23.46	19.34	9.96	6.25	3.99	3.86
n4	25.88	20.08	9.72	7.75	4.56	4.10
n5	24.80	18.20	7.58	5.99	4.11	4.00
Average	23.41	19.67	9.13	6.85	4.20	4.04
SD	2.09	1.06	0.94	0.77	0.22	0.25
SE	0.93	0.47	0.42	0.34	0.10	9.72

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1 – F7

Sample	Time taken to cause 50% Inhibition (min)	Twitch tension at the 50 th min. (%)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
n1	4.99	86.0	69.1	64.4	80.8	89.4	84.8
n2	4.19	78.5	64.1	61.1	92.2	86.6	80.1
n3	4.04	78.9	74.2	56.1	96.6	86.5	77.0
n4	5.16	89.3	72.4	79.1	94.6	85.9	82.6
n5	4.43	84.1	73.9	76.8	86.1	73.2	92.9
Average	4.56	83.36	70.74	67.50	90.06	84.32	83.48
SD	0.49	4.65	4.23	10.02	6.51	6.36	6.01
SE	0.22	2.08	1.89	4.48	2.91	2.85	2.69

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1.1 – F1.3

Sample	Time taken to cause 50% Inhibition (min)		Twitch tension at the 50th min. (%)
	F1.1	F1.2	F1.3
n1	48.41	5.02	68.6
n2	47.81	4.00	79.2
n3	37.47	3.66	69.7
n4	45.08	3.91	74.7
n5	34.35	4.97	60.5
Average	42.62	4.31	70.54
SD	6.35	0.64	7.03
SE	2.84	0.28	3.14

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.1 – F1.2.4

Sample	Time taken to cause 50% Inhibition (min)			
	F1.2.1	F1.2.2	F1.2.3	F1.2.4
n1	28.37	6.42	12.03	8.58
n2	25.92	6.87	12.97	8.76
n3	28.14	7.03	12.10	9.09
n4	34.49	7.84	12.95	9.81
n5	36.33	8.75	13.89	11.19
Average	30.65	7.38	12.79	9.49
SD	4.50	0.92	0.76	1.06
SE	2.01	0.41	0.34	0.48

ตารางที่ 10 Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า (Control)

Concentration of Acetylcholine (M)	Twitch tension (g)							
	Before				After			
	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
n1	0.0578	0.4690	0.6300	0.6972	0.0141	0.1626	0.5893	0.7831
n2	0.1174	0.3193	0.5212	0.8420	0.1080	0.1221	0.4210	0.7982
n3	0.0445	0.1192	0.3068	0.5213	0.0540	0.1208	0.2321	0.6358
n4	0.0332	0.1161	0.2382	0.2609	0.0226	0.0859	0.1387	0.2428
n5	0.0158	0.0506	0.1059	0.2546	0.0158	0.0158	0.0933	0.3336
Average	0.0537	0.2148	0.3604	0.5152	0.0429	0.1014	0.2949	0.5587
SD	0.0388	0.1742	0.2127	0.2610	0.0398	0.0550	0.2071	0.2570
SE	0.0173	0.0779	0.0951	0.1167	0.0178	0.0246	0.0926	0.1149
Baseline	0.0125							

ตารางที่ 11 Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine

ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก

F1.2.2

Concentration of Acetylcholine (M)		F1.2.2							
		n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Before	10^{-6}	0.0320	0.0120	0.0169	0.0111	0.0220	0.0188	0.0086	0.0038
	10^{-5}	0.1278	0.0376	0.0368	0.0269	0.1696	0.0797	0.0648	0.0290
	10^{-4}	0.3052	0.1247	0.1380	0.2935	0.3110	0.2345	0.0945	0.0423
	10^{-3}	0.3979	0.2466	0.2898	0.2261	0.6015	0.3524	0.1543	0.0690
After	10^{-6}	0.0160	0.0135	0.0123	0.0142	0.0173	0.0147	0.0020	0.0009
	10^{-5}	0.0176	0.0226	0.0123	0.0127	0.0157	0.0162	0.0042	0.0019
	10^{-4}	0.0186	0.0120	0.0153	0.0288	0.0183	0.0186	0.0063	0.0028
	10^{-3}	0.0192	0.0120	0.0169	0.0111	0.0183	0.0155	0.0037	0.0017
Baseline		0.0122							

ตารางที่ 12 Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine

ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก

F1.2.3

Concentration of Acetylcholine (M)		F1.2.3							
		n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Before	10^{-6}	0.0153	0.0112	0.0144	0.0263	0.0182	0.0171	0.0057	0.0026
	10^{-5}	0.0430	0.0320	0.0352	0.1317	0.0561	0.0596	0.0414	0.0185
	10^{-4}	0.2669	0.1390	0.1071	0.2231	0.0758	0.1624	0.0802	0.0359
	10^{-3}	0.4693	0.3196	0.3883	0.0914	0.0712	0.2680	0.1786	0.0799
After	10^{-6}	0.0153	0.0128	0.0175	0.0170	0.0121	0.0150	0.0024	0.0011
	10^{-5}	0.0169	0.0144	0.0175	0.0201	0.0152	0.0168	0.0022	0.0010
	10^{-4}	0.0163	0.0144	0.0238	0.0248	0.0167	0.0192	0.0048	0.0021
	10^{-3}	0.0169	0.0128	0.0397	0.0129	0.0106	0.0186	0.0120	0.0054
Baseline		0.0128							

ตารางที่ 13 Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine

ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4

Concentration of Acetylcholine (M)		F1.2.4							
		n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Before	10^{-6}	0.0215	0.0174	0.0277	0.0291	0.0245	0.0240	0.0047	0.0021
	10^{-5}	0.2224	0.0585	0.0832	0.1033	0.1012	0.1137	0.0633	0.0283
	10^{-4}	0.2055	0.1708	0.1464	0.2551	0.1994	0.1954	0.0409	0.0183
	10^{-3}	0.3420	0.3336	0.3621	0.3988	0.5122	0.3898	0.0729	0.0326
After	10^{-6}	0.0123	0.0142	0.0108	0.0129	0.0153	0.0131	0.0018	0.0008
	10^{-5}	0.0184	0.0142	0.0216	0.0113	0.0169	0.0165	0.0039	0.0018
	10^{-4}	0.0138	0.0111	0.0145	0.0145	0.0205	0.0149	0.0034	0.0015
	10^{-3}	0.0189	0.0174	0.0123	0.0162	0.0158	0.0161	0.0025	0.0011
Baseline		0.0125							

ตารางที่ 14 เวลา (min.) ที่ใช้ในการทำให้เกิด 95% inhibition ของ Tubocurarine chloride

Tubocurarine chloride (μ M)	2.5	5	10	20
n1	6.82	3.06	2.93	2.89
n2	5.57	3.26	2.90	2.31
n3	4.75	3.98	2.17	2.16
Average	5.71	3.43	2.67	2.45
SD	1.04	0.48	0.43	0.39
SE	0.6	0.3	0.2	0.2

ตารางที่ 15 Twitch tension (%) ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ Tubocurarine chloride 20 μ M ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

Time (min)	n1	n2	n3	Average	SD	SE
0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.00	0.0
1	84.1	78.4	96.0	86.2	8.98	5.2
2	15.4	12.1	10.8	12.8	2.35	1.4
3	4.0	2.4	0.9	2.4	1.56	0.9
20	2.5	2.4	0.9	1.9	0.90	0.5
40	1.8	1.9	1.0	1.6	0.49	0.3
60	1.0	1.3	1.2	1.2	0.15	0.1
80	0.9	1.5	0.8	1.1	0.38	0.2
100	0.9	1.1	0.9	1.0	0.12	0.1
120	1.0	1.5	0.9	1.1	0.32	0.2

ตารางที่ 16 ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า แสดงเป็นค่า Twitch tension (%)

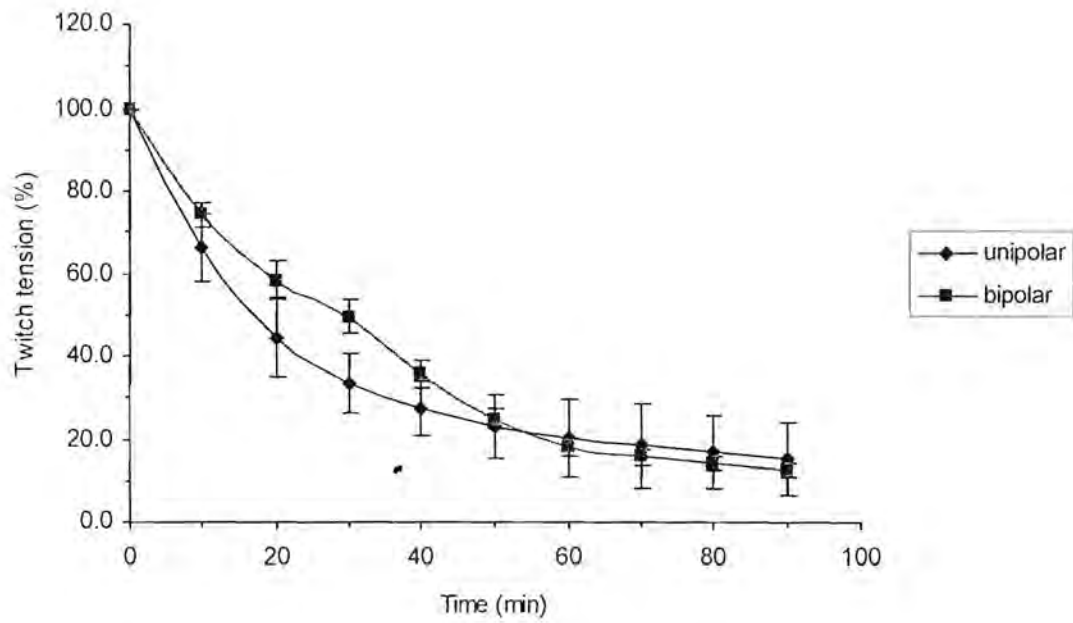
Time (min.)	n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
10	65.0	64.1	84.3	78.7	43.2	67.1	15.9	7.1
20	54.7	53.5	73.7	66.5	32.9	56.3	15.6	7.0
30	49.2	47.8	62.1	57.0	25.0	48.2	14.2	6.4
40	47.8	44.9	57.6	51.9	23.7	45.2	12.9	5.8
50	45.3	43.4	57.8	47.0	23.3	43.4	12.5	5.6
60	43.7	42.2	52.7	45.6	22.6	41.4	11.2	5.0
70	43.4	40.7	50.3	43.3	21.4	39.8	10.9	4.9
80	42.5	39.9	49.4	43.4	19.3	38.9	11.5	5.1
90	40.0	38.5	46.0	41.1	16.2	36.4	11.6	5.2

ตารางที่ 17 ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้

Unipolar electrode และ Bipolar electrode หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride

แสดงเป็นค่า Twitch tension (%)

Electrode	Time(min.)	n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Unipolar	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	10	73.2	79.7	65.9	65.7	46.9	66.3	12.3	5.5
	20	49.0	56.4	39.7	46.0	31.6	44.5	9.4	4.2
	30	38.4	37.6	28.3	35.0	27.2	33.3	5.2	2.3
	40	31.5	27.1	23.0	31.0	24.1	27.3	3.9	1.8
	50	25.7	19.6	19.3	28.6	22.2	23.1	4.0	1.8
	60	21.6	16.5	16.7	26.5	19.6	20.2	4.1	1.9
	70	19.0	14.6	15.2	25.1	18.2	18.4	4.2	1.9
	80	16.3	14.7	14.5	22.9	16.8	17.1	3.4	1.5
	90	14.5	13.0	13.5	20.4	14.9	15.2	3.0	1.3
Bipolar	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	10	65.0	75.3	72.5	76.2	83.0	74.4	6.5	2.9
	20	40.5	64.3	61.2	57.9	67.5	58.3	10.6	4.7
	30	36.3	52.5	58.4	43.7	57.0	49.6	9.4	4.2
	40	31.1	36.2	44.7	26.5	40.8	35.9	7.3	3.3
	50	29.1	27.4	20.3	17.9	29.4	24.8	5.3	2.4
	60	24.2	16.8	13.0	14.2	21.7	18.0	4.8	2.2
	70	22.7	13.7	12.3	12.4	17.7	15.8	4.5	2.0
	80	19.6	12.0	10.9	11.6	16.2	14.1	3.7	1.7
	90	17.2	10.5	10.3	9.7	16.0	12.7	3.6	1.6



ภาพที่ 34 การเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

โดยใช้ Unipolar electrode และ Bipolar electrode

แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

ตารางที่ 18 Twitch tension (%) ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้าโดยตรง และกลุ่ม control

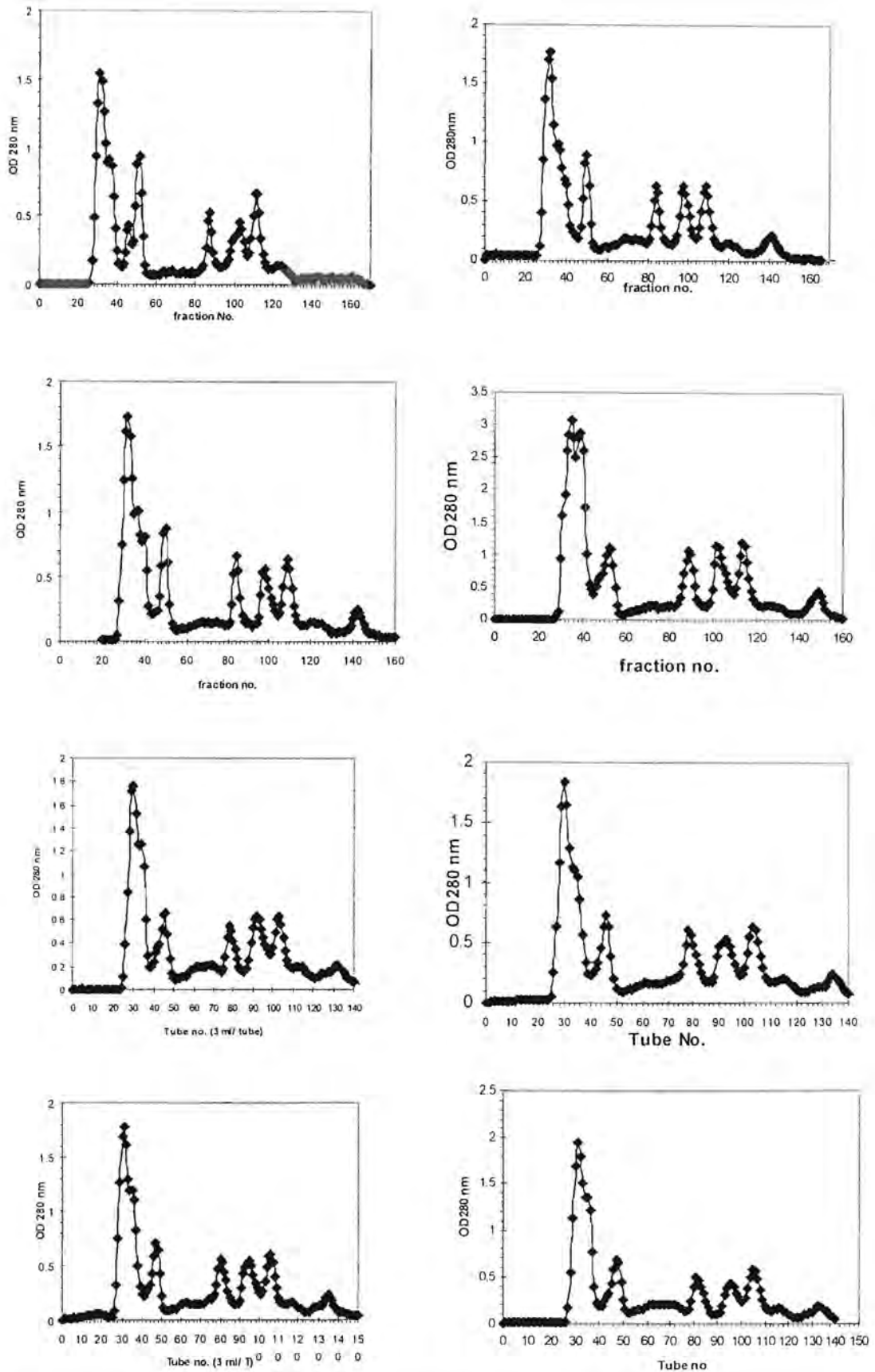
Group	Time(min.)	n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Control	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	5	84.0	87.2	77.5	82.7	71.2	80.5	6.3	2.8
	15	56.2	61.7	46.7	58.0	47.9	54.1	6.5	2.9
	25	44.0	41.2	33.4	44.1	41.3	40.8	4.4	2.0
fr1.2.2	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	5	87.2	75.0	82.1	94.7	73.4	82.5	8.8	3.9
	15	62.2	46.2	58.2	63.8	48.3	55.7	8.0	3.6
	25	50.9	32.0	45.3	45.3	39.7	42.6	7.2	3.2
fr1.2.3	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	5	79.3	77.8	51.7	77.0	75.4	72.2	11.6	5.2
	15	64.6	53.4	41.6	53.5	57.4	54.1	8.3	3.7
	25	56.6	40.3	38.9	42.1	49.2	45.4	7.4	3.3
fr1.2.4	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	5	86.7	74.6	82.5	86.5	77.7	81.6	5.4	2.4
	15	67.5	51.3	65.4	56.3	64.8	61.0	6.9	3.1
	25	54.5	36.9	53.2	39.0	55.5	47.8	9.1	4.1

ตารางที่ 19 ปริมาณโปรตีนของพียงูที่แยกส่วนในแต่ละขั้นตอน

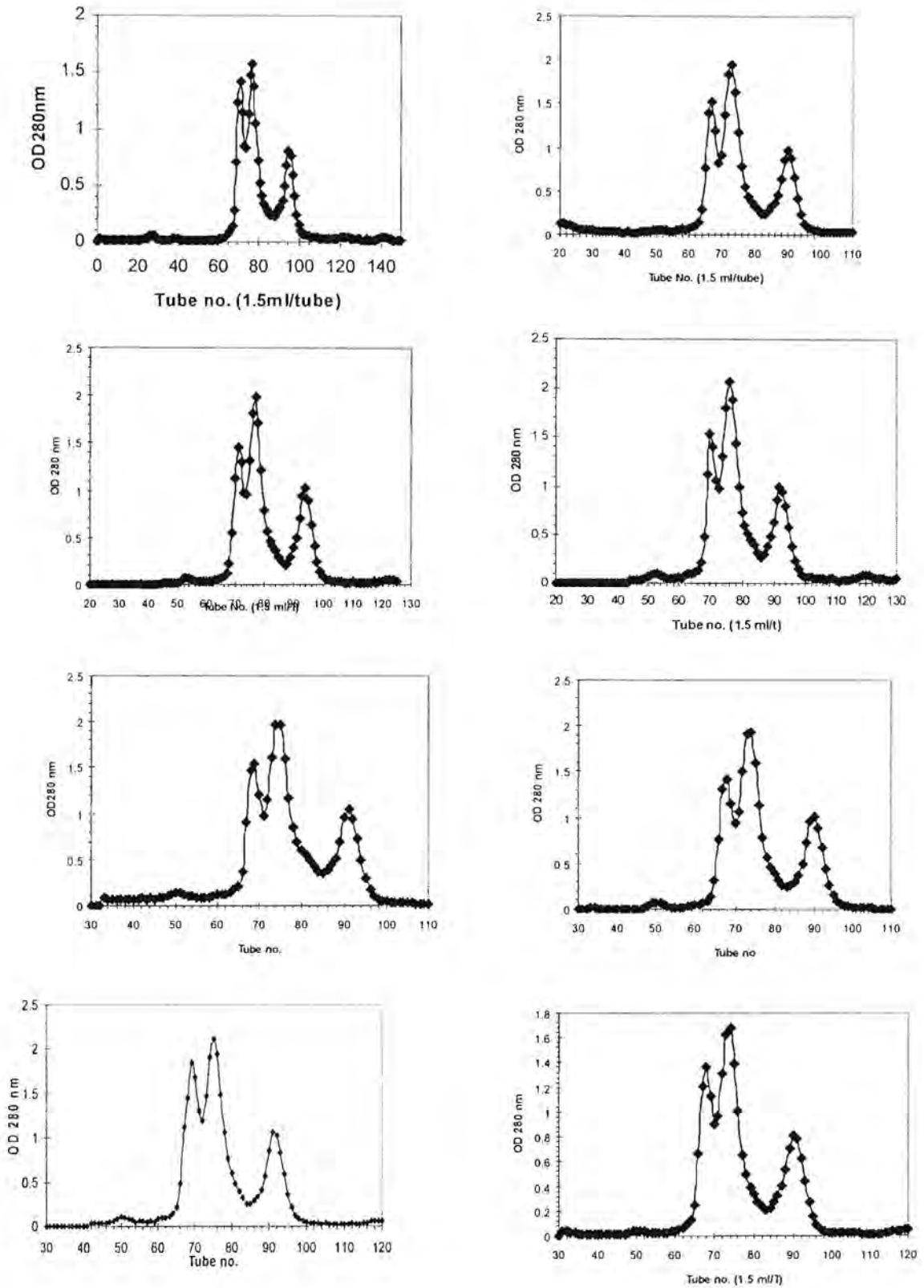
No.	Q-sepharose column (mg)	Cellulofine column (mg)	SP-Sepharose column (mg)			
			F 1.2.1	F 1.2.2	F 1.2.3	F 1.2.4
	F1	F1.2				
1	38.08 *					
2	33.63	16.07 **				
3	39.50	14.28	1.41	3.11	1.71	3.10
4	35.67	13.36	0.64	2.83	0.90	2.39
5	36.56	15.44	0.76	3.47	1.19	2.60
6	37.70	15.50	0.80	3.10	1.30	2.60
7	38.11	15.80	0.75	3.10	1.30	2.20
8	38.09	14.40	0.70	2.65	1.01	2.00
9	35.10	13.00	1.15	2.54	1.10	1.69
10	40.40	15.60	1.45	3.63	1.49	2.57
11	38.60	14.20	0.82	3.10	1.30	2.20
12	41.70	19.70	1.66	3.56	1.40	2.15
13	39.80	19.30	0.97	3.58	1.48	2.47
14	47.50	25.70	1.69	4.91	2.15	3.11
15	45.88	22.80	1.27	3.84	1.45	2.57
รวม	586.32	235.15	14.07	43.42	17.78	31.65
เฉลี่ย	39.1	16.8	1.08	3.34	1.37	2.43
ร้อยละ	39.1	15.7	0.9	2.9	1.2	2.11

*แยกพียงูด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose และใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

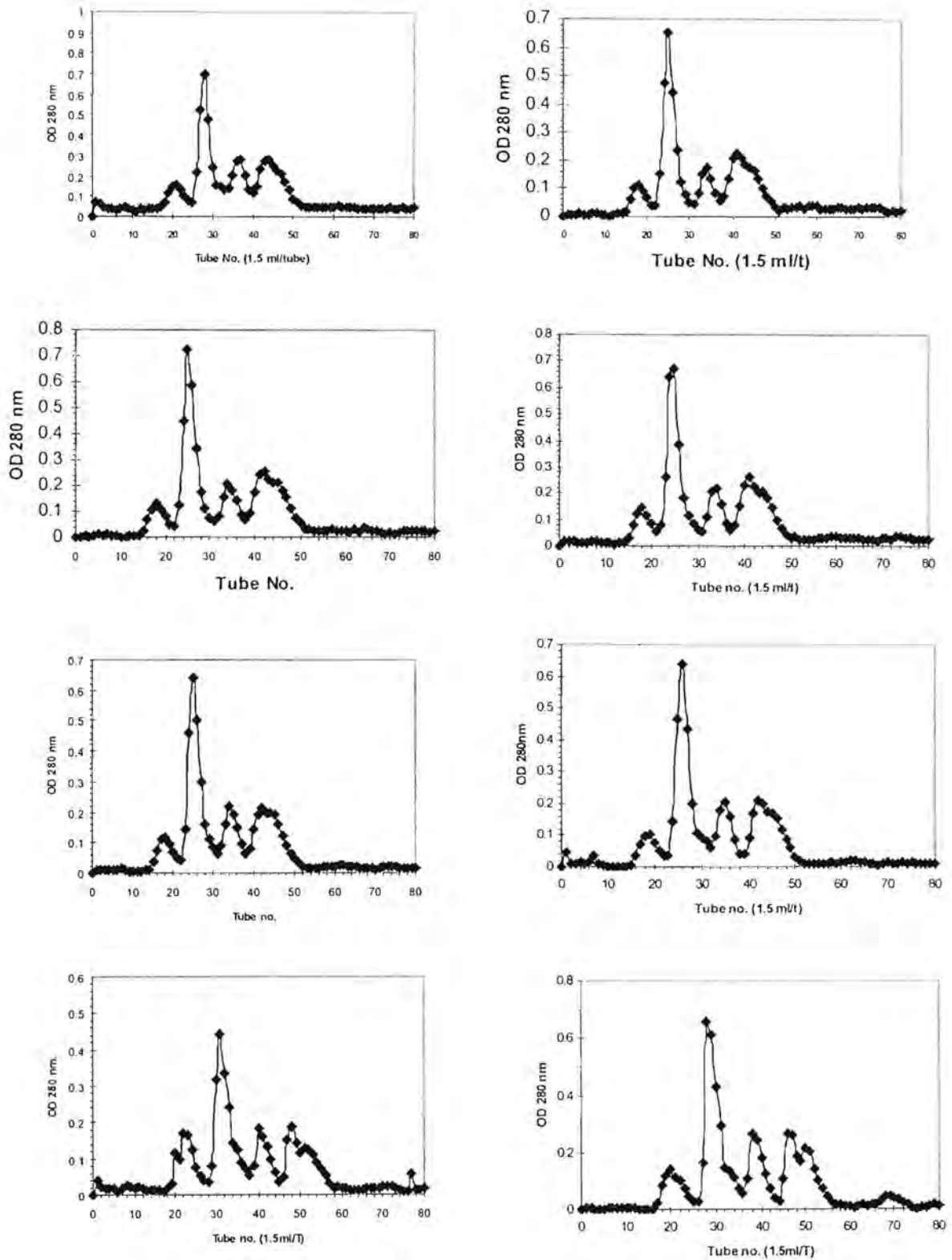
**แยกพียงูด้วยคอลัมน์ Cellulofine GCL-1000 sf และใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ



ภาพที่ 35 แสดงตัวอย่าง chromatogram ของการแยกตัวพิษงูจากด้วย Q-Sepharose column



ภาพที่ 36 แสดงตัวอย่าง chromatogram ของการแยกส่วน F1 ด้วย Cellulofine GCL-1000 sf column

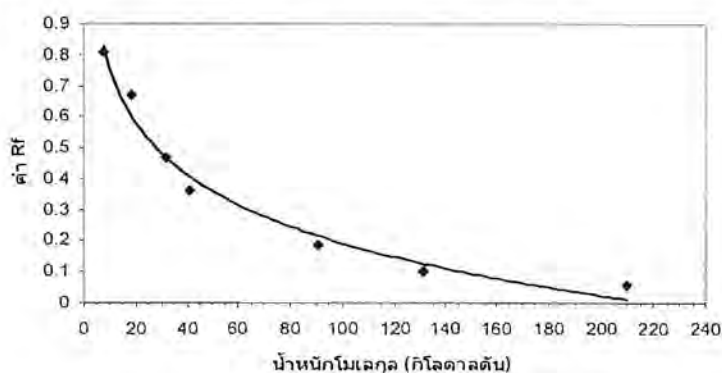


ภาพที่ 37 แสดงตัวอย่าง chromatogram ของการแยกส่วน F1.2 ด้วย SP- Sepharose column

ตารางที่ 20 การเตรียม 12.5% gel electrophoresis (30)

	Separating gel (ml)	Stacking gel (ml)
Acrylamide stock solution	4.17	0.5
1.875 M Tris-HCl pH 8.8	2.5	-
1.875 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.33
10% SDS	0.125	0.05
TEMED	0.005	0.003
Distill water	3.133	3.857
10% ammonium persulfate	0.067	0.050

*Acrylamide stock solution : 30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide



โปรตีนมาตรฐาน	น้ำหนักโมเลกุล	Rf	น้ำหนักโมเลกุล จากกราฟ
myosin	210	0.06	
beta-galactosidase	131	0.1	
bovine serum albumin	91	0.186	
carbonic anhydrase	41.3	0.36	
soybean trypsin inhibitor	31.8	0.47	
lysozyme	18.1	0.67	
aprotinin	7.1	0.81	
F 1.2.2		0.76	8.4
F 1.2.3		0.74	9.0
F 1.2.4		0.78	7.8

ภาพที่ 38 กราฟโปรตีนมาตรฐานและการหาน้ำหนักโมเลกุลของพืษงูกิ่งบริสุทธ์

ภาคผนวก ง
ผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร 4455, 4493 ต่อ 14

ที่ จจ. 3/2549

วันที่ 7 กรกฎาคม พ.ศ. 2549

เรื่อง แจ้งผลพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

เรียน นางสาวจรีพร น้อยพรหม

จากการประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ครั้งที่ 14/2549 ในวันอังคารที่ 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2549 ได้พิจารณาโครงการวิทยานิพนธ์ ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

เรื่อง คุณธีรพงษ์ของพิชญะจงอาจต่อกล่อมเนื้อร่วมประสาท"

หัวหน้าโครงการวิจัย นางสาวจรีพร น้อยพรหม

คณะกรรมการมีมติให้ผ่านจริยธรรมการวิจัยได้

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินนเศ)

รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ปฏิบัติราชการแทนคณบดี คณะแพทยศาสตร์

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว อรวรรณ แซ่โค้ง
(ภาษาอังกฤษ) Miss Orawan Khow
2. เลขที่บัตรประชาชน 3101300185884
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้อำนวยการพิเศษ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 7
4. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) 1871 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10330
โทรศัพท์ 022520161-4 ต่อ 182 โทรสาร 022540212
E-mail Address okhow_2000@yahoo.com โทรศัพท์มือถือ 0899654243
5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรีสาขา	ชีววิทยา สถาบัน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
ปีที่สำเร็จ	2533 คณะเนนเฉลี่ยสะสม
ปริญญาโทสาขา	เคมีชีวภาพ สถาบัน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
ปีที่สำเร็จ	2537 คณะเนนเฉลี่ยสะสม
หัวข้อวิทยานิพนธ์	Characterization and properties of Endo-1-4-b-glucanases from <i>Clostridium josui</i>
6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ อิมมูโนวิทยา, ชีวเคมี
7. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค. ศ. 2005 ถึงปัจจุบัน
 - 1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ
 1. Pommanee P, Sanchez EE, Lopez G, Petsom A. Khow O, Pakmanee N, Chanhom L, Sangvanich P, Perez JC. (2008) Neutralization of lethality and proteolytic activities of Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom with North American Virginia popssum (*Didelphis virginiana*) serum. *Toxicon* 52 : 186-189.
 2. Pommanee P, Perez JC, Sanchez EE, Khow O , Pakmanee N, Chulasugandha P, Chanhom L, Petsom A. (2008) pH gradient electrophoresis and biological activity analysis of proteins from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *ScienceAsia* 34: 279-277.
 3. Suwansrinon K, Khow O, mitmoonpitak C, Daviratanasilpa S, Chaiyabutr N, Sitprijia V. (2007) Effects of Russell's viper venom fractions on systemic and renal hemodynamics. *Toxicon* 49: 82-88.

4. Yanoshita R, Ogawa Y, Murayama N, Omori-Satoh T, Saguchi K, Higuchi S, **Khoo** O, Chanhome L, samejima Y, Sitprija V. (2006) Molecular cloning of the major lethal toxins from two kraits (*Bungarus flaviceps* and *Bungarus candidus*). *Toxicon* 47: 416-424.

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวจूरีพร น้อยพรหม
(ภาษาอังกฤษ) Miss Jureeporn Noiphrom
2. เลขที่บัตรประชาชน 3101600400276
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
4. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330
โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 161 โทรสาร 02-2540212
E-mail Address tu-juree-n@hotmail.com โทรศัพท์มือถือ 086-4074705
5. ประวัติการศึกษา
- 5.1 ปริญญาตรีสาขา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)
สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ปีที่สำเร็จ 2540
- 5.2 ปริญญาโทสาขา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา)
สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่สำเร็จ 2550
- หัวข้อวิทยานิพนธ์ Neuromuscular Effect of King Cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom
6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ Biology, Pharmacology, Immunology

7. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 ถึงปัจจุบัน

1. Rojnuckarin P, Banjongkit S, Chantawibun W, Akkawat B, Juntiang J, Noiphrom J, Pakmanee N, Intragumtomchai T. Green pit viper (*Trimeresurus albolabris* and *T. macrops*) venom antigenaemia and kinetics in humans. Trop Doct. 2007 Oct;37(4):207-10.

2. Rojnuckarin P, Chanthawibun W, **Noiphrom J**, Pakmanee N, Intragumtomchai T. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antivenom for local effects of green pit viper bites. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006 Sep; 100(9):879-84. Epub 2006 Feb 8.

3. Chiobamroongkiat M, Pakmanee N, **Noiphrom J**, Jaijaremsub W, Sutthisri R. King cobra venom antibody in serum of king cobra handlers in Koksnga village. Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin, 2003 Apr; 2(1): 9-19.

4. Nuchprayoon I, Sai-Ngam A, Suntrarachun S, **Noiphrom J**, Pakmanee N, Chanhom L, Nuchprayoon S, Sitprija V. Molecular cloning of phospholipase A2 from a Thai Russell's viper venom gland cDNA library. J Med Assoc Thai. 2001 Jun; 84 Suppl 1:S99-105.

8. ผลงานวิจัยอื่น ๆ (เช่น proceeding หนังสือนิตยสาร ฯลฯ)

1. Suntrarachun, S. Tirawatnapong, T., Pakmanee, N., **Noiphrom, J.**, Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 425950.

2. Suntrarachun, S. Tirawatnapong, T., Pakmanee, N., **Noiphrom, J.**, Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 425949.
3. Suntrarachun, S. Tirawatnapong, T., Pakmanee, N., **Noiphrom, J.**, Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 425948.
4. Tirawatnapong, T., Suntrarachun, S., Pakmanee, N., **Noiphrom, J.**, Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 388996.
5. Pakmanee N, Aung W, Khaw O, **Noiphrom J**, Sitprija V. Neutralization of lethal and enzyme activities of *Daboia russelli siamensis* from Thailand and Myanmar by Thai and Myanmar Russell's viper antivenom. 13th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. Paris. 2000; Abstr. No. 223.

โครงการที่ 3

การวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอาง
ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกล้ามเนื้อ

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

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

รายงานการวิจัยเรื่อง องค์ประกอบ โปรตีนและฤทธิ์ทางชีวภาพของพิษงูจงอาง *Ophiophagus hannah* เป็นโครงการที่จัดทำขึ้น โดยได้รับการสนับสนุนจากหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ สถาบันเสวภา สภาเกษตรกรไทย เพื่อนำข้อมูลไปใช้ประกอบ แผนงานวิจัย การพัฒนาจากพิษงูจงอาง: การศึกษาระยะก่อนคลินิก

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2549 ของแผนงานวิจัยการพัฒนาจากพิษงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพิษงูจงอางที่มีอายุและถิ่นกำเนิดที่ต่างกัน การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้เปรียบเทียบด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าพิษงู KV2 มีค่าความเป็นพิษสูงกว่า พิษงู KV6 และ KV9 การเปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนในพิษงูจงอางทั้ง 3 ตัวอย่าง ใช้อิเล็กโตรโฟรีซิสทีสทางเดียว, อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองทิศทางและโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส พบว่า องค์ประกอบโปรตีนของพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกัน แต่พิษงู KV2 มีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่นอย่างเห็นได้ชัดโดยศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพเสีย พบว่า KV2 มีแถบโปรตีนที่เข้มกว่า เช่นเดียวกับวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองทิศทาง พบว่า KV2 มีจุดโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล ต่ำกว่า 14.4 กิโลดาลตัน มากกว่า KV6 และ KV9 และมีบางจุดโปรตีนที่ไม่พบในอีก 2 ตัวอย่าง คือ จุดโปรตีนที่ 2 และ 4 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคเปปไทด์แมสแมพพบว่า เป็นโปรตีนในกลุ่มฟอสโฟไลเปส ส่วนในการศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส พบว่า ลำดับส่วนที่แยกได้จากพิษงู KV2 ใน อะซิโทไนไตรท์ความเข้มข้นระหว่าง 31-50% มีความเข้มข้นโปรตีนสูงกว่าลำดับส่วนในช่วงเดียวกันของพิษงู KV6 และ KV9 จากผลทั้งหมดได้แสดงความแตกต่างทางด้านองค์ประกอบโปรตีนในพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสาเหตุความแตกต่างของความเป็นพิษของพิษงูแต่ละตัวอย่าง จากการแยกโปรตีนพิษงู KV2 ด้วยเทคนิค ไอออนเอ็กซ์เชนจ์และเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี ได้ ลำดับส่วน 4 ลำดับส่วน คือ 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3 และ 1.2.4 จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า ลำดับส่วน 1.2.2 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ โปรตีนนาทริน (Natriin) จากพิษงูเห่า และ ลำดับส่วน 1.2.3 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ โปรตีน โอฟานิน (ophanin) จาก พิษงูจงอาง และนาทริน จากพิษงูเห่า

Abstract

In this research involves comparison of protein composition and biological activities of different age and region of originate of three *Ophiophagus hannah* venoms. Biological activity was measured *via* cytotoxicity in cell line. KV2, crude venom showed higher toxicity than KV6 and KV9 venoms. Comparison of protein compositions of *O.hannah* venoms were performed using 1-D gel electrophoresis, 2D-gel electrophoresis and reverse-phase HPLC. Although protein compositions in all samples were similar, KV2 venom is very different from each other venom. The protein bands of KV2 in SDS-PAGE showed higher amount of all bands. 2DE gel of KV2 has many low molecular weight (14 kDa) spots. Spot No.2 and spot No.4 of KV2 are individual which are not found in KV6 and KV9. From peptides mass mapping by MALDI-TOF MS and amino acid sequence database searching, the amino acid sequence of protein spot 2 and spot 4 are similar to partial amino acid residue of phospholipase group from *O.hannah* venom. The RP-HPLC pattern of KV2 is different from other venoms. The eluted in range 31-50% ACN have high protein concentration than other venoms in same range. All of results indicated that variable protein composition were cause of difference in toxicity. The amino acid sequence of fraction 1.2.2 and 1.2.3, which were separated by ion exchange chromatography and gel filtration chromatography, were similar to partial amino acid residue of natrin and ophanin from *Naja atra* and *O.hannah* venom respectively.

KEY WORD: *Elapidae* / VENOM / *Ophiophagus hannah* / MALDI-TOF MS

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	IX
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ทฤษฎีและงานวิจัยที่ผ่านมา	2
ส่วนประกอบของพินิจ	2
งูจงอาง	2
การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์	3
เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส	3
เทคนิคทางอิเล็กโตรโฟรีซิส	4
วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพเสีย	4
วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองทิศทาง	4
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีน	4
งานวิจัยที่ผ่านมา	5
วิธีดำเนินการวิจัย	8
พินิจงูจงอาง	8
สารเคมี	8
วัสดุอุปกรณ์	9
วิธีการวิจัย	10
การวิเคราะห์โปรตีนในพินิจด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจล	
อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพเสีย	10

การวิเคราะห์โปรตีนในพืชด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอเรซิส	
แบบสองทิศทาง	10
การวิเคราะห์โปรตีนในพืชด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	
แบบรีเวอร์สเฟส	10
In-gel digestion	11
วิเคราะห์โปรตีนด้วย MALDI-TOF MS	11
วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยESI-Q-TOF mass spectrometer	11
ผลการวิจัยและอภิปราย	12
การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบโปรตีนในพืชงอแง	12
การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชงอแง	14
การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอเรซิส	
แบบสภาพเสีย	14
การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสองทิศทาง	15
การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	
แบบรีเวอร์สเฟส (RP- HPLC)	24
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของส่วนแยกที่ได้จากโครงการที่ 2	26
สรุปผลและแนะนำการวิจัย	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	33
ภาคผนวก ก	34
ภาคผนวก ข	37
ภาคผนวก ค	41
ภาคผนวก ง	44
ประวัติผู้วิจัย	45

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 โปर्टินที่พบในพิษงูจงอาง	6
2 องค์ประกอบเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพิษงูจงอาง	14
3 การพิสูจน์เอกลักษณ์โปर्टินในพิษงูจงอางตัวอย่าง KV2	18
4 การพิสูจน์เอกลักษณ์โปर्टินในพิษงูจงอางตัวอย่าง KV6	19
5 การพิสูจน์เอกลักษณ์โปर्टินในพิษงูจงอางตัวอย่าง KV9	20
6 เปอร์เซ็นต์ ACN ที่ใช้ชะและความเข้มข้นของโปर्टินในแต่ละส่วนแยก	24

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า	
1	แผนผังขั้นตอนการเปรียบเทียบพิษงู 3 ตัวอย่าง	12
2	แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนส่วนแยกของพิษงู KV2	13
3	SDS-PAGE ของพิษงูจงอางทั้ง 3 ตัวอย่าง	15
4	2-DE gel ของพิษงูจงอาง 3 ตัวอย่าง	17
5	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจุดโปรตีนที่ 1 ของ KV2, KV6 และ KV9 กับโปรตีนโอฟานิน	21
6	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจุดโปรตีนที่ 7 ของ KV2, จุดที่ 10 ของ KV6 และ จุด ที่ 15 ของ KV9 กับโปรตีน Chain A, Structure of An Acidic Phospholipase A ₂	22
7	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจุดโปรตีนที่ 2 ของ KV2 กับโปรตีน phospholipase A ₂	23
8	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจุดโปรตีนที่ 4 ของ KV2 กับ phospholipase A ₂ , acidic 1 precursor	23
9	โครมาโตแกรมของพิษงูจงอาง 3 ตัวอย่างจากการวิเคราะห์ด้วย RP-HPLC	25
10	SDS-PAGE ของส่วนแยกที่ได้จากโครงการที่ 2	26
1 ค	โครมาโตแกรมของการแยกพิษงู KV2 ด้วยเทคนิค Ion exchange chromatogram	41
2 ค	โครมาโตแกรมของการแยกส่วนแยก 1 ด้วยเทคนิค Gel filtration	42
3 ค	โครมาโตแกรมของการแยกส่วนแยก 1.2 ด้วยเทคนิค Ion exchange chromatogram	43
1 ง	2-DE gel ของพิษงูจงอาง 3 ตัวอย่างที่ใช้แผ่น IPG strip ที่มี pH 3-10	44

รายการคำย่อ

ACN	Acetonitrile
Bis	<i>N,N'</i> -methylenebisacrylamide
BSA	Bovine serum albumin
CCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
IAA	Iodoacetamide
IEF	Isoelectric focusing
kDA	Kilodalton
mA	Milliampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time of flight
mM	millimolar
MS	Mass spectrometry
M.w.	Molecular weight
<i>m/z</i>	Mass per charge
nm	Nanometer
PMF	Peptide mass fingerprint
rpm	Revolution per minute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
T	Total acrylamide concentration (%)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylenebisacrylamide
TOF	Time of flight
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminoethane

บทนำ

ปัญหาการถูกงูพิษกัดเป็นปัญหาที่สำคัญในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อีกทั้งยังเป็นประเทศเกษตรกรรมและป่าไม้ ซึ่งเหมาะสมเป็นที่อยู่อาศัยของงู จากรายงานที่ผ่านมาพบว่ามีผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดประมาณ 3.3, 6.0 และ 0.9 ต่อ 100,000 คน ในประเทศพม่า ศรีลังกาและประเทศไทยตามลำดับ^[1] งูจงอาง (King Cobras) เป็นงูพิษในกลุ่ม Family *Elapidae* จัดเป็นงูพิษที่ยาวที่สุดในโลก มีพิษทางระบบประสาท (Neurotoxins) ที่รุนแรงมาก เนื่องจากพิษมีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถถูกดูดซึมได้รวดเร็วไปตามกระแสเลือด ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาตก พุคไม่ชัดเจนหายใจไม่สะดวก อีกทั้งยังมีขนาดตัวใหญ่ ค่อมพิษใหญ่ปริมาณพิษย่อมมากตามไปด้วย จึงสนใจเลือกพิษงูจงอางมาศึกษาเพื่อให้เป็นข้อมูลต่อไปสำหรับผู้ที่จะศึกษาและใช้ในการพัฒนาทางวิชาการในสาขาที่เกี่ยวข้องอีกทางหนึ่ง

จากรายงานความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพของพิษงูจงอางที่มีถิ่นกำเนิดต่างๆจากโครงการที่ 1 จึงสนใจศึกษาความเป็นพิษและอันตรายของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบจากพิษงูจงอาง ถึงแม้ว่าจะสามารถผลิตเซรุ่มป้องกันพิษได้ แต่ก็ยังคงมีความจำเพาะต่อชนิดและสภาพแวดล้อมของงูด้วย จึงได้เล็งเห็นความสำคัญในการศึกษาองค์ประกอบของพิษงูจงอางเพื่อทราบถึงชนิดและจำนวนองค์ประกอบทางเคมี และนำไปเปรียบเทียบข้อมูลกับพิษงูจงอางที่มีถิ่นกำเนิดต่างกันว่ามีองค์ประกอบใกล้เคียงกันอย่างไรเพื่อเป็นแนวทางในการวิเคราะห์ผลของพิษงูและการรักษา รวมทั้งเมื่อทราบกลไกการทำงานของพิษงูยังใช้ช่วยในทางการแพทย์อีกด้วย

วัตถุประสงค์

เปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบ โปรตีนของพิษงูจงอางที่มีถิ่นกำเนิดในแต่ละภาคส่วนของประเทศไทย

ทฤษฎีและแนวทางในการวิจัย

ส่วนประกอบของพิษงู^[2,3]

พิษงูประกอบด้วยสารพิษต่างๆ มากกว่า 20 ชนิด เป็นโปรตีนเกิน 90% ซึ่งอยู่ในรูปของ polypeptide toxins และ enzymes ที่เหลือเป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งอยู่ในรูปของ glycoprotein ไขมัน อยู่ในรูป phospholipids และมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น ธาตุสังกะสีและ riboflavin เป็นต้น polypeptide toxins ที่สำคัญคือ พิษ neurotoxin ซึ่งพบในงูกลุ่ม *Elapidae* เป็นส่วนใหญ่ neurotoxin นี้มีโมเลกุลขนาดเล็กจึงถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้รวดเร็ว แล้วไปจับที่ neuromuscular junction เช่น พิษจากงูสามเหลี่ยมและงูทับสมิงคลา พิษของ polypeptide toxins ตัวอื่นๆที่พบคือพิษ cardiotoxin พบในงูเห่าอินเดีย จะทำลาย cell membrane ของกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้หัวใจเต้นผิดปกติ พิษ hemorrhagin พบในงูกลุ่ม *Viperidae* ทำให้เกิดเลือดออกตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย พิษ hemolysin มีฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดแดง แต่พบในหลอดทดลองเท่านั้น ไม่พบในผู้ป่วยที่ถูกงูกัด พิษ cytotoxin พบในงูกลุ่ม *Viperidae* งูเห่าและงูจงอาง จะทำลายเซลล์โดยตรง ทำให้บริเวณที่ถูกกัดบวมและเน่า พิษ rhabdomyxin พบในงูทะเล ทำให้กล้ามเนื้อตายและเกิด myoglobinuria เอ็นไซม์ที่พบในพิษงูมีหลายชนิดเช่น trombinlike enzyme จะกระตุ้น factor V และ factor X ทำให้เลือด ไม่แข็งตัว ส่วน enzyme protease ที่พบในงูจะปะจะทำลาย fibrinogen และ enzyme phospholipase (lecithinase) ที่พบในพิษงูหลายชนิดทำให้เกิด neurotoxicity cardiotoxicity และเพิ่ม vascular permeability ส่วน enzyme hyaluronidase จะย่อย tissue ของร่างกายทำให้พิษงูแพร่กระจายเร็วขึ้น ส่วนประกอบของสารต่างๆเหล่านี้ จะมีสารใดมากหรือน้อย ขึ้นกับชนิดของงูพิษแต่ละชนิด ซึ่งจะมีคุณสมบัติ เฉพาะตัวที่แตกต่างออกไปจากพิษงูชนิดอื่นๆ และความเป็นพิษในแต่ละชนิดนั้นเชื่อว่าอาจเกิดจากการทำงานของสารพิษ เพียงหนึ่งอย่างหรือมากกว่าหนึ่งอย่างขึ้นไปก็ได้ โดยความเป็นพิษเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารที่เป็นพิษแต่ละอย่าง ปกติงูทั่วไปจะขับพิษออกมาครั้งหนึ่งประมาณ 30-2,000 มิลลิกรัม และ 2 ใน 3 เป็นน้ำ

งูจงอาง^[4]

งูจงอาง (King Cobras) เป็นงูพิษในกลุ่ม Family *Elapidae* งูในกลุ่มนี้จะมีเขี้ยวพิษอยู่ที่ กรามบนด้านหน้า เวลากัดผู้ปวยมักจะไม่เห็นรอยเขี้ยว (fang mark) เนื่องจากเขี้ยวสั้นและ เคลื่อนไหวไม่ได้ Subfamily *Bungarinae* มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Ophiophagus hannah* จัดเป็นงูพิษที่ยาวที่สุดในโลก โดยทั่วไปแล้ว ตัวโตเต็มที่ยังมีความยาวอยู่ในช่วง 2.5-4 เมตร น้ำหนักงูจงอาง

ขนาดใหญ่ประมาณ 6-10 กิโลกรัม เป็นงูที่มีรูปร่างเพรียวยาว รูปร่างเป็นงูพิษที่มีนิสัยค่อนข้างดุ สามารถแผ่แม่เบี้ยได้เช่นเดียวกับงูเห่า การแผ่แม่เบี้ยจะยกตัวได้สูงประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวลำตัว แต่แม่เบี้ยจะแคบกว่างูเห่าเมื่อเทียบกับความกว้าง และไม่มีดอกจันอย่างในงูเห่า แต่จะมีลายจางๆพาดตามขวางเป็นขั้วๆแทน นอกจากนี้รูปร่างยังมีเกล็ด (occipitals) บนศีรษะคู่พิเศษ 1 คู่ อยู่ด้านหลังของเกล็ดกระหม่อม (parietals) ขนาดและสีของลำตัวจะแปรผันกันในแต่ละพื้นที่ เช่น รูปร่างทางภาคใต้ของไทย มักมีขนาดตัวใหญ่กว่ารูปร่างในภาคอื่นสีตัวเป็นสีน้ำตาลอมเขียว ส่วนรูปร่างแถบภูเขาสูงทางภาคเหนือ มักพบว่ามีสีเข้มคล้ำจนเกือบดำ เรียกว่า จงอางดำ ค่อนข้างดุกว่าแบบอื่น ส่วนรูปร่างทางภาคกลางและอีสานมักมีสีตัวเป็นลายขั้วตามขวางเป็นขั้วๆเกือบตลอดตัว แต่ขนาดเล็กกว่าภาคอื่น รูปร่างอาศัยอยู่ใกล้แหล่งลำธาร ตามซอกหินหรือโพรงไม้ ขึ้นต้นไม้ได้ดี แต่ปกติแล้วจะอยู่ตามพื้นดินมากกว่า เป็นงูที่ออกหากินได้ทั้งในกลางวันและคืน ไม่ร้อนจัดและในเวลาพลบค่ำ อาหารหลักคืองูชนิดอื่นๆ แม้กระทั่งงูเห่าที่ตัวไม่โตนัก และยังกินแมลงชนิดเดียวกันที่ยังเล็กอยู่ นอกจากนี้ อาจกินสัตว์จำพวกตะกวด กิ้งก่า ตุ๊กแก เป็นอาหาร การสืบพันธุ์งูจงอางจะวางไข่ปีละครั้ง ครั้งละ 20-30 ฟอง ก่อนวางไข่ งูจงอางเพศเมียจะใช้ลำตัวกวาดใบไม้ร่วงๆมากองสุมเป็นรัง พอวางไข่แล้วก็คลุมด้วยใบไม้ แม่งูจะดูแลไข่ไข่เอง ลูกงูแรกฟักมีความยาวลำตัวกว่า 50 เซนติเมตร สีตัวเป็นสีดำ มีลายเหลืองคาดตามขวางเป็นระยะตั้งแต่หัวสุดหาง รูปร่างเป็นงูที่มีนิสัยดุ มีพิษทางระบบประสาท (Neurotoxins) ที่รุนแรงมาก เนื่องจากพิษมีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถถูกดูดซึมได้รวดเร็วไปตามกระแสเลือด ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาตก พุดไม่ชัดเจนหายใจไม่สะดวก อีกทั้งยังมีขนาดตัวใหญ่ ต่อมาพิษใหญ่ปริมาณพิษย่อมมากตามไปด้วย ประกอบกับมีพฤติกรรมการกัดแบบกัดคิดแน่นอน ไม่ยอมปล่อยง่ายๆ จึงจัดเป็นงูพิษที่อันตรายมาก

การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส

(Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC))

ใช้หลักการกระจายตัวของโปรตีนในเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ที่แตกต่างกัน โดยโปรตีนที่กระจายตัวในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าจะแยกตัวออกมา ก่อนโปรตีนอื่นๆ เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารตามความแตกต่างของสภาพขั้ว โดยมีเฟสอยู่กับที่เป็นสารที่ไม่มีขั้วจำพวกอนุพันธ์ของซิลิกาที่ต่อกับไฮโดรคาร์บอนสายยาว เทคนิคนี้จะใช้บีบความดันสูงดันเฟสเคลื่อนที่ซึ่งมีสภาพขั้วสูงให้เคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง ดังนั้นโปรตีนที่มีสภาพขั้วสูงมีแรงดึงดูดกับตัวกลางน้อยจะถูกชะออกมากับเฟสเคลื่อนที่ก่อน โปรตีนที่มีสภาพขั้วต่ำที่จะจับกับตัวกลางได้ดีกว่าส่งผลทำให้เกิดการแยกชั้น

เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟเรซิส

ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและพิสูจน์ความบริสุทธิ์ อาศัยหลักที่ว่าสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้า โดยเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามกัน สารที่มีประจุไฟฟ้าต่างกัน ย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน และโมเลกุลขนาดเล็กมักเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่

วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพเสีย (SDS-PAGE)

SDS-PAGE เทคนิคนี้เป็นการแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้าโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งเป็นประโยชน์ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและยังสามารถแยกหน่วยย่อยของโปรตีนที่ช่วยบ่งชี้ถึงองค์ประกอบของโปรตีนรวมไปถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย

วิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสองทิศทาง (2-DE)

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

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีน

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยการหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน อาศัยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี^[5] (Mass Spectrometry) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและความไวสูง สามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อยซึ่งเหมาะสมต่อการวิเคราะห์โปรตีน เป็นเทคนิคที่ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลและ โครงสร้างของสาร โดยอาศัยการวิเคราะห์ค่ามวลต่อประจุของไอออนที่สารถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัว องค์ประกอบหลักของเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ แหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ทำหน้าที่เปลี่ยนสภาพโมเลกุลสารที่ไม่มีประจุให้กลายเป็นไอออน ส่วนที่สองเป็นส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ส่วนนี้ทำหน้าที่แยกไอออนที่เกิดขึ้นตามอัตราส่วนของมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ส่วนสุดท้ายคือส่วนตรวจวัดมวล (detector) มีหน้าที่วัดปริมาณไอออนที่เกิดขึ้น แมสสเปกโตรเมตรีที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์ทางด้านโปรตีนมีหลายเทคนิค อาทิเช่น MALDI-TOF เทคนิคนี้ใช้เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่ได้มาจากการย่อยโปรตีนบริสุทธิ์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางโปรตีน เทคนิคนี้

เรียกว่า peptide-mass mapping แมสสเปกโตรมิเตอร์ของเทคนิค MALDI-TOF มีส่วนของแหล่งกำเนิดไอออนเป็น matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) ที่ทำให้โปรตีนกลายเป็นไอออนด้วยพลังงานแสงเลเซอร์โดยใช้กรดอินทรีย์ (matrix) เป็นตัวกลางถ่ายทอดพลังงานจากแสงเลเซอร์ให้กับโปรตีนและทำให้โปรตีนเกิดเป็นไอออนได้ในสภาวะก๊าซ ส่วนวิเคราะห์มวลของเทคนิคนี้เป็น time of flight (TOF) ทำหน้าที่วิเคราะห์มวลตามระยะเวลาที่ไอออนใช้ในการเดินทางจากแหล่งกำเนิดไอออนมาจนถึงส่วนตรวจวัด หลังจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางแมสสเปกโตรเมตรี ผลที่ได้คือมวลโมเลกุลของชิ้นส่วนเปปไทด์ โดยจะนำไปเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล เพื่อให้ทราบชนิดของโปรตีน แต่ถ้าไม่ตรงกับโปรตีนใดเลยในฐานข้อมูล ก็คาดได้ว่าอาจเป็นโปรตีนชนิดใหม่

งานวิจัยที่ผ่านมา

จากความเป็นพิษของสารเคมีในพิษงูนั้น ได้มีผู้สนใจใช้เป็นตัวยารักษาโรคต่างๆ เช่น Ancrod^[6] จากพิษงูเขียวหางไหม้และ Exanta^[7] จากพิษของงูเห่า เป็นยาที่ป้องกันการเกิดลิ่มเลือด เนื่องจากโปรตีนในพิษงูจะไปจับกับ integrin^[8] ทำให้ยับยั้งการเกิด fibrinogen ซึ่งเป็นโปรตีนในเลือดที่ทำให้เลือดแข็งตัว ซึ่งเป็นสาเหตุเกิดหัวใจวาย ช่วยให้เลือดไหลเวียนได้ดี และโปรตีน contortrostatin^[9] ในพิษของงู Copperhead viper ช่วยในการรักษาโรคมะเร็งได้ โปรตีนนี้จะไปยับยั้งการไหลเวียนเลือดในก้อนเนื้อร้าย ทำให้ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และมีความเฉพาะเจาะจงต่อเป้าหมายมาก นอกจากพิษของงูแล้วที่นำมาเป็นยารักษาโรคได้ เช่น น้ำลายของ Gila monster ก็นำมาทำเป็นยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด มีชื่อว่า Exenatide^[10] ซึ่งในปัจจุบันมีผู้ศึกษาการนำพิษจากธรรมชาติต่างๆ มาใช้เป็นยารักษาโรคเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากว่ามีผลข้างเคียงน้อยและมีความเฉพาะเจาะจงต่อเป้าหมาย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโปรตีนจากน้ำพิษของงู ที่มีผู้ได้ศึกษามาแล้ว ก็จะมีงูแมวเซา งูเห่า งูทับสมิงคลา งูเขียวหางไหม้คาโต และงูจงอาง แต่เนื่องจากพิษของงูแต่ละชนิดมีความเหมือนและแตกต่างของการออกฤทธิ์ จึงได้ทำการศึกษาหาองค์ประกอบที่สำคัญในการก่อให้เกิดอันตราย เมื่อพิษเข้าสู่ร่างกาย เพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต ซึ่งในกรณีการศึกษาโปรตีนในพิษงูจงอาง ได้มีผู้พบโปรตีน 72 ตัว ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม Long neurotoxin 19 ตัว, Short chain neurotoxin precursor 10 ตัว, Cardiotoxin precursor 6 ตัว, weak toxin 5 ตัว, Muscarinic toxin 3 ตัว, Phospholipase A₂ 3 ตัว และโปรตีนตัวอื่นๆ อีกประมาณ 26 ชนิด สรุปได้ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 โปรตีนที่พบในพิษงูจงอาง

โปรตีน	จำนวนกรดอะมิโน/มวลโมเลกุล
Long-chain neurotoxin	
Neurotoxin 1 ^[11]	73/8,106
Neurotoxin b ^[11]	73/8,053
CM-9 ^[12]	73/7,957
Oh4 ^[13]	72/8,014
CM-11 ^[14]	93/10,210
Oh5 ^[15]	72/8,040
Oh-6A/6B ^[16]	91/9,857
Oh31 ^[17]	94/10,154
Oh34 ^[17]	90/9,867
Oh37 ^[17]	91/9,853
Oh55 ^[17]	93/10,210
Oh56 ^[17]	99/9,918
Oh57 ^[17]	91/10,058
LNTX1 ^[18]	94/10,536
LNTX8 ^[18]	94/10,509
LNTX22 ^[18]	93/10,381
LNTX28 ^[18]	91/9,885
LNTX37 ^[18]	94/10,563
LNTX2 ^[19]	93/10,244
Short-chain neurotoxin	
Oh9-1 ^[20]	57/6,516
Oh5 (precursor) ^[17]	78/8,984
Oh26 ^[17]	78/8,756
Oh32 ^[17]	77/8,601
Oh35 ^[17]	86/9,564
Oh46 ^[17]	78/8,893
SNTX6 ^[18]	78/8,849
SNTX11 ^[18]	78/8,931

ตารางที่ 1 โปรตีนที่พบในพิษงูจงอาง (ต่อ)

โปรตีน	จำนวนกรดอะมิโน/มวลโมเลกุล
Short-chain neurotoxin	
SNTX14 ^[18]	78/8,909
SNTX26 ^[18]	78/8,895
Weak toxin	
DE-1 ^[21]	60/6,812
OH72 ^[27]	81/9,067
WNTX33 ^[18]	83/9,283
WNTX34 ^[18]	86/9,815
WTX DE-1 ^[19]	83/9,387
Muscarinic toxin	
MTX6 ^[18]	86/9,412
MTX38 ^[18]	86/9,684
Muscarinic toxin ^[19]	86/9,839
Cardiotoxin	
Oh27 ^[18]	84/9,311
CTX9 ^[19]	84/9,380
CTX14 ^[19]	84/9,256
CTX15 ^[19]	84/9,352
CTX21 ^[19]	84/9,255
CTX23 ^[19]	84/9,296
PhospholipaseA₂	
PhospholipaseA ₂ , acidic 1 ^[22]	151/16,444
PhospholipaseA ₂ ^[23]	146/15,901
PhospholipaseA ₂ , acidic 2 ^[24]	152/16,641
Other proteins	
Thioredoxin ^[23]	105/12,003
Ophanin ^[25]	239/26,869
Venom chymotrypsin inhibitor ^[26]	58/6,499
L-amino acid oxidase ^[27]	19/2,298
Ohanin ^[28]	190/21,174

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชงูจงอาง

พืชงูจงอาง 3 ตัวอย่าง (KV2, KV6 และ KV9) มาจากถิ่นกำเนิดที่ต่างกัน ได้ความอนุเคราะห์จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C พืช KV2 เป็นพืชที่ได้มาจากงูจงอางที่นำไข่มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ แล้วเพาะเลี้ยงที่โครงการเพาะเลี้ยงงู มีอายุ 3 ปี พืช KV6 ได้มาจากงูจงอางที่นำไข่มาจากภาคใต้ แล้วเพาะเลี้ยงที่โครงการเพาะเลี้ยงงู มีอายุ 5 ปี พืช KV9 ได้มาจากงูจงอางตัวเต็มวัยจากภาคใต้ นำมาเลี้ยงที่สวนงู

ส่วนแยก 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3 และ 1.2.4 ได้มาจากการแยกโปรตีนในพืชงูจงอางจากโครงการที่ 2

สารเคมี

Acetic acid: Merck Ag Darmstadt, Germany

Acetonitrile: Merck Ag Darmstadt, Germany

Acrylamide PAGE: Plusone pharmacia biotech, Sweden

Acrylamide: Amersham pharmacia biotech, Sweden

Ammonium persulfate: Plusone pharmacia biotech, Sweden

Bromophenol Blue: USB, U.S.A

Bovine serum albumin: Sigma, St. Louis, MO, U.S.A

Coomassie brilliant blue: USB, U.S.A

Ethanol: Merck Ag Darmstadt, Germany

Formic acid: Merck Ag Darmstadt, Germany

Glycine: USB, U.S.A

Methanol: Merck Ag Darmstadt, Germany

N, N'-methylenebisacrylamide; Plusone pharmacia biotech, Sweden

Phosphoric acid: J.T. Baker, U.S.A

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate): USB, U.S.A

Trichloroacetic acid: BHD, VWR International Ltd., England

Trifluoroacetic acid: Fluka, Germany

Tris: USB, U.S.A

α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid: Sigma Chemical, U.S.A

วัสดุอุปกรณ์

- Autopipette: Pipetman, Gilson, France
- Freeze dryer: Labconco, U.S.A
- Immobilized pH gradient strips (IPG strips) pH3-10 and PH 4-7: Amersham pharmacia biotech
- Laboratory centrifuge; Biofuge pico Heraeus, Kendro, Germany
- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass spectrometer: MICROFLEX, Bruker Daltonics, Inc., USA
- Microcentrifuge: Biofuge pico Heraeus, Kendro, Germany
- Microcentrifuge tube: Axygen Scientific, U.S.A
- Micropipettes adjustable from 2 to 1,000 μ l: Gilson, France
- Macrotrap desalting cartridge: Michrom Bioresource
- MultiphorTM II Electrophoresis Unit: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden.
- pH meter G-560E: Denver Instrument, U.S.A
- Pipette tips: Biotek, U.S.A
- Power Supply: EPS 301, Amersham pharmacia biotech, Sweden
- Power Supply: EPS 3501 XL, Amersham pharmacia biotech, Sweden
- SDS-PAGE: HoeferTM mini VE (minivertical), 8 \times 9 cm gels, Amersham pharmacia biotech, Sweden
- Spectrophotometer: TECAN, Austria
- Speed vacuum centrifuge: Heto-Holten, Denmark
- Sonicator: BHA-1000, Branson, U.S.A
- Vortex mixer: Vortex-Genie2, Scientific Industries, U.S.A
- Water Bath Shaking: Memmert, Germany

วิธีการวิจัย

การวิเคราะห์โปรตีนในพิษงูด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสภาพเสีย (SDS-PAGE)

วิธี SDS-PAGE ใช้ 15% Polyacrylamide gel ในส่วน Separating gel และ 3% gel สำหรับ Stacking gel นำตัวอย่าง 4 fraction มาผสมกับ loading buffer และทำการต้ม 5 นาที ก่อนที่จะใส่ลงในร่อง (well) บน stacking gel ในส่วนการทำอิเล็กโตรฟอเรซิส ทำงานโดยใช้กำลังไฟ 15 mA ต่อ 1 เจล (Mini-Protein (Hoefer mini VE)) เมื่อสิ้นสุดการทำอิเล็กโตรฟอเรซิส ทำการย้อมเจลในสารละลายสีย้อม Coomassie blue เป็นเวลาประมาณ 60 นาที แล้วจึงค่อยรินออก แล้วเติม destaining solution ประมาณ 30 นาที 3 ครั้ง หรือจนกว่าสีย้อมที่ติดอยู่บนเจลจะหลุดออกหมด

การวิเคราะห์โปรตีนในพิษงูด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสองทิศทาง (2-DE)^[29]

วิธีอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสองทิศทาง ในทิศทางแรกจะแยกโปรตีนตามประจุ โดยอาศัยวิธี IEF โดยใช้ IPG strips ขนาด 7 เซนติเมตร มาดูดซับตัวอย่างพิษงูที่ผสมกับ lysis buffer และ rehydration solution ที่อุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 12 ชั่วโมง การทำอิเล็กโตรฟอเรซิสจะทำที่อุณหภูมิ 20 °C โดยเครื่อง Multiphor II Electrophoresis Unit เมื่อสิ้นสุดทำการบ่ม IPG strip ใน equilibration solution 2 แบบ อย่างละ 15 นาที เมื่อเสร็จมาแยกต่อในทิศทางที่สองแยกโดยอาศัยความแตกต่างของมวลโมเลกุลของโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE ทำงานโดยใช้กำลังไฟ 10 mA ต่อ 1 เจล เป็นเวลา 15 นาที และ 20 mA ต่อ 1 เจล จนกว่าสีย้อมจะลงมาสุดเจล เมื่อสิ้นสุดการทำอิเล็กโตรฟอเรซิส ทำการย้อมเจลในสารละลายสีย้อม Coomassie blue เป็นเวลาประมาณ 60 นาที แล้วจึงค่อยรินออก แล้วเติม destaining solution ประมาณ 30 นาที 3 ครั้ง หรือจนกว่าสีย้อมที่ติดอยู่บนเจลจะหลุดออกหมด สารละลายต่างแสดงในภาคผนวก ข

การวิเคราะห์โปรตีนในพิษงูด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส (RP-HPLC)

การวิเคราะห์โปรตีนในพิษงูด้วยวิธี RP-HPLC โดยชั่งสิ่งสกัดหยาบพิษงูชั่ง 1 มิลลิกรัม แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร แล้วกรองส่วนใสด้วย Millipore filter paper ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะคอลัมน์ชนิด reverse phase Nucleosil C18 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร สารละลายตัวพา 2 ระบบคือ acetonitrile กับ 0.1% TFA ในน้ำ โดยทำการเพิ่มความเข้มข้นของ acetonitrile แบบเส้นตรง อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อนาที เครื่องตรวจวัดชนิด L-4250 UV-VIS detector ที่ 280 นาโนเมตร โดยเก็บส่วนแยกที่ 4 °C จนกว่าจะวิเคราะห์

In-gel digestion

ทำการตัดแถบโปรตีนที่ได้จาก SDS-PAGE ให้ได้ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร รวมกันใส่ไว้ใน Microcentrifuge tube ขนาด 500 ไมโครลิตร ทำการล้างเจลด้วย 50% ACN/100 mM NH_4HCO_3 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที เติม ACN 300 ไมโครลิตร ที่จิ้งไว้จนกว่าเจลจะโต เอาสารละลายออกและทำให้เจลแห้ง เติม trypsin buffer (13 ng/ μl trypsin ใน 10 mM NH_4HCO_3 ที่มี ACN 10%) แล้วทิ้งไว้ในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 90 นาทีแล้วเติม 0.1M NH_4HCO_3 15 ไมโครลิตร ที่จิ้งไว้อีก 12 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 37 °C ทำการสกัดเปปไทด์ออกจากเจล สารสกัดที่ใช้ คือ 1:2 (vol/vol) 5% formic acid/ACN 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้แห้งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าทำการวิเคราะห์

วิเคราะห์โปรตีนด้วย MALDI-TOF MS

เทคนิคทางแมสสเปกโทรเมทรีที่ใช้คือ MALDI-TOF MS (MICROFLEX, Bruker, USA) นำสารตัวอย่างมาละลายด้วย 50% ACN/0.1% TFA มาผสมกับ matrix solution (saturated Cyano-4-hydroxycinnamic acid 50% ACN/0.1% TFA) ในอัตราส่วน 1 : 5 เพื่อหนาน้ำหนัก โมเลกุลของเปปไทด์ที่ถูกย่อยมาจากโปรตีนบริสุทธิ์ โดยใช้ Neurotensin มวลโมเลกุล 1,690.93 ดาลตัน และ ACTH มวลโมเลกุล 2,465.98 ดาลตัน เป็นมาตรฐานในการวิเคราะห์มวล แล้วนำไป สืบค้นจากฐานข้อมูล โปรตีน เพื่อระบุชนิดของโปรตีน โดยใช้ฐานข้อมูล MASCOT(<http://www.matrixscience.com>)

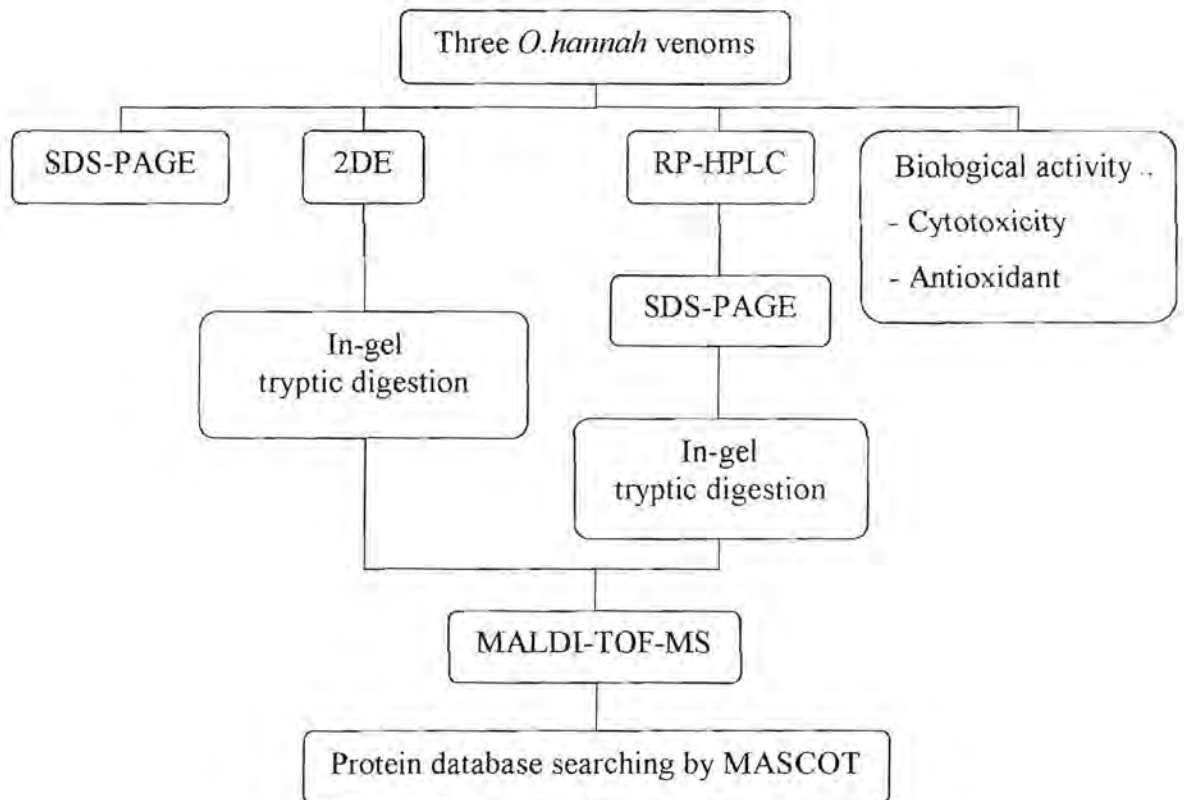
วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย ESI-Q-TOF mass spectrometer

เครื่องมือที่ใช้คือ ESI-Q-TOF mass spectrometer (Korea Basic Science Institute, Systems Biology Core Facility, Korea) โดยทำการวิเคราะห์เปปไทด์ที่ได้จากการย่อย (In-gel digestion) ผลที่ได้จะนำไปเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม MASCOT (www.matrixscience.com)

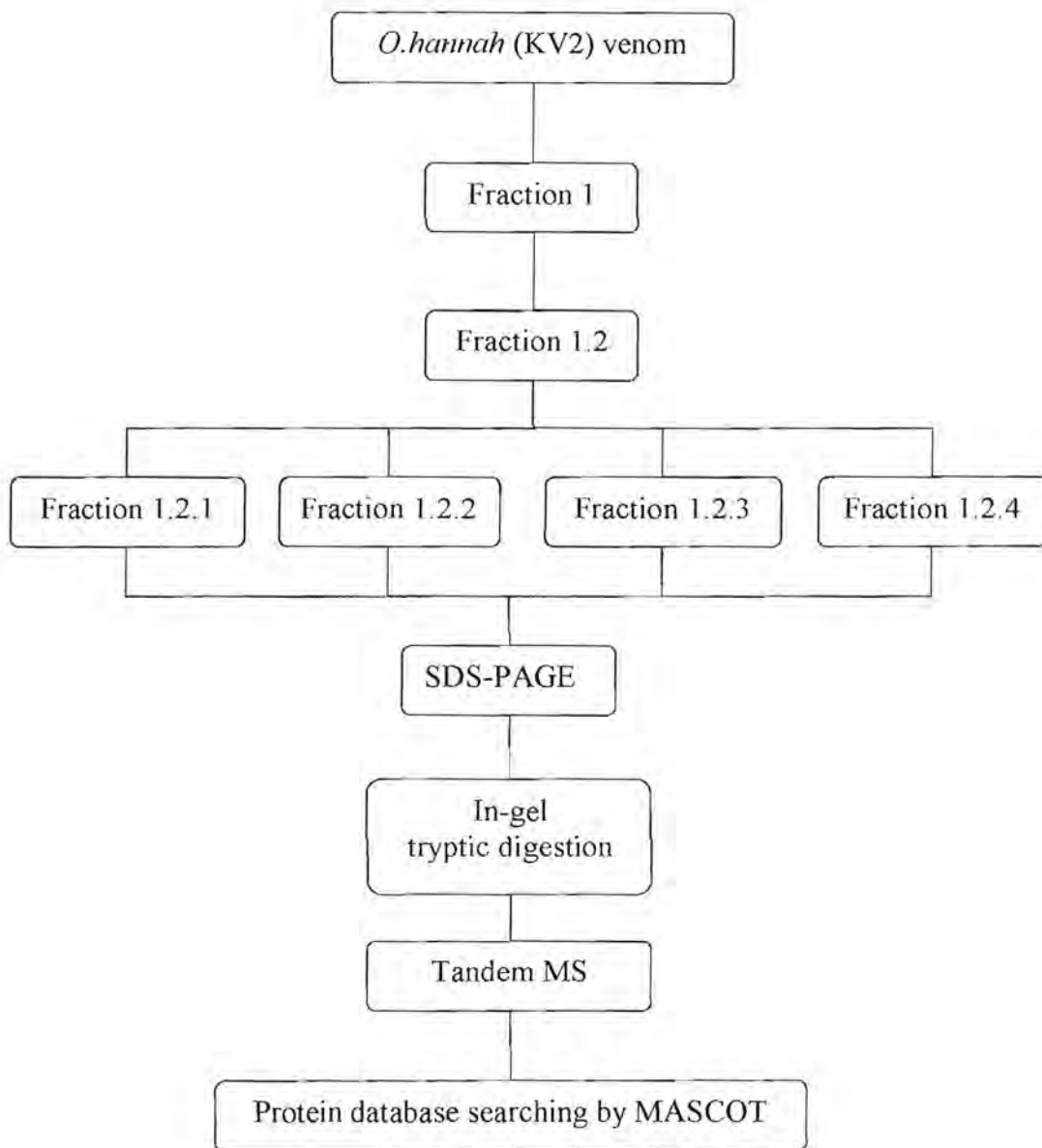
ผลการวิจัยและอภิปราย

การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบโปรตีนในพิษงูจงอาง

กระบวนการทดลองได้อธิบายตามรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ในรูปที่ 1 แสดงขั้นตอนในการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบโปรตีนของสิ่งสกัดหยาบพิษงูจงอาง 3 ตัวอย่าง พิษงูจงอาง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ KV2, KV6 และ KV9 เป็นพิษงูจงอางที่มีแหล่งกำเนิดแตกต่างกัน ส่วนการพิสูจน์เอกลักษณ์ของส่วนแยก (fraction) จากตัวอย่าง KV2 แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 แผนผังขั้นตอนการเปรียบเทียบพิษงู 3 ตัวอย่าง



รูปที่ 2 แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนส่วนแยกของพิษงู KV2

การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชงองอาจ

ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชงองอาจทั้ง 3 ตัวอย่างแสดงในตารางที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดหยาบพืชงองอาจทั้ง 3 ตัวอย่างมีปริมาณ 40ของน้ำหนักแห้ง จากค่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในระดับห้องทดลองที่ 50(IC₅₀) ของพืช KV2และ KV6 (พืช KV9 ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่ำกว่า 50%) แสดงว่าพืช KV2 มีความเป็นพิษสูงกว่าพืช KV6 และ KV9 ส่วนความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (EC₅₀) ของพืชทั้ง 3 ตัวอย่างพบว่ามีค่าต่ำกว่า 50%

ตารางที่ 2 องค์ประกอบเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชงองอาจ

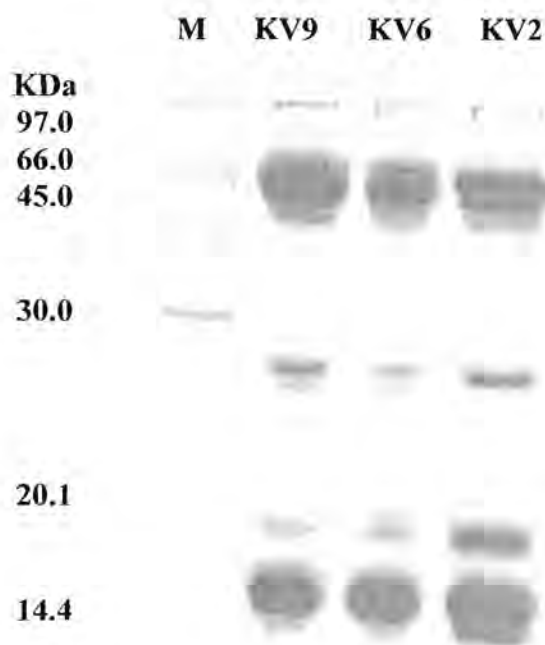
องค์ประกอบเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ	KV2	KV6	KV9
ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.39	0.36	0.38
(% (g/g) ของน้ำหนักแห้ง)	(39)	(36)	(38)
ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ 50%* (IC ₅₀) (µg/ml)	2.99	6.11	-

* Cytotoxicity on Hep-G2 cell line (MTT assay)

การศึกษาารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพเสีย

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ได้ผลดังรูปที่ 3 โดยแถบของโปรตีนที่ได้จะมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 66 ถึง 14 กิโลดาลตัน ตัวอย่างพืชทั้ง 3 ตัวอย่างมีองค์ประกอบโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน ด้วยจะมีแถบโปรตีนมาก ที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 45 กิโลดาลตัน และน้อยกว่า 20 กิโลดาลตัน แต่จะมีความแตกต่างกันที่ความเข้มของแถบโปรตีน โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของตัวอย่างเท่ากัน แถบโปรตีนของพืชตัวอย่าง KV2 จะมีความเข้มมากกว่าแถบโปรตีนที่ได้จากพืชตัวอย่าง KV6 และ KV9 ยกเว้นแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตัน และในแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 28 ถึง 26 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนของตัวอย่าง KV6 และ KV9 จะแยกออกเป็น 2 แถบอย่างเห็นได้ชัด แต่พืชตัวอย่าง KV2 มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว จากความแตกต่างของความเข้มและจำนวนของแถบโปรตีนที่ได้แสดงถึงความแตกต่างในองค์ประกอบของโปรตีนในตัวอย่างพืช ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเป็นเหตุผลที่พืชแต่ละตัวอย่างมีความเป็นพิษที่

แตกต่างกัน แต่วิธีการยังสามารถนำมาวิเคราะห์ต่อไปได้ เนื่องจากแถบของโปรตีนที่ได้ยังแยกจากกันไม่ชัดเจนพอ จะทำการตัดชิ้นเจลไปทำการสกัด โปรตีนมาวิเคราะห์ต่อไป



รูปที่ 3 SDS-PAGE ของพืชงูจงอางทั้ง 3 ตัวอย่าง (1) protein standard; (2) ตัวอย่าง KV9; (3) ตัวอย่าง KV6; (4) ตัวอย่าง KV2

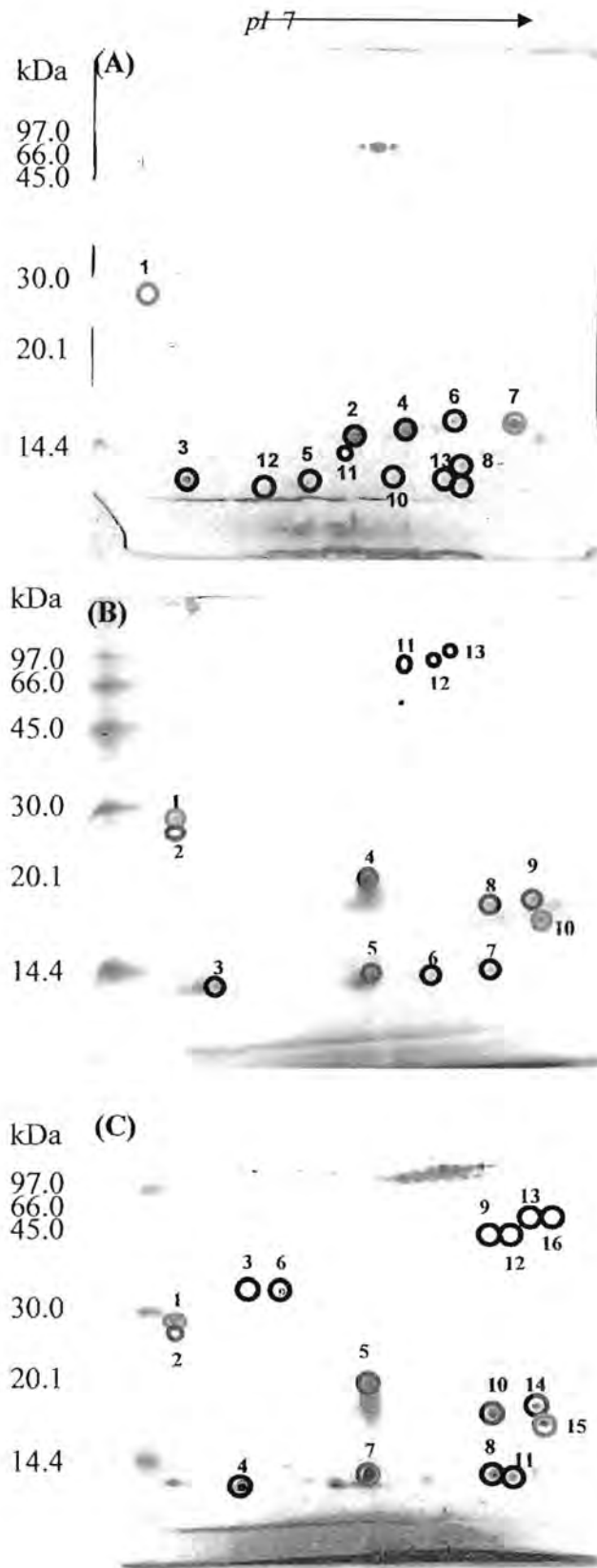
การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองทิศทาง

การแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองทิศทาง โดยใช้แผ่น IPG-strip ที่ pH 3-10 (ภาคผนวก ง) พบว่าจุดโปรตีนส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงที่เป็นกรด จึงเปลี่ยนมาใช้แผ่น IPG-strip ที่ pH 4-7 ในการสกัดและแยกโปรตีน ได้ผลดังรูปที่ 4 จากรูปจะพบว่าตัวอย่างพืชงูทั้ง 3 ตัวอย่างมีการกระจายตัวของจุดโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน คืออยู่ในช่วงของความเป็นกรดและมีมวลโมเลกุลต่ำ เช่นเดียวกับงานวิจัยของนวารักษ์ผ่านมา^[30] โดยจุดโปรตีนที่มีตำแหน่งเดียวกันของพืชงูทั้ง 3 ตัวอย่าง จะแสดงในวงกลมสีแดง ส่วนวงกลมสีเขียวจะแสดงถึงจุดโปรตีนที่มีตำแหน่งเดียวกันระหว่างพืชงู KV6 และ KV9 ส่วนจุดโปรตีนที่เกิดขึ้นแล้วไม่ซ้ำตำแหน่งกันเลยในพืชงูทั้ง 3 ตัวอย่างจะเป็นวงกลมสีดำ

รูปแบบและจำนวนจุดโปรตีนของพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่าง พบว่าพิษงู KV6 และ KV9 ที่มีแหล่งกำเนิดจากภาคใต้เหมือนกันมีความองค์ประกอบของโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน แตกต่างจากพิษงู KV2 ที่มีถิ่นกำเนิดจากจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนในช่วงมวลโมเลกุลที่ต่ำกว่า 14.4 กิโลดาลตัน โดยจะมีปริมาณจุดโปรตีนที่มากกว่าตัวอย่างพิษงู KV6 และ KV9 แต่ในช่วงมวลโมเลกุล 45 ถึง 30 กิโลดาลตัน พิษงู KV6 และ KV9 จะมีปริมาณจุดโปรตีนมากกว่าพิษงู KV2 ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่พิษงู KV2 มีความเป็นพิษสูงกว่าพิษงูตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งยืนยันได้จากการศึกษาโปรตีนในพิษงูจาง ที่สารพิษส่วนใหญ่ในพิษงูมีมวลโมเลกุลต่ำ^[31]

จากผลการแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรเฟอร์ซิสแบบสองทิศทาง ได้ทำการตัดเจลในแต่ละจุดมาทำการย่อยเจต ด้วยวิธี In-gel digestion โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจล ซึ่งโปรตีนที่ได้จะถูกย่อยเป็นเปปไทด์ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วย MALDI-TOF ทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่ได้มาจากการย่อยโปรตีนบริสุทธิ์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางโปรตีน (peptide-mass mapping) ^[32] ได้ผลดังตารางที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ

ผลจากการเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าจุดโปรตีนที่มีตำแหน่งเดียวกันที่ได้จากพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่าง เช่น จุดโปรตีนที่ 1 ของทุกตัวอย่างเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลแล้วตรงกับโปรตีนโอฟานิน (ophanin) ดังแสดงในรูปที่ 5 โอฟานินเป็นโปรตีนที่ไปปิดกั้นการส่งสารสื่อประสาทบนของกล้ามเนื้อเรียบ จุดที่ 7 ของพิษงู KV2 , จุดที่ 10 ของ KV6 และ จุดที่ 13 ของ KV9 เป็นอีกจุดโปรตีนที่มีตำแหน่งเดียวกัน และผลจากการเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าตรงกับสายเอชของฟอสโฟไลเปส 2 ดังแสดงในรูปที่ 6 เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของหมู่เอซิลของฟอสโฟกลีเซอไรด์ ซึ่งมีผลทำให้เกิดเป็นพิษต่อระบบหัวใจ กล้ามเนื้อ และระบบเลือด^[33] ส่วนจุดโปรตีนที่พบในพิษงู KV2 พบว่าจุดโปรตีนที่ 2 และจุดโปรตีนที่ 4 เมื่อนำมาเทียบกับฐานข้อมูลแล้วพบว่าตรงกับโปรตีนกลุ่มฟอสโฟไลเปส ซึ่งจะมีค่าความเชื่อมั่นที่ยอมรับได้ โดยแสดงลำดับกรดอะมิโนในภาพที่ 7 และ 8 ตามลำดับ สำหรับจุดโปรตีนอื่นๆ จากพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่างไม่สามารถที่จะพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ และไม่ตรงกับโปรตีนในพิษงูจาง เพราะมีค่าความเชื่อมั่นต่ำกว่าค่าที่จะยอมรับได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่พบเป็นโปรตีนชนิดใหม่หรือข้อมูลในการเทียบไม่เพียงพอต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิคการหาลำดับกรดอะมิโนมาใช้ต่อไป



รูปที่ 4 2-DE gel ของพิษงูจงอาง 3 ตัวอย่าง
(A): KV2, (B): KV6 และ (C): KV9

ตารางที่ 3 การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีนในพิษงูจงอางตัวอย่าง KV2

Spot No.	App.mass/pI	Theor.mass/pI	No.of peptides matched	Sequence coverage (%)	score	Protein
1	31,945/6.9	26,851/6.90	5	21	60	Ophanin precursor (Opharin)
2	13,139/5.5	13,447/4.47	5	58	74	phospholipase A2
3	9,904/6.3	9,463/9.19	2	66	40	mCG147719
4	13,960/5.2	16,433/5.67	5	37	81	Phospholipase A2, acidic 1 precursor
5	9,904/5.7	7,072/5.83	2	45	40	ring finger protein 185
6	14,832/4.9	15,150/4.7	3	25	47	receptor activity modifying protein 3
7	14,832/4.5	13,182/4.41	5	43	85	Chain A, Structure of An Acidic Phospholipase A2
8	11,179/4.8	9,946/6.08	3	55	43	MHC class II beta chain
9	9,904/4.9	14,063/5.56	4	47	63	adenylate kinase 1
10	9,904/5.5	9,703/5.63	3	42	45	unnamed protein product
11	12,120/5.5	10,824/5.02	3	47	37	B1-Beta II protein
12	9,904/6	19,064/7.85	3	30	48	Chain A, Structure Of The C2b Domain Of Rabphilin3a
13	10,312/5	15,728/5.13	2	27	30	Phospholipase A2 precursor

ตารางที่ 4 การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีนในพืชจางตัวอย่าง KV6

Spot No.	App.mass/pI	Theor.mass/pI	No.of peptides matched	Sequence coverage (%)	score	Protein
1	36,925/6.9	26,851/6.90	4	20	39	ophanin precursor (Opharin)
2	35,562/6.9	42,768/9.67	7	32	52	hypothetical protein
3	16,764/6.7	14,279/6.81	3	55	42	hypothetical protein
5	17,406/5.6	13,730/4.32	3	69	52	MGC16385 protein
6	18,073/5.2	19,193/4.75	4	18	56	Translationally-controlled tumor protein
7	17,406/4.8	12,331/5.6	4	58	49	insulin 2
8	24,416/4.8	13,122/7.99	4	57	55	gonadotrophin alpha 1 subunit
9	24,416/4.5	27,219/6.52	3	16	46	rCG54731
10	21,812/4.5	13,182/4.41	3	31	46	Chain A, Structure Of An Acidic Phospholipase A2
11	69,976/5.3	60,132/5.87	6	12	45	titin
13	71,658/4.9	76,422/6.40	5	12	40	hypothetical protein

ตารางที่ 5 การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีนในพืชจางตัวอย่าง KV9

Spot No.	App.mass/pI	Theor.mass/ pI	No.of peptides matched	Sequence coverage (%)	score	Protein
1	35,914/6.9	26,851/6.90	4	21	41	ophanin precursor (Opharin)
2	34,735/6.9	42,768/9.67	7	32	55	hypothetical protein
3	39,039/6.4	46,645/6.43	5	17	49	isocitrate dehydrogenase
4	14,585/6.5	13,560/4.8	2	47	37	EG545052 protein
6	39,039/6.2	33,729/6.16	5	38	67	cyclin-dependent kinase 4
7	15,080/5.6	13,730/4.32	2	53	34	MGC16385 protein
8	15,592/4.9	11,560/6.07	4	76	65	immunoglobulin heavy chain
9	51,845/4.8	43,344/6.64	6	27	54	leucine zipper
10	21,055/4.9	13,122/7.99	4	57	55	gonadotrophin alpha 1 subunit
11	15,592/4.8	12,305/8.62	3	73	55	immunoglobulin heavy chain
12	51,845/4.7	50,490/9.13	5	25	46	WDR40A protein
13	57,305/4.5	69,965/5.51	5	22	46	Prothrombin precursor
14	22,508/4.5	27,219/6.52	3	16	46	rCG54731
15	19,695/4.5	13,182/4.41	3	31	44	Chain A, Structure Of An Acidic Phospholipase A2
16	57,305/4.7	67,076/6.73	6	23	59	6-glucosidase

```

1 MIAFTLLSLA VLQQSFGNVT DFNSESTRRQ KKQKEIVDLH NSLRRSVSPT
KV2_1 -----EIVDLH NSLRR-----
KV6_1 -----EIVDLH NSLR-----
KV9_1 -----EIVDLH NSLR-----

51 ASNMLKMQWY PEAASNAERW ASNCNLGHSP DYSRVLEGIE CGENIYMSSN
KV2_1 -----MQWY PEAASNAERW ASNCNLGHSP DYSR-----
KV6_1 -----MQWY PEAASNAERW ASNCNLGHSP DYSR-----
KV9_1 -----MQWY PEAASNAERW ASNCNLGHSP DYSR-----

101 PRAWTEIIQL WHDEYKNFVY GVGANPPGSV TGHYTQIVWY KTYRIGCAVN
151 YCPSEYSYF YVCQYCPSGN MRGSTATPYK SGPTCGDCPS ACDNGLCTNP
201 CTLYNEYTNC DSLVKQSSCQ DEWIKSKCPA SCFCHNKII
KV2_1 -----SKCPA SCFCHNK
KV2_1 -----SKCPA SCFCHNK
KV2_1 -----SKCPA SCFCHNK

```

รูปที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจุดโปรตีนที่ 1 ของ KV2, KV6 และ KV9 กับ โปรตีน
โอฟานิน

```

1 HLVQFNGMIR CTIPGSIPWW DYS DYGCYCG SGGSGTPVDE LDRCCQVHDN
KV2_7 HLVQFNGMIR -----
KV6_10 HLVQFNGMIR -----
KV9_15 HLVQFNGMIR -----

51 CYTQAQQLTE CSPYSKRYSY DCSEGTLTCK ADNDECAAFV CDCDRVAAIC
KV2_7 -----RYSY DCSEGTLTCK ADNDECAAFV CDCDRVAAIC
KV6_10 -----YSY DCSEGTLTCK ADNDECAAFV CDCDR-----
KV9_15 -----YSY DCSEGTLTCK ADNDECAAFV CDCDR-----

101 FAGAPYNKEN INIDTTTRC
KV2_7 FAGAPYNKEN INIDTTTRC
KV6_10 -----EN INIDTTTRC
KV9_15 -----EN INIDTTTRC

```

รูปที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจุดโปรตีนที่ 7 ของ KV2, จุดที่ 10 ของ KV6 และ จุดที่ 15 ของ KV9 กับ โปรตีน Chain A, Structure of An Acidic Phospholipase A2

```

1 DLIQFGNMIQ CTVPGFLSWI KYADYGICYG AGGSGTPVDK LDRCCQVHDN
KV2_2 ----- -YADYGICYG AGGSGTPVDK ---CCQVHDN
51 CYTQAQKLPA CSSIMDSPYV KIYSYDESCR VAVTCKADND ECAAFICNCD
KV2_2 CYTQAQKLPA CSSIMDSPYV KIYSYDESCR -----ADND ECAAFICNCD
101 RVAAYCFAAS PYNNNNYNID TX
KV2_2 R----- --

```

รูปที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจุดโปรตีนที่ 2 ของ KV2 กับโปรตีน phospholipase A₂

```

1 MNPAHLLVLS AVCVSLLGAS SIPPQPLHLI QFGNMIQCTV PGFLSWIKYA
KV2_4 ----- -YA
51 DYGCYCGAGG SGTPVDKLDL CCQVHDNICYT QAQKLPACSS IMDSPYVKIY
KV2_4 DYGCYCGAGG SGTPVDKLDL ----- --LPACSS IMDSPYVK--
101 SYDCSERTVT CKADNDECAA FICNCDRVAA HCFAASPYNN NNYNIDTTTR
KV2_4 -----TVT CKADNDECAA FICNCDR--- -----
151 C
KV2_4 -

```

รูปที่ 8 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจุดโปรตีนที่ 4 ของ KV2 กับโปรตีน phospholipase A₂, acidic 1 precursor

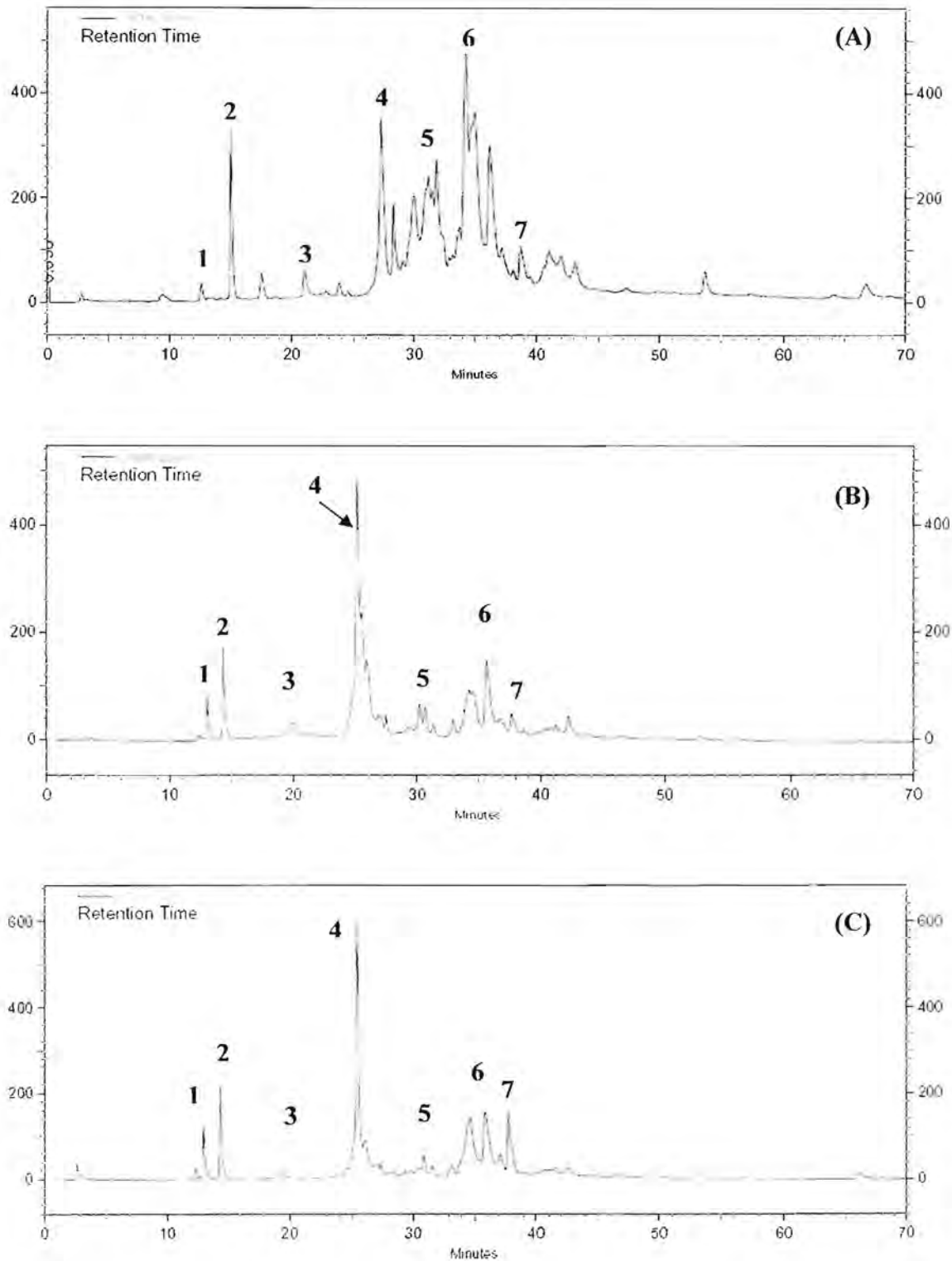
การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส (RP- HPLC)

ผลจากการแยกโปรตีนด้วย RP-HPLC ของพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 4.9 โดยแสดงค่าความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละส่วนแยกในตารางที่ 4.5 โครมาโตแกรมที่ได้จากพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่าง พบว่าโปรตีนที่ได้จะอยู่ถูกชะออกมาในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile (ACN) ตั้งแต่ 10 ถึง 60% โดยพิษงู KV6 และ KV9 มีรูปแบบการในการแยกโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน คือมีพีกโปรตีนใหญ่จะถูกชะออกมาในช่วง 26-30% ACN และพีกโปรตีนขนาดเล็กจะออกมาช่วง 31-50% ACN ส่วนในพิษงู KV2 จะแตกต่างออกไปคือ พีกโปรตีนขนาดใหญ่ส่วนใหญ่จะถูกชะในช่วงความเข้มข้นของ ACN ที่ 26-50% โดยในช่วง 31-41% ACN จะแยกได้พีกโปรตีนขนาดใหญ่ที่สุด และพีกโปรตีนขนาดเล็กจะถูกชะที่ 10 และ 18 % ACN แสดงให้เห็นว่าในพิษงูงองทั้ง 3 ตัวอย่างมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกัน แต่มีปริมาณแตกต่างกัน จากความแตกต่างที่เห็นได้ชัดจากผลการแยกด้วย RP-HPLC ของพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่างที่ได้มาจากถิ่นกำเนิดที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามอาจเกิดจากปัจจัยอื่น เช่น อายุ เพศ อาหาร และสิ่งแวดล้อม

ส่วนแยกที่แยกได้จะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพเสีย (SDS-PAGE) เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของส่วนแยก แล้วจึงตัดแถบโปรตีนที่ได้มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนต่อไป ซึ่งผลที่ได้ไม่สามารถพิสูจน์ได้เนื่องจากข้อมูลในการเทียบกับฐานข้อมูลไม่เพียงพอต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ ACN ที่ใช้ชะและความเข้มข้นของ โปรตีนในแต่ละส่วนแยก

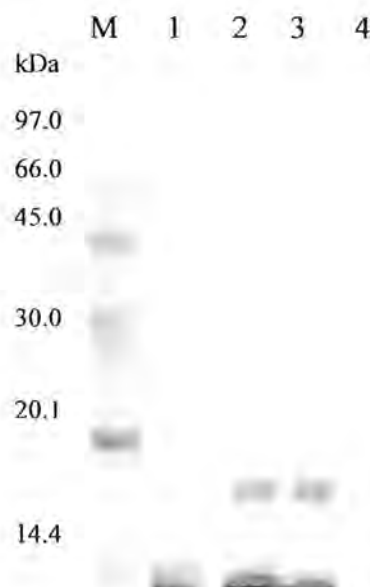
ส่วนแยก	% ACN	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
		KV2	KV6	KV9
1	10	0.0450	0.0161	0.0588
2	12	0.0538	0.0089	0.0467
3	18	0.0250	0.0097	0.0153
4	26-30	0.4434	0.1965	0.2014
5	31-35	1.0322	0.2401	0.2642
6	37-41	1.7826	1.0931	1.1970
7	47-50	0.2332	0.1530	0.6364



รูปที่ 9 โครมาโตแกรมของพิษงูจงอาง 3 ตัวอย่างจากการวิเคราะห์ด้วย RP-HPLC
 (A): KV2 venom, (B): KV6 venom and (C): KV9 venom

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของส่วนแยกที่ได้จากโครงการที่ 2

ส่วนแยก 4 ส่วนที่ได้มาจากการแยกด้วยเทคนิค ด้วยเทคนิคไอออนเอ็กซ์เชนจ์และเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟีแสดงในภาคผนวก ค เมื่อนำส่วนแยกทั้ง 4 ส่วนมาแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังในรูปที่ 4.10 พบว่าในตัวอย่างที่ 1.2.1 และ 1.2.4 ไม่เห็นแถบโปรตีน อาจเนื่องมาจากปริมาณโปรตีนน้อยเกินไป จึงไม่สามารถตัดแถบโปรตีนมาวิเคราะห์ต่อได้ ส่วนตัวอย่าง 1.2.2 และ 1.2.3 ได้เห็นแถบโปรตีนอยู่ในตำแหน่งมวลโมเลกุลระหว่าง 30 -20.1 กิโลดาลตัน แล้วทำการตัดแถบโปรตีนมาทำการย่อยโดยใช้วิธี In-gel digestion และจากทำการ In-gel digestion จะนำตัวอย่างที่ได้ ไปทำการวิเคราะห์ด้วย ESI-Q-ToF mass spectrometer (Korea Basic Science Institute, Systems Biology Core Facility, Korea)



รูปที่ 10 SDS-PAGE ของส่วนแยกที่ได้จากโครงการที่ 2

(1) ส่วนแยก 1.2.1; (2) ส่วนแยก 1.2.2; (3) ส่วนแยก 1.2.3; (4) ส่วนแยก 1.2.4

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของส่วนแยก 1.2.2 และ 1.2.3 พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนนาทรินและโอฟรานิน ซึ่งแสดงลำดับกรดอะมิโนของส่วนแยก 1.2.2 และ 1.2.3 ดังต่อไปนี้ โดยอักษรตัวหนาแสดงลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกัน

ส่วนแยก 1.2.2 กับ Chain C, Crystal Structure of Natrin ในพิษงูเห่า (Naja Atra) Score: 65
เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อถูกเหนี่ยวนำจาก carbachol

```
Natrin:      N----- RKKKQKEIVD20 LHNSLRRRVS30 PTASNMLKME40
Fraction1.2.2: ----- -----EIVD  LHNSLR----- -----ME
Natrin:      WYPEAASNAE53 RWANTCSLNH60 ----- I121
Fraction1.2.2: WYPEAASNAE  R
```

ส่วนแยก 1.2.3 กับ โอฟานิน (Ophanin) ในพิษงูจงอาง Score: 73
เป็นโปรตีนที่ปิดกั้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโทแทสเจียม

```
Ophanin:     MIAFTLLSLA10 ----- ASNMLKMQWY60
Fraction 1.2.3: ----- -----MQWY
Ophanin:     PEAASNAERW70 ----- SCFCHNKII239
Fraction 1.2.3: PEAASNAER
```

ส่วนแยก 1.2.3 กับ Chain C, Crystal Structure of Natrin ในพิษงูเห่า (Naja Atra) Score: 72

```
Natrin:      NVDFNSESTR10 ----- PASCFCRNKI I121
Fraction 1.2.3: NVDFNSESTR
```

สรุปผลและแนะนำการวิจัย

ในการวิจัยศึกษาหารูปแบบโปรตีนในพิษงูจงอางที่มาจากถิ่นกำเนิดแตกต่างกัน 3 ตัวอย่าง จากการหาปริมาณโปรตีนในพิษงู 3 ตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกันประมาณ 40% ของน้ำหนักแห้ง ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่ำกว่า 50% (IC₅₀) พบว่าพิษงู KV2 มีความเป็นพิษสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบโปรตีน ซึ่งพบว่ารูปแบบโปรตีนที่ได้จากการแยกโปรตีนทั้ง 3 วิธี คือ วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสภาพเสีย อิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสองทิศทาง และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส KV2 มีรูปแบบที่แตกต่างจากพิษงู KV6 และ KV9 ที่มีความคล้ายคลึงกันมากกว่า โดยในการแยกโปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสภาพเสีย พิษงู KV2 จะมีแถบโปรตีนที่เข้มกว่าตัวอย่างอื่น และแถบโปรตีนที่ได้จากวิธีนี้ไม่แยกจากกันอย่างชัดเจน ทำให้นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนต่อไปไม่ได้ จึงใช้เทคนิคอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสองทิศทางมาแยกต่อ พบว่าพิษงู KV2 มีจุดโปรตีนอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลที่ต่ำอยู่มากกว่า และจากการนำจุดโปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์ต่อ พบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนโอฟานินและกลุ่มฟอสโฟไลเปส ส่วนผลที่ได้จากเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส พิษงู 3 ตัวอย่างจะมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน แต่พิษงู KV2 จะมีปริมาณโปรตีนในส่วนแยกที่ 2, 5 และ 6 ที่สูงกว่า โดยความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากัน จากผลทั้งหมดพบว่าความแปรผันของถิ่นกำเนิดและสายพันธุ์ดั้งเดิม มีผลต่อองค์ประกอบโปรตีนในพิษงูแต่ละตัวอย่าง

การพิสูจน์เอกลักษณ์ส่วนแยก 1.2.2 และ 1.2.3 ที่แยกได้จากโครงการที่ 2 พบว่า ส่วนแยก 1.2.2 มีลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับบางส่วนของโปรตีนนาทริน (Natrin) ที่พบในพิษงูเห่า มีความสามารถในการยับยั้งการส่งสารสื่อประสาทเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร Carbachol และ ส่วนแยก 1.2.3 ลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับบางส่วนของโปรตีนโอฟานิน (Ophanin) จาก พิษงูจงอาง และนาทริน จากพิษงูเห่า

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีนในพิษงูด้วยวิธีทางอิเล็กโตรฟอเรซิส จะมีปัญหาในโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก เนื่องจากในพิษงูสารพิษส่วนมากจะมีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก ควรที่จะใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลว ยิ่งกว่านั้นควรที่ใช้เทคนิคในการพิสูจน์เอกลักษณ์ที่แม่นยำมากขึ้น เช่น LC-MS/MS มาใช้ในการยืนยันลำดับกรดอะมิโน การศึกษาความแตกต่างของรูปแบบและลักษณะเฉพาะของโปรตีนของพิษงูที่สายพันธุ์ดั้งเดิมที่แตกต่างกัน แม้จะเป็นชนิดเดียวกัน จะมีความสำคัญต่อการพัฒนาเซรุ่มที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น และสามารถพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคต่อไปได้

REFERENCES

- [1] Chippaux, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation *WHO* 76 (1998): 515-524.
- [2] มุกดา ตฤณณานันท์ , สัตว์มีพิษและการรักษาสัตว์, หน้า11-13, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหิดล ,2538
- [3] ชาญ โพนนุกูต ,พิษจากพิษ สัตว์ และงูชนิด , หน้า21-31, โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ,2531
- [4] ไพบุลย์ จินตกุล,งูพิษในประเทศไทย,หน้า31-42,109-114,พิมพ์ครั้งที่ 2,กรุงเทพมหานคร ,2543
- [5] แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม , Principle and Techniques of Instrumental Analysis, หน้า 632-713, กรุงเทพมหานคร,2534
- [6] Marsh, N.; and Williams, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* 45 (2005): 1171-1181.
- [7] Giora, Z. F., and Stern, D., The Coagulation Factor Lottery : Is the Winning Number? An Essay on Future Oral Anticoagulants Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies ,2005,2, pp 279-283.
- [8] Salem, N. C. Snake venom reveals clues about heart drug, *Sciencedaily* 18, 2004.
- [9] Matthew R. R., and Francis S. M. J., Differentials Regulation of Tyrosine Phosphorylation in Tumor Cells by Contortrostatin, a Homodimeric Disintegrin, and Monomeric Disintegrins Echistatin and Avoridin, *Toxicon* ,2001,39 ,pp 283-289.

- [10] Michael, A. N., Juris, J. M., Glucagon-like Peptide and its Derivatives in the Treatment of Diabetes, *Regulatory Peptides*, 2005, 128, pp 135– 148.
- [11] Joubert, F. J. The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom. *Biochim. biophys. Acta* 317 (1973): 85-98.
- [12] Lin, N. Q.; Zhang, Y. S.; Mu, J. F.; Wang, W. Y.; Yang, C. J.; and Xiong, Y. L. Amino-acid sequence of the neurotoxin (CM-9) from the snake venom of Quangxi king cobra. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* 16 (1984): 592-596.
- [13] Chang, C. C.; Huang, T. Y.; Kuo, K. W.; Chen, S. W.; Huang, K. F.; and Chiou, S.H. Sequence characterisation of a novel α -neurotoxin from the king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 191 (1993): 214-223.
- [14] Song, J.; Chung, M. C. M.; Xiong, Y.; Wang, W.; and Pu, X. Purification sequence and pharmacological studies of a new alpha-neurotoxin from *Ophiophagus hannah* venom. *Toxicon* 32 (1994): 537-538.
- [15] Lin, S. R.; Leu, L. F.; Chang, L. S.; and Chang, C. C. Amino acid sequence and chemical modification of a novel alpha-neurotoxin (Oh-5) from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *J. Biochem.* 121 (1997): 690-695.
- [16] Lin, S. R.; Chang, L. S.; and Chang, C. C. Disulfide isomers of alpha-neurotoxins from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 254 (1999): 104-108.
- [17] He, Y. Y.; Lee, W. H.; and Zhang, Y. Cloning and purification of α -neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon* 44 (2004): 295-303.

- [18] Li, J.; Zhang, H.; Liu, J.; and Xu, K. Novel genes encoding six kinds of three finger toxins in *Ophiophagus hannah* (king cobra) and function characterization of two recombinant long-chain neurotoxins. *Biochem. J.* 398 (2006): 233-242.
- [19] Rajagopalan, N.; Pung, Y. F.; Zhu, Y.Z.; Wong, P. T. H.; Kumar, P. P.; and Kini, R. M. Beta-cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with beta-blocker activity. *FASEB J.* 21 (2007): 3685-3695.
- [20] Chang, L. S.; Liou, J. C.; Lin, S. R.; and Huang, H. B. Purification and characterization of a neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hannah*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 294 (2002): 574-578.
- [21] Joubert, F. J. Snake venoms. The amino-acid sequence of polypeptide DE-1 from *Ophiophagus hannah* (King cobra) venom. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 358 (1977): 565-574.
- [22] Huang, M. Z.; Gopalakrishnakone, P.; Chung, M. C. M.; and Kini, R. M. Complete amino acid sequence of an acidic, cardiotoxic phospholipase A2 from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra): a novel cobra venom enzyme with 'pancreatic loop'. *Arch. Biochem. Biophys.* 338 (1997): 150-156.
- [23] Lee, W.; and Zhang, Y. Molecular cloning and sequence analysis of a phospholipase A2 from king cobra (*Ophiophagus hannah*). Submitted (AUG-2000) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- [24] Wang, Q.Y.; and Shu, Y. Y. Cloning and characterization of cDNAs encoding two acidic isoforms of phospholipase A2 in Guangxi King Cobra (*Ophiophagus hannah*). Submitted (SEP-2000) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

- [25] Yamazaki, Y.; Hyodo, F.; and Morita, T. Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Arch. Biochem. Biophys* 412 (2003): 133-141.
- [26] Chang, L. S.; Chung, C.; Huang, H. B.; and Lin, S. R. Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 283 (2001): 862-867.
- [27] Ahn, M. Y.; Lee, B. M.; and Kim, Y. S. Characterization and cytotoxicity of L amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1997): 911-919.
- [28] Pung, Y. F.; Wong, P. T. H.; Kumar, P. P., Hodgson, W. C.; and Kini, R. M. Ohanin a novel protein from king cobra venom induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice. *J. Biol. Chem.* 280 (2005): 13137-13147.
- [29] Berkelman, T., and Stenstedt, T. *2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients: Principle and Methods*. Sweden: Amersham Biosciences AB, 1998.
- [30] Nawarak, J.; Sinchakul, S.; Wu, C.-Y.; Liao, M. Y.; Phutrakul, S.; and Chen, S. T. Proteomics of snake venoms from elapidae and viperidae families by Multidimensional Chromatographic Methods. *Electrophoresis* 40 (2003): 455-461.
- [31] Swiss-Prot and TrEMBL database (<http://br.expasy.org/cgi-bin/sprot-search.de?ophiophagus%20hannah>)
- [32] <http://www.matrixscience.com>
- [33] Xu, S.; Gu, L.; Wang, Q.; Shu, Y.; Song, S.; and Lin, Z. Structure of a king cobra phospholipase A2 determined from a hemihedrally twinned crystal. *Acta Crystallographica, Section D, Biological Crystallography* 59 (2003): 1574-1581.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสภาพเสีย

I. *Stock Solutions*

A. 2 M Tris-HCl (pH 8.8), 100 ml

	Final concentration	Amount
Tris-base	2 M	24.2 g
Distilled water		50 ml
HCl		adjust to pH 8.8
Distilled water		to 100 ml

B. 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 100 mL

	Final concentration	Amount
Tris-base	1 M	12.1 g
Distilled water		50 ml
HCl		adjust to pH 6.8
Distilled water		to 100 ml

C. 10% SDS (w/v), 100 mL

	Final concentration	Amount
SDS	10% (w/v)	10 g
Distilled water		to 100 ml

D. 50% glycerol (v/v), 100 ml

	Final concentration	Amount
100% glycerol	50% (v/v)	50 ml
Distilled water		to 50 ml

E. 1% bromophenol blue (w/v), 10 ml

	Final concentration	Amount
Bromophenol blue	1% (w/v)	100 mg
Distilled water		to 10 ml

II. Working Solutions

A. Solution A (acrylamide stock solution)

(30% acrylamide, 0.8% N, N'-methylenebisacrylamide)

	Final concentration	Amount
Acrylamide	30% (w/v)	29.2 g
N, N'-methylenebisacrylamide	0.8% (w/v)	0.8 g
Distilled water		to 100 ml

B. Solution B (4x separating gel buffer)

(2 M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS)

	Final concentration	Amount
2 M Tris-HCl (see stock solution A)	1.5 M	75 ml
10% SDS (see stock solution C)	0.4% (v/v)	4 ml
Distilled water		to 100 ml

C. Solution C (4x stacking gel buffer)

(1 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS)

	Final concentration	Amount
1 M Tris-HCl (see stock solution B)	0.5 M	50 ml
10% SDS (see stock solution C)	0.4% (v/v)	4 ml
Distilled water		to 100 ml

D. 10% Ammonium persulfate

	Final concentration	Amount
Ammonium persulfate	10%	0.5 g
Distilled water		to 5 ml

E. Electrophoresis buffer

	Final concentration	Amount
Tris-base	25 mM	3 g
Glycine	192 mM	14.4 g
SDS	0.1% (w/v)	1 g
Distilled water		to 1000 ml

F. 5x Sample buffer

(1 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol)

	Final concentration	Amount
1 M Tris-HCl (see stock solution B)	60 mM	0.6 ml
50% glycerol (see stock solution D)	25% (v/v)	5 ml
10% SDS (see stock solution C)	2% (v/v)	2 ml
2-mercaptoethanol	14.4 mM	0.5 ml
Distilled water		to 10 ml

III. Coomassie gel stain

	Amount
Coomassie blue R-250	1.0 g
Methanol	450 ml
Glacial acetic acid	100 ml
Distilled water	450 ml

IV. Coomassie gel destain

	Amount
Methanol	100 ml
Glacial acetic acid	100 ml
Distilled water	800 ml

V. Gel preparation

	Separating gel (10 ml)	Stacking gel (4 ml)
Solution A	5.0 ml	0.67 ml
Solution B	2.5 ml	-
Solution C	-	1.0 ml
10% Ammonium persulfate	50 μ l	30 μ l
TEMED	5.0 μ l	5.0 μ l
Distilled water	2.5 ml	2.3 ml

ภาคผนวก ข

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบสองทิศทาง

I. Stock Solutions

A. Lysis solution

(8M urea, 4% CHAPS, 2% Pharmalyte 3-10)

	Final concentration	Amount
Urea (FW 60.06)	8 M	19.2 g
CHAPS [†]	4% (w/v)	1.6 g
Pharmalyte 3-10	2%	800 μ l
Double distilled H ₂ O		to 40 ml

B. Rehydration stock solution without IPG buffer*

(8M urea, 2% CHAPS, 0.002% bromophenol blue)

	Final concentration	Amount
Urea (FW 60.06)	8 M	12 g
CHAPS	2% (w/v)	0.5 g
bromophenol blue	0.002%	50 μ l
Double distilled H ₂ O		to 25 ml

Bromophenol blue stock solution

	Final concentration	Amount
bromophenol blue	1%	100 mg
Tris-base	50 mM	60 mg
Double distilled H ₂ O		to 10 ml

C. Rehydration stock solution with IPG Buffer*(8M urea, 2% CHAPS, 0.5% or 2% IPG buffer, 0.002% bromophenol blue)*

	Final concentration	Amount
Urea (FW 60.06)	8 M	12 g
CHAPS	2% (w/v)	0.5 g
IPG Buffer or Pharmalyte	0.5% (v/v) or 2% (v/v)	125 μ l or 500 μ l
bromophenol blue	0.002%	50 μ l
Double distilled H ₂ O		to 25 ml

D. SDS equilibration buffer**(50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue)*

	Final concentration	Amount
Tris-HCl, pH 8.8	50 mM	10.0 ml
Urea (FW 60.06)	6 M	72.07 g
Glycerol (87% v/v)	30% (v/v)	69 ml
SDS (FW 288.38)	2% (w/v)	4.0 g
bromophenol blue	0.002% (w/v)	400 μ l of 1% solution
Double distilled H ₂ O		to 200 ml

E. 30% T, 2.6% C monomer stock solution*(30% acrylamide, 0.8% N,N'-methylenebisacrylamide)*

	Final concentration	Amount
Acrylamide	50 mM	10.0 ml
N,N'-methylenebisacrylamide (FW 154.17)	6 M	72.07 g
Double distilled H ₂ O		to 200 ml

F. 4x resolving gel buffer*(1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)*

	Final concentration	Amount
Tris base (FW 121.1)	1.5 M	181.7 g
Double distilled H ₂ O		750 ml
HCl (FW 36.46)		adjust to pH 8.8
Double distilled H ₂ O		to 1 l

G. 10% SDS

	Final concentration	Amount
SDS (FW 288.38)	10% (w/v)	5.0 g
Double distilled H ₂ O		to 50 ml

H. 10% ammonium persulfate

	Final concentration	Amount
ammonium persulfate (FW 288.20)	10% (w/v)	0.1 g
Double distilled H ₂ O		to 1 ml

I. Gel storage solution*(0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS)*

	Final concentration	Amount
4x Resolving gel buffer (see solution F)	1x	50 ml
10% SDS	0.1%	2 ml
Double distilled H ₂ O		to 200 ml

J. SDS electrophoresis buffer*(25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS)*

	Final concentration	Amount
Tris-base (FW 121.1)	25 mM	30.3 g
Glycine (FW 75.07)	192 mM	144.0 g
SDS (FW 288.38)	0.1% (w/v)	10.0 g
Double distilled H ₂ O		to 10 l

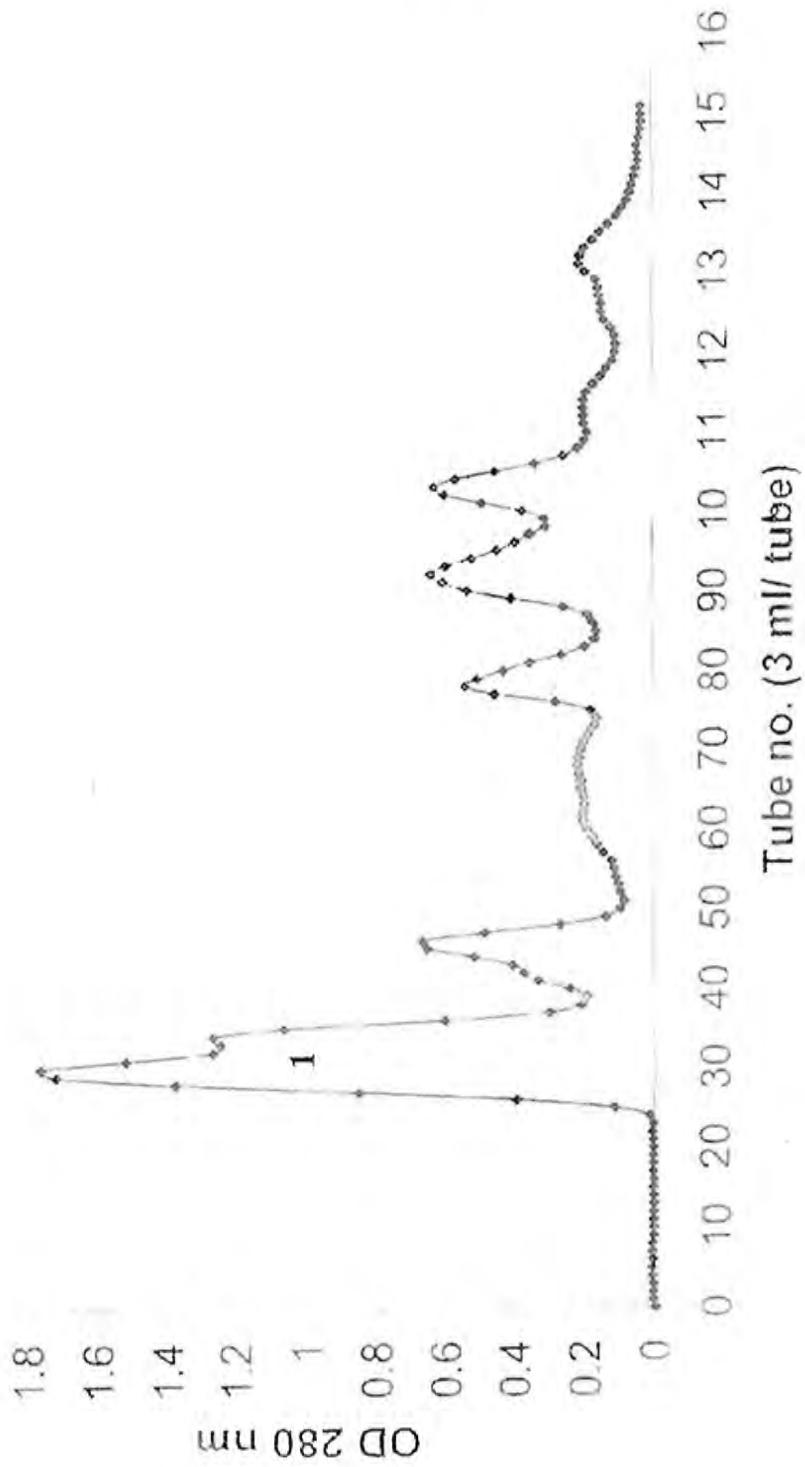
K. Agarose sealing solution

	Final concentration	Amount
SDS electrophoresis buffer		100 ml
Agarose	0.5 %	0.5 g
Bromophenol blue	0.002% (w/v)	200 μ l

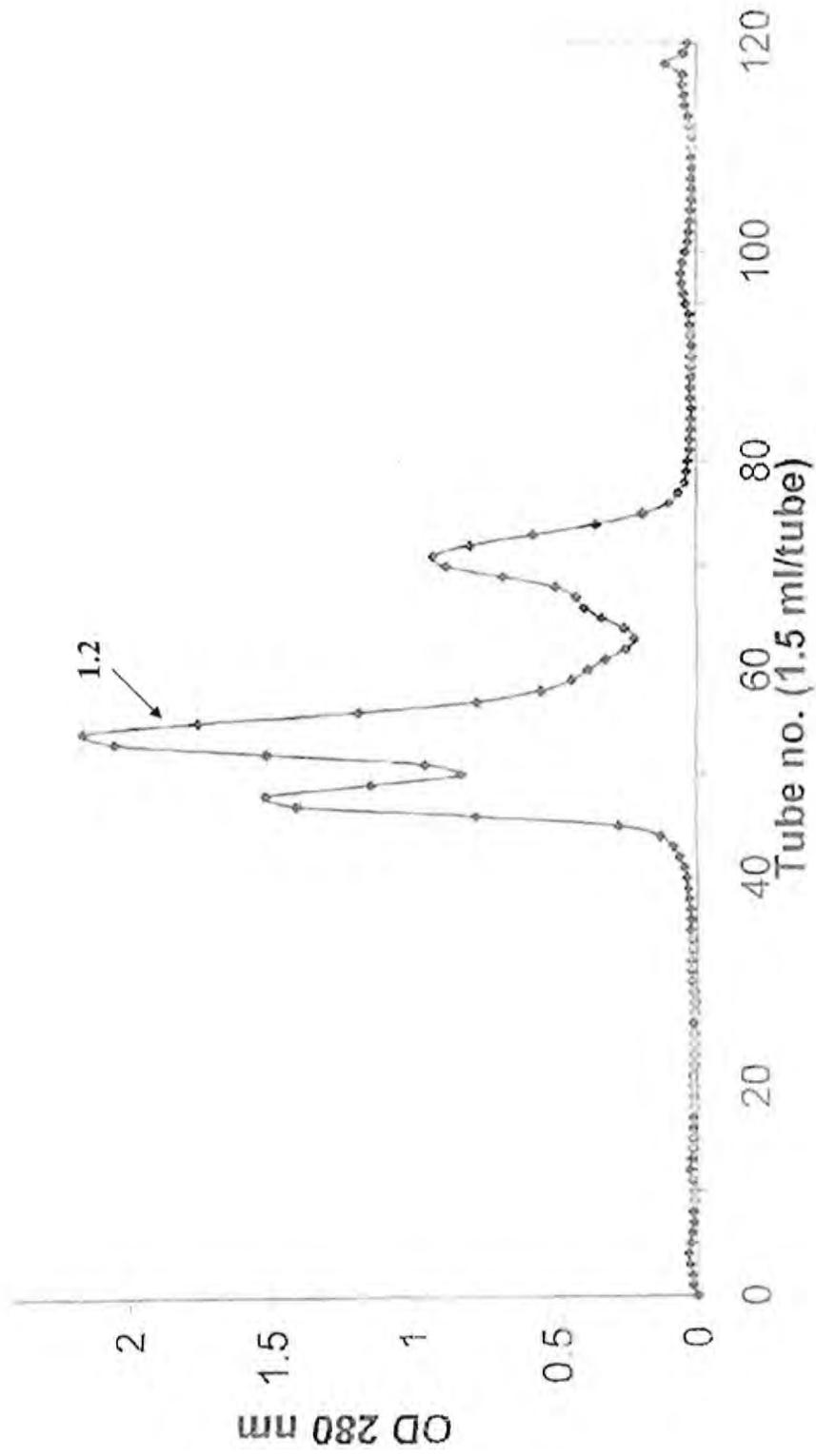
II. Gel preparation

Final Gel Concentration	15%
Monomer solution (solution E)	50 ml
4x resolving gel buffer (solution F)	25 ml
10% SDS (Solution G)	1 ml
Double distilled water	23.5 ml
10% ammonium persulfate* (solution H)	500 μ l
TEMED*	33 μ l
Total volume	100 ml

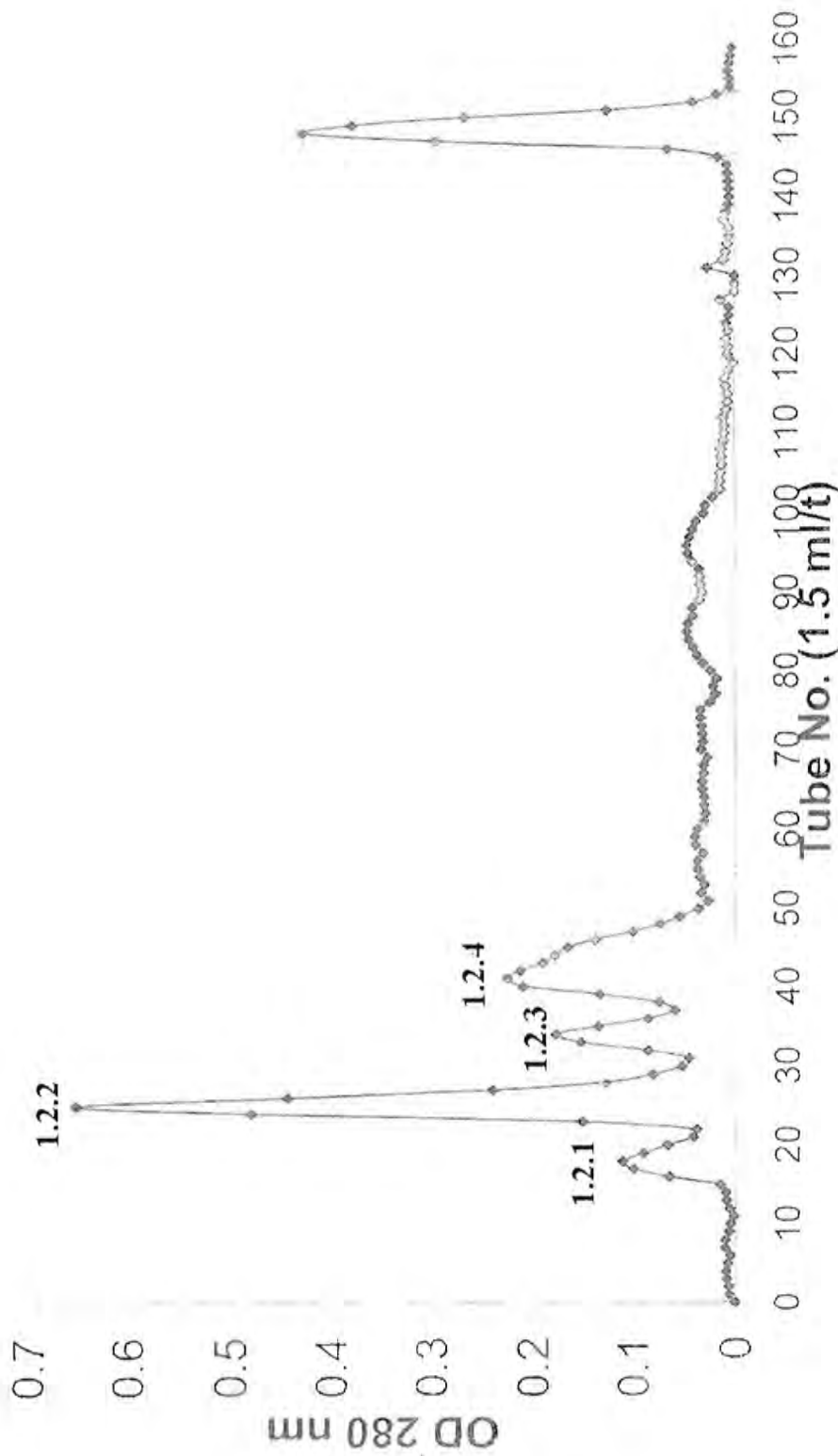
ภาคผนวก ค



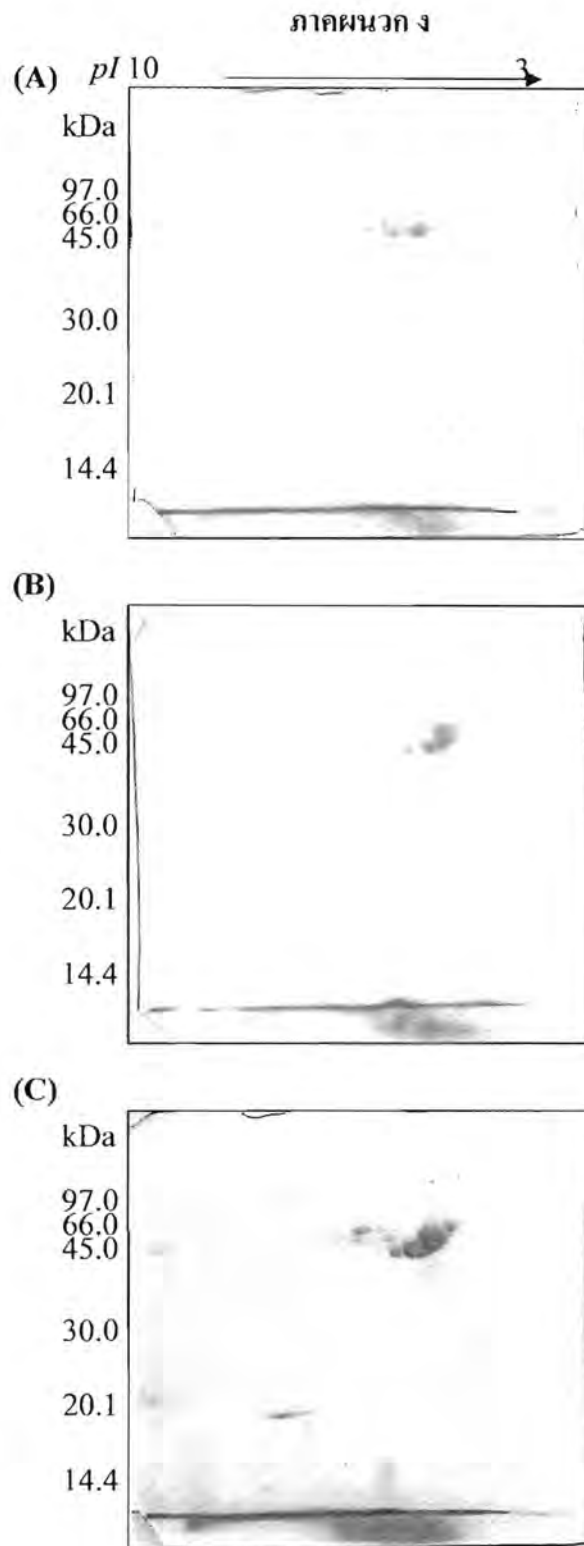
ภาพที่ 1ค. โครมาโตแกรมของการแยกพืง KV2 ด้วยเทคนิค Ion exchange chromatogram



ภาพที่ 2ค. โครมาโตแกรมของการแยกส่วนแยก 1 ด้วยเทคนิค Gel filtration



ภาพที่ 3ค. โครมาโตแกรมของการแยกส่วนแยก 1.2 ด้วยเทคนิค Ion exchange chromatogram



รูปที่ 1ง. 2-DE gel ของพิษงูจงอาง 3 ตัวอย่างที่ใช้แผ่น IPG strip ที่มี pH 3-10

(A): KV2, (B): KV6 และ (C): KV9

ประวัติผู้วิจัย

ผู้วิจัย	นาย พลกฤษณ์ แสงวณิช
คุณวุฒิ	วท.บ. (เคมี), วท.ม. (ปิโตรเคมี), คุยฎีบัณฑิต (เคมีอินทรีย์)
ตำแหน่ง	รองศาสตราจารย์
สถานที่ทำงาน	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์	02-2184954
โทรสาร	02-2530321
E-mail	spolkit@chula.ac.th
ผู้ช่วยวิจัย	นางสาวศกามาศ วงศ์เคย์
คุณวุฒิ	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ), วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

โครงการที่ 4

การศึกษาเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของ
สารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลาย
ประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานประมาณ ที่พิจารณาอนุมัติทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2549 ปี พ.ศ. 2550 และปี พ.ศ.25451

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะแพทยศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยของคณะผู้วิจัยในสังกัด คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่เลี้ยงสุนัขที่ใช้ในการทดลอง และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิ และที่ปรึกษาแผนงานวิจัย ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงข้อเสนอโครงการวิจัย และการดำเนินงานวิจัย

บทคัดย่อ

การศึกษาเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

พิษงูเป็นแหล่งที่มาของยาบางชนิด งูจงอางเป็นงูพิษขนาดใหญ่ มีน้ำพิษปริมาณมาก ซึ่งมีพิษต่อระบบประสาท คณะผู้วิจัยได้แยกส่วนที่มีพิษยับยั้งปลายประสาทของกล้ามเนื้อกระบังลมหนูเม้าส์ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบประสาทและกล้ามเนื้อที่มีอาการเกร็ง ในขั้นตอนการพัฒนาจะต้องศึกษาฤทธิ์อื่นๆ ทางเภสัชวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลด้านความปลอดภัยก่อนจะนำไปศึกษาในมนุษย์

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความปลอดภัยของสารที่จะพัฒนาเป็นยา

วิธีการศึกษา การศึกษาในตัวสัตว์ทดลอง ได้แก่ การศึกษาในสุนัขที่วางยาสลบ การศึกษาฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง การทรงตัว และฤทธิ์ต่อการบีบตัวของลำไส้ในหนูเม้าส์ การศึกษานอกตัวสัตว์ทดลอง ได้แก่ การศึกษาฤทธิ์ต่ออวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่แยกจากกายหนูแรท ประกอบด้วย หัวใจ หลอดเลือด หลอดลม ลำไส้เล็กส่วนปลาย

ผลการศึกษา ผลการศึกษาในสุนัขพบว่า crude venom ขนาด 0.05-0.1 mg/Kg และ F1.2.2 ขนาด 6-18 µg/kg มีผลลดความดันโลหิต ลดการทำหน้าที่ของไต (GFR, RPF) ลด urine flow crude venom ในขนาด 0.2 mg/Kg และ F1.2.2 ขนาด 54 µg/kg ทำให้สุนัขตาย F1.2.2 ในขนาด 0.1-0.4 LD50 ไม่มีผลต่อ motor coordination แต่ลดระยะเวลาการหลับ (righting reflex) ลดการบีบตัวของลำไส้เล็ก แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาในเนื้อเยื่อที่แยกออกจากกาย F1.2.2 ในความเข้มข้น 4.4 mcg/ml ไม่ยับยั้งฤทธิ์ของ agonists ได้แก่ acetylcholine, Epinephrine, Norepinephrine ในเนื้อเยื่อทุกชนิด

สรุปผลการศึกษา F1.2.2 มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีความปลอดภัย และอาจนำไปใช้ทางยาได้

คำสำคัญ : KING COBRA, *OPHIOPHAGUS HANNAH*, PHARMACOLOGICAL EFFECT

ABSTRACT

PHARMACOLOGICAL STUDIES OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING COBRA

Snake venom is a source of some drugs. King Cobra is a large poisonous snake providing a large amount of neurotoxic venom. Our group of investigators have fractionated the venom to obtain the fraction F1.2.2 possessing neuromuscular blocking action on the isolated mouse's phrenic nerve diaphragm aiming at developing a therapeutic agent for muscle spasm. In the process of drug development, the pharmacological studies is necessary to obtain the safety data before conducting the clinical study. The objectives of this study included testing of the pharmacological effects of F1.2.2 in the *in vivo* and *in vitro* models in order to obtain the safety informations of the F1.2.2. The *in vivo* studies included studying the pharmacological effects of F1.2.2 in anesthetized dogs, the effect on central nervous system and motor coordination in mice. The *in vitro* studies included studying the effects of F1.2.2 in isolated organs or tissues from rats e.g. heart, blood vessel, trachea, ileum. The results showed that the crude venom (0.05-0.1 mg/Kg) as well as the F1.2.2 (6-18 $\mu\text{g}/\text{kg}$) decreased the blood pressure, renal functions, including glomerular filtration rate, renal plasma flow and urine flow rate. The crude venom given at 0.2 mg/Kg and F1.2.2 at 54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ caused death to dogs. The F1.2.2 (0.1-0.4 LD₅₀) did not affect the motor coordination but decreased the righting reflex and intestinal movement (not significant) The F1.2.2 at concentration of 4.4 mcg/ml did not inhibit the effects of the effects of agonists, including acetylcholine, epinephrine, and norepinephrine. In conclusion, the F1.2.2 which has the neuromuscular blocking action is safe for further development.

บทคัดย่อ

การศึกษาพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

พิษงูเป็นแหล่งที่มาของยาบางชนิด งูจงอางเป็นงูพิษขนาดใหญ่ มีน้ำพิษปริมาณมาก ซึ่งมีพิษต่อระบบประสาท คณะผู้วิจัยได้แยกส่วนที่มีพิษยับยั้งปลายประสาทของกล้ามเนื้อกระบังลมหนูเม้าส์ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบประสาทและกล้ามเนื้อที่มีอาการเกร็ง ในขั้นตอนการพัฒนาจะต้องศึกษาพิษวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลด้านความปลอดภัยก่อนจะนำไปศึกษาในมนุษย์

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความเป็นพิษของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพิษงูจงอางซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต่ออวัยวะสำคัญภายในร่างกาย แบบให้ F1.2.2 ขนาดเดียว และให้ F1.2.2 ซ้ำๆหลายครั้ง และศึกษาการก่อกลายพันธุ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความปลอดภัยของ F1.2.2 ที่จะพัฒนาเป็นยาต่อไป

วิธีการศึกษา หาค่าความพิษในหนูเม้าส์ โดยฉีด F1.2.2 เข้าหลอดเลือดดำที่หางหนูเม้าส์ ศึกษาพิษวิทยาแบบให้ F1.2.2 ขนาดเดียว โดยฉีด F1.2.2 เข้ากล้ามเนื้อที่ขาหลังของหนูเม้าส์ ดูผล 14 วัน แล้วทำให้หนูตายด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 95%+ออกซิเจน 5% แยกอวัยวะ ได้แก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด ม้าม อัณฑะ หรือ รังไข่ เซอใน 10%ฟอร์มาลินเพื่อศึกษาพยาธิวิทยา ศึกษาพิษวิทยาแบบให้ F1.2.2 ซ้ำหลายขนาดครั้ง โดยฉีด F1.2.2 เข้ากล้ามเนื้อที่ขาหลังของหนูเม้าส์ วันละครั้งติดต่อกัน 28 วัน แล้วทำให้หนูตาย เก็บอวัยวะเช่นเดียวกัน

ผลการศึกษา ผลการศึกษาพบว่า F1.2.2 ในขนาด 0.1-0.4 LD₅₀ ที่ให้ครั้งเดียวไม่มีพิษต่ออวัยวะต่างๆ F1.2.2 ที่ฉีดให้หนูเม้าส์ในขนาด 2.6 µg, 3.6 µg, 5.0 µg, and 7.1 µg ที่ให้ติดต่อกัน 28 วัน แสดงความเป็นพิษต่อไต แต่ไม่มีพิษต่ออวัยวะอื่นๆ F1.2.2 ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

สรุปผลการศึกษา F1.2.2 ไม่มีพิษต่ออวัยวะส่วนใหญ่ ยกเว้น ไต และไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ จึงน่าจะนำไปพัฒนาโดยหาขนาดที่ไม่มีพิษต่ออวัยวะทุกแห่ง เพื่อนำไปใช้ทางยาได้

คำสำคัญ : KING COBRA, OPHIOPHAGUS HANNAH, TOXICOLOGICAL EFFECT, MUTAGENICITY

ABSTRACT

TOXICOLOGICAL STUDIES OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING COBRA

Snake venom is a source of some drugs. King Cobra is a large poisonous snake providing a large amount of neurotoxic venom. Our group of investigators have fractionated the venom to obtain the fraction F1.2.2 possessing neuromuscular blocking action on the isolated mouse's phrenic nerve diaphragm in order to develop a therapeutic agent for treatment of the muscle spasm. In the process of drug development, the toxicological studies is necessary to obtain the safety data before conducting the clinical study. The objectives of this study aimed at testing the lethality of the crude venom and the F1.2.2, single-dose and repeated-dose toxicities of F1.2.2 in mice as well as the mutagenicity testing. The crude venom or the F1.2.2 was intravenously injected to mice and calculate the lethal doses of crude venom or F1.2.2. The single dose of F1.2.2 was intramuscularly injected into the hind leg of mouse, observed the effects for 14 days then euthanized the mice and dissected various organs, including liver, kidneys, heart, lung, spleen, testes or ovaries, preserved in 10% formalin for pathological studies. The F1.2.2 was intramuscularly injected into the hind leg of mouse once daily for 28 consecutive days, then euthanized the mice and dissected various organs preserved in 10% formalin for pathological studies. The results showed that the crude venom has a LD₅₀ of 28.36 µg/mouse whereas the LD₅₀ of F1.2.2 was 4.8 µg/mouse. A single dose of F1.2.2 at 0.1-0.4 LD₅₀ did not show any toxicities to vital organs examined. The repeated dose of F1.2.2 at 2.6 µg, 3.6 µg, 5.0 µg, and 7.1 µg given 28 days consecutively did not showed the toxic effects to all vital organs except for the kidneys. The F1.2.2 was not mutagenic. In conclusion, the F1.2.2 which has the neuromuscular blocking action is safe for further development.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย (เภสัชวิทยา)	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (เภสัชวิทยา)	ค
บทคัดย่อภาษาไทย (พิษวิทยา)	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (พิษวิทยา)	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
โครงการวิจัย	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การทบทวนวรรณกรรม	2
วัสดุ และวิธีการศึกษา	4
ผลการวิจัย	14
อภิปราย	43
สรุปผลและข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	
สารบัญภาพการตรวจเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา	
ภาพการตรวจเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา	1-25

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ต่อความดันเลือดแดงในสุนัข	14
2	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ต่ออัตราการเต้นของหัวใจในสุนัข	14
3	ผลของพิษงูจงอาง (crude venom) ต่ออัตราการกรองที่ไต (GFR) ในสุนัข	14
4	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการกรองที่ไต (GFR) ในสุนัข	17
5	ผลของพิษงูจงอาง (Crude venom) ต่ออัตราการไหลของพลาสมาที่ไต (renal plasma flow, RPF) ในสุนัข	16
6	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการไหลของพลาสมาที่ไต (renal plasma flow, RPF) ในสุนัข	17
7	ผลของพิษงูจงอาง (crude venom) ต่ออัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate, UF) ในสุนัข	18
8	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate, UF) ในสุนัข	19
9	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ในการเสริมฤทธิ์กดประสาทส่วนกลางของ pentobarbital sodium	20
10	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ต่ออัตราการเต้นของ isolated right auricle ของหนูแรท ที่ให้ตัวกระตุ้น epinephrine	21
11	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ต่อแรงบีบตัวของ isolated right auric a ของหนูแรท ที่ให้ตัวกระตุ้น epinephrine	22
12	เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated aorta ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น norepinephrine ที่มีและไม่มี KVV F1.2.2	23
13	เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated aorta ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น noepinephrine	24
14	เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated trachea ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น Acetylcholine	25
15	เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated trachea ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น Acetylcholine ที่มีและไม่มี KVV F1.2.2	26
16	ผลของ KVV F1.2.2 ต่อการบีบตัวของลำไส้ในหนูเม้าส์ (in vivo study)	27
17	การตอบสนองของ isolated ileum ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น acetylcholine	28
18	เปรียบเทียบการตอบสนองของ isolated ileum ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น	29

	acetylcholine เมื่อมีและไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2	
19	ผลการหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจงอาง (crude venom)	30
20	Preliminary test KV 1 ถึง KV 7	31
21	เจือจางพิษพีคที่ 1 (KV 1) ที่ความเข้มข้นระหว่างการเจือจางที่ 1:2 และ 1:4 โดยมี dilution factor เท่ากับ 1.4	31
22	Preliminary test ถัดพิษแต่ละพีค 3-4 ความเข้มข้น	32
23	เจือจางพิษ fraction KV 1.2 ที่ความเข้มข้นระหว่างการเจือจางที่ 1:4 และ 1:8 โดยมี dilution factor เท่ากับ 1.4	32
24	Preliminary test KV 1.2 ในหนูเม้าส์	33
25	การหาค่าความเป็นพิษของส่วนพิษงูจงอาง KV 1.2.1 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose	33
26	การหาค่าความเป็นพิษของส่วนพิษงูจงอาง KV 1.2.2 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose	34
27	การหาค่าความเป็นพิษของส่วนพิษงูจงอาง KV 1.2.3 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose	34
28	การหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจงอาง KV 1.2.4 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose	35
29	ผลของพิษงูจงอาง F1.2.2 ที่ให้ติดต่อกัน 28 วัน (subacute toxicity) ในหนูเม้าส์ต่อเม็ดเลือด	37
30	ผลของพิษงูจงอาง F1.2.2 ที่ให้ติดต่อกัน 28 วัน (subacute toxicity) ในหนูเม้าส์ต่อเม็ดเลือด	37
31	จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของส่วนของพิษงูจงอาง KV 1.2.2	39
32	จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของส่วนของพิษงูจงอาง KV 5	39
33	จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารมาตรฐาน 2-AA	41
34	จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารมาตรฐาน AF-2	41
35	จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารมาตรฐาน 4-NQO	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะของ Organ bath ที่ใช้ในการทดลองในเนื้อเยื่อที่แยกจากกายสัตว์ทดลอง (in vitro)	4
2	อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาผลของสารทดสอบใน isolated tissue	5
3	เครื่องมือสำหรับทำการทดสอบการเคลื่อนไหวและการทรงตัวของหนูเม้าส์ (Rotarod Test)	7
4	ผลของพิษงูจงอาง (crude venom) ต่ออัตราการกรองที่ไต (GFR) ในสุนัข	15
5	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการกรองที่ไต (GFR) ในสุนัข	
6	ผลของพิษงูจงอาง (crude venom) ต่ออัตราการไหลของพลาสมาที่ไต	16
7	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการไหลของพลาสมาที่ไต (renal plasma flow, RPF) ในสุนัข	17
8	ผลของพิษงูจงอาง (crude venom) ต่ออัตราการไหลของปัสสาวะ (renal plasma flow, RPF) ในสุนัข	18
9	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate, UF) ในสุนัข	19
10	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ในการเสริมฤทธิ์กดประสาทส่วนกลางของ pentobarbital sodium ในหนูเม้าส์	20
11	เปรียบเทียบอัตราการเต้นของ isolated right auricle ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น epinephrine	21
12	เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated right auricle ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น epinephrine เมื่อมีและไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2	22
13	เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated aorta ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น norepinephrine	23
14	เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated aorta ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น norepinephrine เมื่อมีและไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2	24
15	เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated trachea ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น Acetylcholine	25
16	เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated trachea ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น Acetylcholine เมื่อมีและไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2	26
17	ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ต่อการบีบตัวของลำไส้ในหนูเม้าส์ (in vivo study)	27

18	การตอบสนองของ isolated ileum ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น acetylcholine	27
19	เปรียบเทียบการตอบสนองของ isolated ileum ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น acetylcholine เมื่อมีและไม่มีส่วนของพิงูจาง F1.2.2	29
20	กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ก่อนการคลายพันธุ์ของส่วนของพิงูจาง KV 1.2.2	40
21	กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ก่อนการคลายพันธุ์ของส่วนของพิงูจาง KV 5	40
22	กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ก่อนการคลายพันธุ์ของสารก่อนการคลายพันธุ์มาตรฐานชนิดต่าง ๆ	43

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ACh	Acetylcholine
BW	Body Weight
dl	Deciliter (100 ml)
EP	Epinephrine
F1.2.2	Fraction 1.2.2
g	gram
GFR	Glomerular Filtration Rate
IC50	Inhibition concentration 50
Kg	Kilogramme
KV	King Cobra Venom
LD50	Lethal Dose 50 (lethal dose 50)
M	Molar
mg/ml	milligram per milliliter
µg/ml	microgram per milliliter
µl	microlitre
min	minute
ml	milliliter
N	number
nm	nanometer
NE, Nep	Norepinephrine
NSS	Normal Saline (0.9% sodium chloride solution)
RBC	Red blood cell
RBF	Renal Blood Flow
RPF	Renal Plasma Flow
UF	Urine Flow Rate
WBC	White Blood Cell

โครงการที่ 4

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย)	การศึกษาเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
(ภาษาอังกฤษ)	PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING KOBRA (<i>OPIOPHAGUS HANNAH</i>)

คณะผู้วิจัย

1. ศ.เกียรติคุณ นพ.วิศิษฎ์ สิตปรีชา	ที่ปรึกษาแผนงานวิจัย
2. ศ.นส.พ. ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร	ที่ปรึกษาแผนงานวิจัย และผู้ร่วมวิจัย
3. รศ. โสภิต ธรรมอารี	หัวหน้าโครงการวิจัย
4. นางพรรณนิภา จุลสุคนธ์	ผู้ร่วมวิจัย
5. นางสาวจรีพร น้อยพรหม	ผู้ร่วมวิจัย
6. นางสาวอรวรรณ แซ่ไคว่	ผู้ร่วมวิจัย
7. แพทย์หญิงดวงเพ็ญ ธีระบัญชาศักดิ์	ผู้ร่วมวิจัย
8. นส.พ.ชาญณรงค์ มิตรมูลพิทักษ์	ผู้ร่วมวิจัย

บทนำ

พิษงูเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ มีทั้ง enzymatic protein และ non-enzymatic protein โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พวกสารพิษ (Toxins เช่น neurotoxins, cardiotoxin, myotoxin เป็นต้นโปรตีนต่างๆ ในพิษงูมีบทบาทด้านชีวเคมี และเภสัชวิทยาต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการหาอาหารของงู ซึ่งมีเป้าหมายที่เด่นๆ ของพิษงูได้แก่ cell membranes ; vascular wall, connective tissue component และ plasma proteins เป้าหมายของส่วนที่เป็นสารพิษส่วนใหญ่ได้แก่ receptor ที่จำเพาะ หรือ ion channels เช่น neurotoxin ของพิษงูเห่าไทย มี acetylcholine receptor ที่ fold ของเซลล์กล้ามเนื้อรอบๆ ปลายประสาท เป็นต้น จากคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพิษงูเป็นที่น่าสนใจของนักวิจัยหลายกลุ่มนำมาศึกษาเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนายาตัวใหม่ๆ ยาตัวแรกที่ประสบความสำเร็จโดยการพัฒนาจาก bradykinin potentiating peptides ซึ่งแยกจากพิษงู *Bothrops jararaca* คือ ACE inhibitor ; captopril² ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนายาจากพิษงูที่มีในประเทศไทย พิษงูที่น่าสนใจจะนำมาศึกษาคือ พิษงูจงอาง ด้วยเหตุผลที่ งูจงอางเป็นงูพิษขนาดใหญ่ที่สุด ปริมาณพิษมาก และทางสถานเสาวภา สามารถทำการเพาะเลี้ยงงูจงอาง

ได้ และการศึกษาเกี่ยวกับพิษงูจงอางในประเทศไทยมีไม่มาก องค์ประกอบที่สำคัญในพิษงูจงอางคือ neurotoxin แบบ post synaptic neurotoxin ซึ่ง target receptor คือ acetylcholine receptor นอกจากนี้ในพิษงูจงอางยังมีบทบาทออกฤทธิ์ต่อผนังหลอดเลือดแดงด้วย^{3,4} คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเหล่านี้ที่น่าสนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางยา การที่สนใจจะพัฒนายา จำเป็นต้องศึกษา ลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของวัตถุดิบ หรือวัตถุดิบเริ่มต้นเพื่อเป็นมาตรฐานไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการกำหนด คุณลักษณะเฉพาะ ของวัตถุดิบที่จะนำมาผลิตยาในอนาคต ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอาง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และพิษวิทยาของสารที่แยกได้จากพิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความปลอดภัยของสารที่จะพัฒนาเป็นยา

การทบทวนวรรณกรรม

Joubert และคณะ (1973)⁵ ได้ทำการแยก toxin 2 ชนิดจากพิษงูจงอางด้วยเทคนิค ion-exchange chromatography โดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ CM-cellulose ได้ส่วนประกอบย่อย 4 ส่วน ส่วนประกอบย่อยที่ 2 และ 3 ซึ่งมีความเป็นพิษสูงถูกนำไปแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการใช้เทคนิค gel filtration โดยใช้ Sephadex G-50 เป็นตัวกลางในการแยก ส่วนประกอบย่อยที่ 2 แยกได้ 4 ส่วนย่อย มี 1 ส่วนย่อยที่เป็น major toxin (toxin a) ส่วนประกอบย่อยที่ 3 แยกได้ 3 ส่วนย่อย และมี 1 ส่วนย่อยที่เป็น major toxin (toxin b) Toxin a และ b ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 7,800 ดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE มีค่าความเป็นพิษ (LD₅₀) เท่ากับ 0.3 และ 0.35 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ

Tan และคณะ⁶ ได้ทำการแยกพิษงูจงอางด้วยเทคนิค ion-exchange chromatography โดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel ได้ส่วนประกอบย่อย 6 ส่วน ทำการหา enzyme activity ในส่วนประกอบย่อยที่แยกได้ พบว่า ส่วนที่เป็น major lethal toxin อยู่ในส่วนประกอบย่อยที่ 1 ซึ่งมี activity ของ เอนไซม์ 5'-Nucleotidase, Phosphodiesterase

ในปี 1993 Chang และคณะ⁷ ได้ทำการแยก postsynaptic neurotoxin (α -neurotoxin) พิษงูจงอาง โดย SP-Sephadex C-25, Sephadex G-50, CM-52 และ RP-HPLC. neurotoxin ที่แยกได้เป็น basic polypeptide ที่มี pI 9.05 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 ตัว และ cysteine 10 ตัว Toxin ที่แยกได้มีความคล้ายคลึงกับ α -bungarotoxin ที่แยกได้จากพิษงูสามเหลี่ยมได้หวนถึง 60% และมีคุณสมบัติในการจับอย่างจำเพาะกับ nicotinic acetylcholine receptor ของปลาไหลไฟฟ้า (*Torpedo californica*)

ในปี 1999 Lin และคณะ⁸ ได้ทำการแยก neurotoxin 2 ชนิด (Oh-6A และ Oh-6B) จากพิษงูจงอาง โดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ SP-Sephadex C-25, CM-52 และ SynChropakRP-P. Neurotoxin ที่แยกได้ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 70 ตัว และ cysteine 10 ตัว 46-53% ของลำดับกรดอะมิโนใน neurotoxin นี้มีความคล้ายคลึงกับ Oh-4, Oh-5, Toxin a และ Toxin b จากพิษงูเดียวกัน

Chang และคณะ⁹ ได้แยก neurotoxin ชนิดใหม่ ซึ่งมีโครงสร้างต่างจาก neurotoxin 6 ชนิดที่ได้มีการแยกมาแล้วก่อนหน้านี้ neurotoxin ชนิดใหม่ (Oh9-1) แยกได้จากพิษงูจงอางโดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ SP-Sephadex C-25 ได้ส่วนประกอบย่อย 9 ส่วน จากนั้นส่วนที่มีแอกติวิตีของ neurotoxin นำไปแยกต่อด้วยวิธี RP-HPLC โดยใช้ SynChropak RP-P ได้ส่วนประกอบย่อย 3 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็นส่วนที่เป็น neurotoxin เมื่อนำไปหาลำดับกรดอะมิโน พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 ตัว และ cysteine 8 ตัว Oh9-1 สามารถยับยั้งการหดตัวของ carbacol-induced muscle แบบชนิดย้อนกลับไม่ได้ ความสามารถในการยับยั้งการหดตัวที่ 50% นี้คิดเป็น 4 เท่าของ α -bungarotoxin

De และคณะ¹⁰ ได้ทำการแยก neurotoxin (CM36) จากพิษงูจงอาง โดยใช้ CM-Sephadex และ HPLC Toxin ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 15 กิโลดาลตัน มีค่าความเป็นพิษ 3.5 ไมโครกรัมต่อหนู 20 กรัม เมื่อฉีดพิษเข้าทางเส้นเลือดดำที่หางหนู กลไกความเป็นพิษต้องอาศัย Ca^{2+} แต่ไม่พบว่ามีแอกติวิตีของ PLA2 Toxin CM36 ไม่มีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจของหนูแรท ไม่มีผลต่อความดันเลือดของแมวและหนู rat แต่มีผลต่อระบบหายใจในหนู rat และ หนูแรท

Ying และคณะ¹¹ ได้ทำการแยกส่วนพิษงูจงอางในรูปผงแห้ง ด้วยวิธี gel filtration โดยใช้ Sephadex G-50 ได้ส่วนประกอบย่อย 4 ส่วน ในส่วนที่ 4 มี แอกติวิตีของ neurotoxin จากนั้นนำส่วนที่ได้ไปแยกต่อโดยผ่านใน AKTA Source 15 S ได้ส่วนประกอบย่อย 9 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ถึง 6 ได้ทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย RP-HPLC สุดท้ายได้ α -neurotoxin 7 ชนิด นำไปหาลำดับกรดอะมิโนเพื่อเปรียบเทียบกับ neurotoxin ที่ได้จากการ clone จากต่อมพิษงู

ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับ post synaptic α - neurotoxin ที่พบในพิษงูชนิดต่างๆ กว่า 100 ชนิด เป็นชนิดที่พบในงูจงอางเพียง 8 long chain neurotoxin, 1 short chain neurotoxin และ 1 weak toxin(5) และ การศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยามีเพียงชนิดเดียว คือ hannalgesin ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารระงับปวด (analgesic) (6) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางยา จากพิษงูจงอาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ คล้ายกับ botulinum toxin ซึ่งเป็นยาที่มีประโยชน์ และใช้รักษาโรคหลากหลาย ตลอดจนนำมาใช้ด้านความงาม

วัสดุ และวิธีการศึกษา

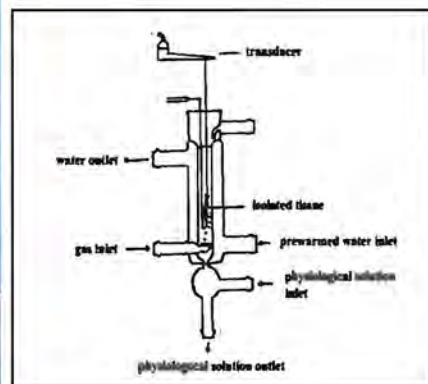
1. การศึกษาเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (PHARMACOLOGICAL STUDIES)
ทำการศึกษาทั้งในตัวสัตว์ทดลอง (in vivo) และ ในเนื้อเยื่อที่แยกจากกายสัตว์ทดลอง (in vitro)

สัตว์ทดลองที่ใช้

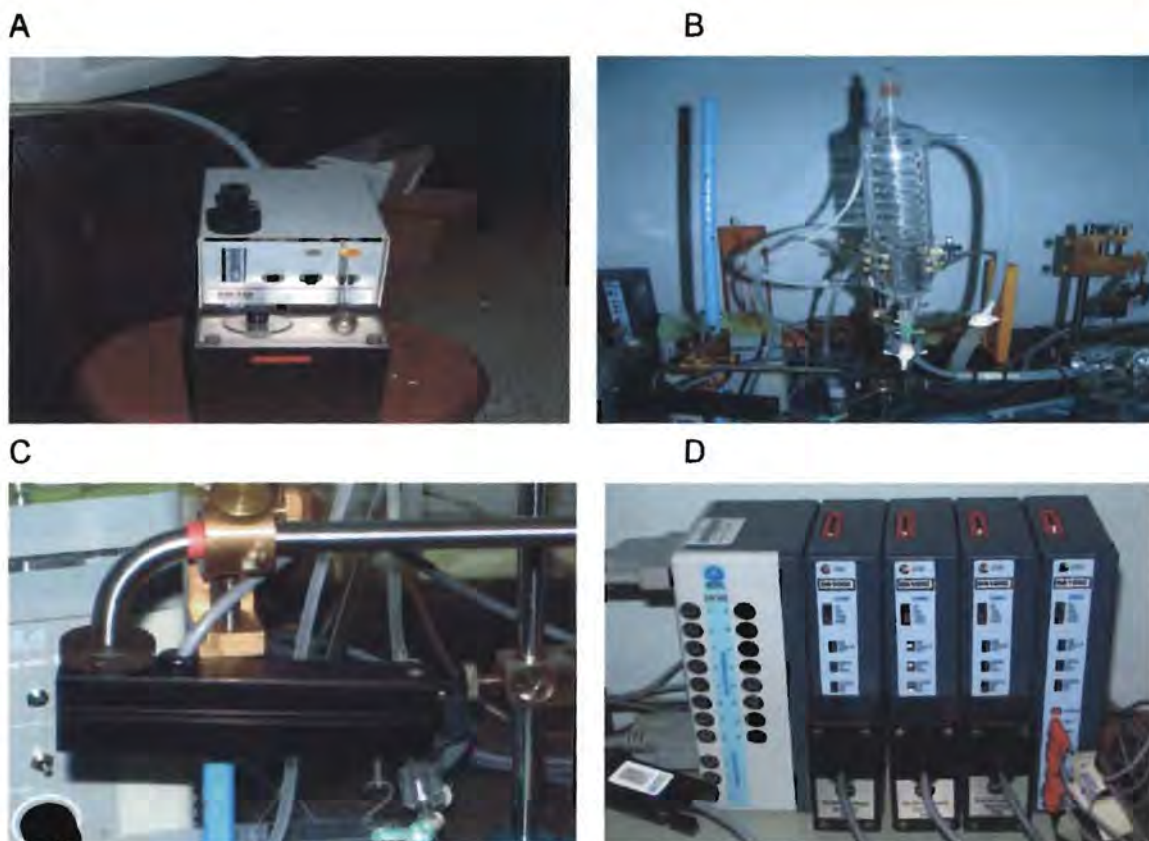
- 1) หนูแร่งซึ่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งมีการขนส่งที่มีมาตรฐานตามจรรยาบรรณการเลี้ยงสัตว์ทดลองของสมาคมวิจัยแห่งชาติ แล้วนำมาเลี้ยงไว้ที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกสรีรวิทยา ชั้น 4 (ก่อนการรื้อถอนตึก) ที่มีสุขลักษณะมาตรฐาน ในกรงที่มีวัสดุรองนอนสะอาด โดยควบคุมอุณหภูมิ และแสงสว่าง (สว่าง และมีช่วงละ 12 ชั่วโมง) ให้อาหารสำเร็จรูป และน้ำตามความต้องการ
- 2) หนูเมาส์สายพันธุ์ ICR breed (*Mus musculus*) ได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย
- 3) สุนัขพันธุ์ทางเพศผู้ (male mongrel dog) ได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- (1) Organ bath แบบ Double walled Harvard type ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ (Physiological solution) มีความจุ 20 มิลลิลิตร และมีช่องเปิดให้ก๊าซ Carbogen ผ่าน Physiological solution ได้ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนจาก Thermo-regulating water pump ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมอุณหภูมิของสารละลายใน หลอดแก้วชั้นใน ให้คงที่ที่ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาทำการทดลอง ดังภาพที่ ...
- (2) เครื่องมือวัดการหดตัวของหลอดเลือดของบริษัท BIOPAC ประกอบด้วย Transducer NO.SS12LA และ MP 100
- (3) เครื่องมือผ่าตัดเล็ก



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของ Organ bath ที่ใช้ในการทดลองในเนื้อเยื่อที่แยกจากกายสัตว์ทดลอง (in vitro)



ภาพที่ 2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาผลของสารทดสอบใน isolated tissue, A = thermoregulator ใช้ปรับอุณหภูมิของ physiological solution, B = เป็น cylinder แก้ว 2 ชั้น ให้บรรจุ physiological solution ที่จะปรับอุณหภูมิก่อนส่งไปยัง organ bath, C = transducer ใช้รับสัญญาณจากเนื้อเยื่อส่งไปยัง D ซึ่งเป็นชุดแปลงสัญญาณและบันทึกผลการทดลอง

สารเคมี

- (1) สารมาตรฐานสำหรับกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบ
 - Acetylcholine
 - Epinephrine (Sigma)
 - Norepinephrine (Sigma)
- (2) สารเคมีอื่น ๆ
 - Dimethylsulfoxide (DMSO) (MERCK)
 - Absolute ethanol (MERCK)
 - Sodium chloride (NaCl) (Sigma)
 - Magnesium sulphate ($MgSO_4$) (Sigma)
 - Calcium chloride ($CaCl_2$) (Sigma)

- Sodium hydrogen carbonate (NaCO_3) (Sigma)
 - Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) (Sigma)
 - Glucose (MERCK)
 - Ascorbic acid (Sigma)
- (3) - ก๊าซ Carbogen (CO_2 5% + O_2 95%) ของบริษัท Thai Industrial Gases (TIG)
- ก๊าซ carbondioxide 95% + Oxygen 5%

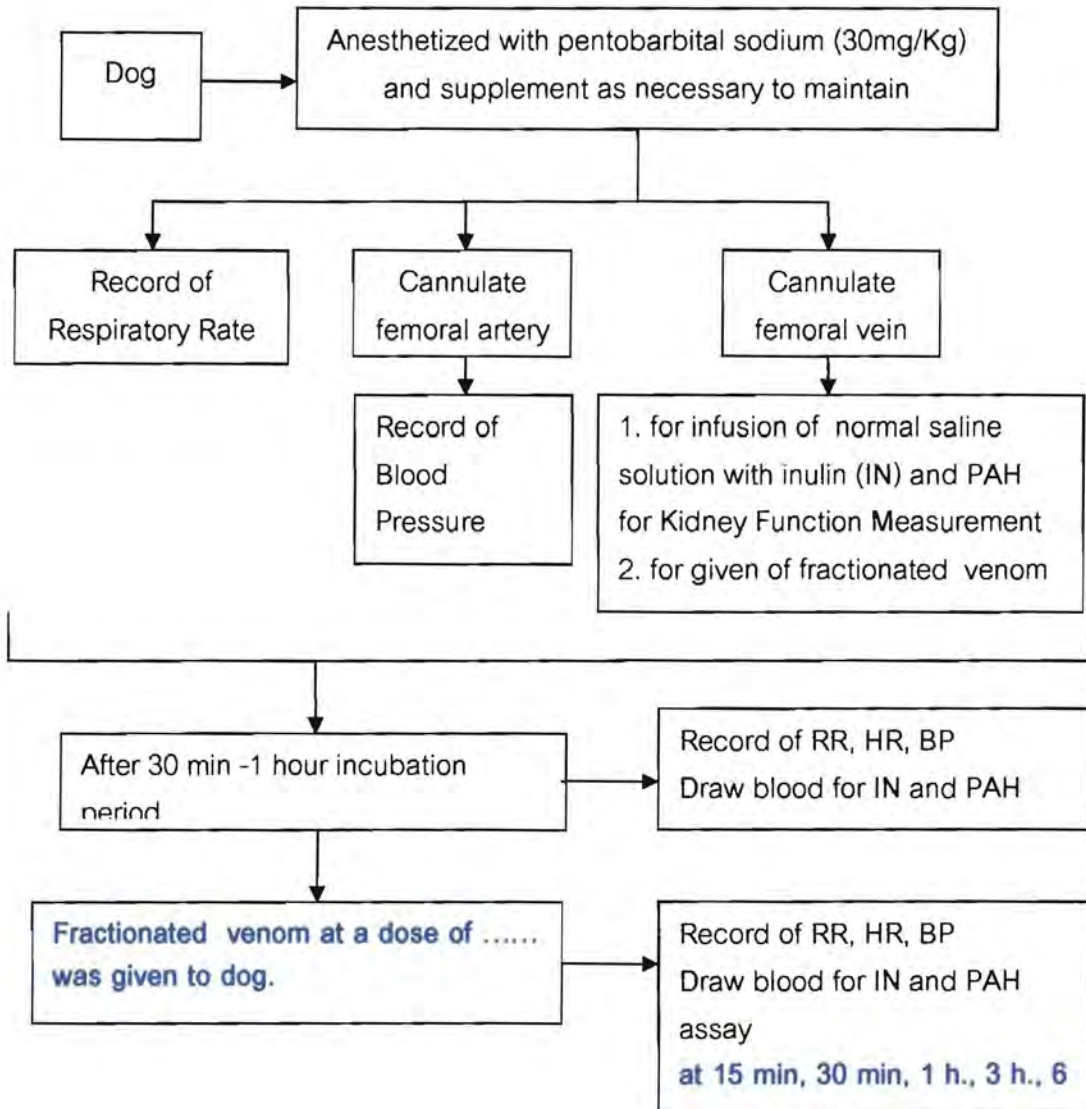
วิธีการศึกษา

- 1) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อในสุนัขที่วางยาสลบ

นำส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ที่ความเข้มข้น 6, 18 และ 54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปในสุนัขพันธุ์ทางเพศผู้ น้ำหนัก 12-15 กิโลกรัม

ขั้นตอนดำเนินการ

- (1) เตรียมสุนัขโดยงดอาหาร 8-10 ชั่วโมงก่อนการศึกษา
 - (2) ทำให้สุนัขสลบด้วยการฉีด 3% pentobarbital sodium 30 mg/Kg เข้าทางหลอดเลือดดำที่ขาหน้า ซ้ำๆ เติม 3% pentobarbital sodium ตามความจำเป็นหากสุนัขเริ่มรู้สึกตัวในระหว่างการทดลอง
 - (3) Cannulate femoral vein เพื่อให้ 0.9% normal saline และสำหรับให้สารทดสอบ ตลอดจนเก็บตัวอย่างเลือด
 - (4) Cannulate femoral artery เพื่อวัดความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจ
 - (5) ใส่ three-way เข้าหลอดลมเพื่อช่วยการหายใจ
 - (6) Cannulate ureter เพื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะ
 - (7) Control จนสุนัขอยู่ในสภาวะ equilibrium ก่อนเริ่มการทดลอง
- 2) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system)
- 2.1) ทดสอบ motor coordination โดยการทำให้ Rotarod Test ทำการทดลองในหนูเม้าส์ (mouse) โดยให้สารทดสอบที่จะศึกษาในขนาดต่างๆ 3 ขนาดผสมกับ 5% tween 80 เป็นตัวแขวนตะกอน ผี๊กให้หนูเม้าส์สามารถเดินทรงตัวอยู่บน rod (diameter 3.5 cm) หมุน 16 RPM ได้อย่างน้อย 1 นาที แบ่งหนูเม้าส์ออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีดส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 เข้ากล้ามเนื้อที่ขาหลัง
- กลุ่มที่ 1 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.1 LD₅₀ (1 LD₅₀ = 4.8 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)
 - กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.2 LD₅₀



แผนภูมิที่ 1 ขั้นตอนการศึกษาผลของพิษงูจงอางและส่วนของพิษงูจงอางในสุนัข



ภาพที่ 3 เครื่องมือสำหรับการทดสอบการเคลื่อนไหวและการทรงตัวของหนูเม้าส์ (Rotarod Test)

กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.4 LD50

ทดสอบ motor coordination หลังจากให้สารทดสอบ 30 นาที 1 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง โดยให้หนูเม้าส์เดินบน rotating rod ที่หมุนด้วยความเร็ว 16 รอบ/นาที (RPM) เพื่อดูการทรงตัวของหนูเม้าส์ ดูความสามารถของหนูในการเดินทรงตัวบน rod ได้อย่างน้อย 1 นาที ในการได้ทั้งหมด 3 ครั้ง ทำการทดลองในหนูเม้าส์ 5 ตัว นับจำนวนหนูที่ไม่ตกจาก rotating rod บันทึกผลการทดลอง แสดงค่าเป็น %pass

2.2) ทดสอบการกดประสาทส่วนกลาง ทำการทดลองในหนูเม้าส์เพศผู้ น้ำหนัก 25-30 กรัม โดยดูการเสริมฤทธิ์ของ pentobarbital sodium ที่ทำให้หนูเม้าส์นอนหลับ แบ่งหนูเม้าส์ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีด pentobarbital sodium 45 mg /kg/BW เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal)

กลุ่มที่ 1 ได้รับเฉพาะ pentobarbital sodium

กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.1 LD50 ร่วมกับ pentobarbital sodium 45 mg/kg BW

กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.2 LD50 ร่วมกับ pentobarbital sodium 45 mg/kg BW

กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.4 LD50 ร่วมกับ pentobarbital sodium 45 mg/kg BW

สังเกตอาการที่ประสาทส่วนกลางถูกกดจนทำให้หลับ โดยทดสอบการสูญเสีย righting reflex (หนูสามารถยืนได้ 4 ขา) บันทึกเวลาที่หนูเม้าส์เริ่มหลับ หรือสูญเสีย righting reflex จนกระทั่งตื่น หรือ righting reflex กลับคืนเป็นปกติ จะได้ onset และ duration ของการหลับ (sleeping time)

3) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลาย

ประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต่อหัวใจ

ทำการทดลอง *in vitro* ในหัวใจห้องบนข้างขวาที่แยกออกจากกายของหนูแรท (isolated right auricle from albino rat) ซึ่งมีการเต้นเป็นจังหวะ spontaneous beating ทำโดยงดให้อาหารหนูแรท 8 ชั่วโมง ก่อนการทดลอง วางยาลบหนูแรท (Wistar Rat) ด้วยการวางหนูในกล่องพลาสติกที่ปิดสนิท มีสายนำแก๊ส carbondioxide + oxygen (95% + 5%) ต่อเข้าไปในกล่องเพื่อทำให้หนูแรทหมดความรู้สึก ทดสอบว่าหนูแรทหมดความรู้สึก เปิดช่องอก ตัดหัวใจออกมาแช่ใน Krebs-Henseleit solution ที่อุ่นและมี Carbogen gas carbondioxide + oxygen (5% + 95%) ผ่านตลอดเวลาใน petri dish ที่มีเทียนไขเป็นพื้น ยึดบริเวณหลอดเลือดด้วยเข็มหมุดปักลงบนเทียนไข ผูกปลายบนด้วยด้าย ตัดเอาเฉพาะหัวใจห้องบนข้างขวาปลายด้านล่างของหัวใจห้องบนข้างขวาผูกกับแท่งแก้ว นำไปแช่ใน organ bath ที่บรรจุ Krebs-Henseleit solution ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และผ่าน Carbogen gas ตลอดเวลา ส่วนปลายบนต่อกับ transducer นำสัญญาณเข้าเครื่องและบันทึกผล ก่อนทดสอบจะปล่อยให้หัวใจห้องบนข้างขวาอยู่ในภาวะสมดุลย์ก่อน ดูการตอบสนองของหัวใจห้องบนข้างขวาต่อสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายใน 5% tween 80 เปรียบเทียบกับผลการตอบสนองของหัวใจห้องบนข้างขวาต่อตัวทำละลาย 5% tween 80

4) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต่อหลอดลม (trachea)

ทำการทดลอง *in vitro* ในหลอดลมที่แยกออกจากกายของหนูแรท (isolated rat's trachea) ทำโดยงดให้อาหารหนูแรท 8 ชั่วโมงก่อนการทดลอง วางยาสลบหนูแรท (Wistar Rat) ด้วยการวางหนูในกล่องพลาสติกที่ปิดสนิท มีสายนำแก๊ส carbondioxide + oxygen (95% + 5%) ต่อเข้าไปในกล่องเพื่อทำให้หนูแรทหมดความรู้สึก ทดสอบว่าหนูแรทหมดความรู้สึก เปิดช่องอกทดสอบว่าหนูหมดความรู้สึกแล้วจึงเปิดช่องอก ตัดหลอดลม ออกมาแช่ใน Krebs-Henseleit solution ที่อุ่นและมี Carbogen gas ผ่านตลอดเวลาใน petri dish ที่มีเทียนไขเป็นพื้น ตัดหลอดลมแบบ spiral จะได้เป็นแผ่น ตัดตามขวางให้ได้ชิ้นยาว 1-1.5 ซม. ปลายหนึ่งผูกกับแท่งแก้ว นำไปแช่ใน organ bath ที่บรรจุ Krebs-Henseleit solution ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และผ่าน Carbogen gas ตลอดเวลา อีกปลายต่อกับ transducer นำสัญญาณเข้าเครื่องและบันทึกผล ก่อนทดสอบจะปล่อยให้เนื้อเยื่อหลอดลมอยู่ในภาวะสมดุลย์ก่อนดูการตอบสนองของเนื้อเยื่อหลอดลมต่อสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ และดูการตอบสนองของเนื้อเยื่อหลอดลมต่อการกระตุ้นด้วย histamine เมื่อไม่มี และมีสารทดสอบที่นำมาศึกษา

5) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต่อระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal system)

5.1) ทำการทดลอง *in vivo* ในหนูเม้าส์โดยดูการบีบตัวของลำไส้จากการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้ ทำโดยงดการให้อาหารหนูเม้าส์ 14-16 ชั่วโมง เตรียมผงถ่าน (charcoal) แขว่นตะกอนใน 2% Tragacanth mucilage หนูเม้าส์งดอาหารก่อนการทดลอง 14-16 ชั่วโมง แบ่งหนูเม้าส์เป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีด F1.2.2 เข้ากล้ามเนื้อขาหลัง (intramuscular)

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (2% Tragacanth mucilage)

กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.1 LD50

กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.2 LD50

กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.4 LD50

ป้อนผงถ่านปริมาตร 0.5 ml เข้าทางปาก ผ่านทางท่อที่สอดเข้าถึงกระเพาะอาหาร (feeding tube) ให้กับหนูเม้าส์เมื่อครบเวลา 30 นาที วางยาสลบหนูเม้าส์ (mouse) ด้วยการวางหนูเม้าส์ในกล่องพลาสติกที่ปิดสนิท มีสายนำแก๊ส carbondioxide + oxygen (95% + 5%) ต่อเข้าไปในกล่องเพื่อทำให้หนูเม้าส์หมดความรู้สึก ทดสอบว่าหนูเม้าส์หมดความรู้สึก แล้วจึงเปิดช่องท้อง นำลำไส้คลี่ออกมาวางบนกระดาษกรองหยาบ วัดความยาวของลำไส้ทั้งหมด และวัดระยะทางที่ผงถ่านที่เห็นเป็นสีดำเคลื่อนที่ได้ ได้ คำนวณการเคลื่อนที่ของผงถ่านเป็นเปอร์เซ็นต์ของความยาวของลำไส้

5.2) ทำการศึกษา *In vitro* ในลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ที่แยกออกจากกายของหนูแรท (isolated

ileum) ทำโดยงดให้อาหารหนูแรท 8 ชั่วโมงก่อนการทดลอง วางยาสลบหนูแรท (Wistar Rat) ด้วยการวางหนูในกล่องพลาสติกที่ปิดสนิท มีลายนำแก๊ส carbon dioxide + oxygen (95% + 5%) ต่อเข้าไปในกล่องเพื่อทำให้หนูแรทหมดความรู้สึก ทดสอบว่าหนูหมดความรู้สึกแล้วจึงเปิดช่องท้อง ตัดลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ออกมาแช่ใน Krebs-Henseleit solution ที่อุ่นและมี Carbogen gas ผ่านตลอดเวลาใน petri dish ที่มีเทียนไขเป็นพื้น ตัดลำไส้เล็กส่วนปลายตามขวางให้ได้ชิ้นยาว 1-1.5 ซม. ปลายหนึ่งผูกกับแท่งแก้ว นำไปแช่ใน organ bath ที่บรรจุ Krebs-Henseleit solution ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และผ่าน Carbogen gas ตลอดเวลา อีกปลายต่อกับ transducer นำสัญญาณเข้าเครื่องและบันทึกผล ก่อนทดสอบจะปล่อยให้เนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนปลายอยู่ในภาวะสมดุลย์ก่อน ดูการตอบสนองของเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนปลายต่อสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ และดูการตอบสนองของเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนปลายต่อการกระตุ้นด้วย acetylcholine เมื่อไม่มี และมีสารทดสอบที่นำมาทดสอบ (N = 5/group)

2. การศึกษาพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (TOXICOLOGICAL STUDIES)

สัตว์ทดลองที่ใช้

หนูเม้าส์ทั้ง 2 เพศ สายพันธุ์ ICR breed (*Mus musculus*) น้ำหนัก 18-20 กรัม ที่ทำกาเพาะเลี้ยงจากสถานี่เพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเลวภา สภาการศึกษาไทย

1) การหาค่าความเป็นพิษ (lethality) ของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ตามวิธีของ Reed, L.J., Muench, H., 1938

การเตรียมสารละลายพิษงู

Crude venom

จากค่า LD50 ของพิษงูจงอางรุ่น OH 260542 (2) ในโครงการที่ 1 มีค่า 32.9 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักหนูเม้าส์ 18-20 กรัม ความเข้มข้นของพิษที่เหมาะสมสำหรับทดสอบหา LD50 ของพิษงูจงอางที่ใช้ในโครงการวิจัย จึงกำหนดให้อยู่ระหว่าง 17.8-68.6 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักหนูเม้าส์ 18-20 กรัม (จากค่ากลางประมาณ 35.0 ไมโครกรัม/หนูเม้าส์หนัก 20 กรัม อัตราส่วนการเจือจาง 1:1.4) ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมดังนี้ 17.8, 25, 35, 49 และ 68.6 ไมโครกรัมตามลำดับ

Fractions ของพิษงูจงอาง

รวม fractions ของแต่ละพีค หาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เทียบกับพิษงูจงอาง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.113

การทดสอบเบื้องต้น (preliminary test)

ฉีดพิษงูในแต่ละทิศทางหลอดเลือดดำที่หางให้สัตว์ทดลอง โดยใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่แยกได้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แต่ความเข้มข้นที่ใช้ไม่เกิน 2LD50 ของพิษงูก่อนการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน และทำการเจือจางพิษลง 2 เท่า เป็นจำนวน 2 ครั้ง โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์เป็นตัวทำละลาย ในขั้นตอนนี้ใช้หลอดทดลองเพียง 1 ตัวต่อความเข้มข้น

การหาค่าความเป็นพิษ

จากความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายและความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้สัตว์ทดลองรอดตาย ในข้อที่ 1 ใช้ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นช่วงของการหาค่าความเป็นพิษ ทำการเจือจางพิษในอัตราส่วน 1:1.4

วิธีทดสอบ

- (1) ฉีดพิษงูหรือส่วนย่อยของพิษงูเข้าหลอดเลือดดำที่หางหนูเม้าส์ ความเข้มข้นละ 5 ตัว สำหรับ fractions ของพิษงูใช้ความเข้มข้นละ 3 ตัว ติดตามอาการหลังฉีดตลอด 24 ชม
- (2) บันทึกจำนวนหนูเม้าส์ที่รอดชีวิต และ หนูเม้าส์ที่ตายแต่ละความเข้มข้น
- (3) รวมจำนวนหนูเม้าส์ที่รอดชีวิตจากพิษงู ความเข้มข้นมากไปน้อย
- (4) รวมจำนวนหนูเม้าส์ที่ตายจากพิษงูความเข้มข้นน้อยไปหามาก
- (5) นำจำนวนรวมหนูเม้าส์ที่รอดชีวิต, หนูเม้าส์ที่ตาย, ความเข้มข้นของพิษงูที่ใช้ในการทดสอบ และ อัตราส่วนการเจือจางพิษ ไปคำนวณหา LD50 ตามสมการ

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

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

2) การศึกษาพิษวิทยาของส่วนของพิษงูจาง KV 1.2.2 ต่อระบบภายในร่างกาย (systemic toxicity test) แบบเฉียบพลัน (acute toxicity) และพิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity) ตามข้อกำหนดของ WHO (1993) และ OECD (2001)

2.1) การศึกษา single dose toxicity

แบ่งหนูเม้าส์เป็น 5 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีด F1.2.2 ปริมาตร 0.1 ml เข้ากล้ามเนื้อขาหลังหนูเม้าส์

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ Normal saline
- กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 2.6 µg/mouse
- กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 3.6 µg/mouse

กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 5.0 $\mu\text{g}/\text{mouse}$

กลุ่มที่ 5 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 7.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$

ดูผล 14 วัน

เมื่อครบตามระยะเวลา euthanized สัตว์ทดลอง ตัดอวัยวะได้แก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด ม้าม และอวัยวะสืบพันธุ์ เก็บใน 10% Formalin เพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไป

2.2) การศึกษา repeated-dose toxicity

แบ่งหนูเม้าส์เป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีด F1.2.2 ปริมาตร 0.1 ml เข้ากล้ามเนื้อขาหลังวันละครั้ง ติดต่อกัน 28 วัน

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ Normal saline

กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.1 LD50 (0.4 μg)

กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.2 LD50 (0.8 μg)

กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.4 LD50 (1.6 μg)

เมื่อครบตามระยะเวลา 28 วัน euthanized สัตว์ทดลอง ตัดอวัยวะได้แก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด ม้าม และอวัยวะสืบพันธุ์ เก็บใน 10% Formalin เพื่อเตรียมสำหรับการตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไป

3) การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (Mutagenicity) ของส่วนของพิษงูจงอาง KV 1.2.2 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และ KV 5 ที่แสดงฤทธิ์ anticancer และ antimicrobial

ทำการศึกษาในหลอดทดลองโดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นสำหรับทดสอบการกลายพันธุ์ (Ames' Test) เปรียบเทียบกับ สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)

ขั้นตอนการทดสอบ

การเตรียมอุปกรณ์และสารต่างๆ

1. สารทดสอบ คือ ส่วนของพิษงูจงอาง KV 1.2.2 และ KV 5
2. เตรียมส่วนของพิษงูจงอาง KV 1.2.2 และ KV 5 ที่จะทดสอบให้มีความเข้มข้น 2 mg/ml โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย แล้วกรองด้วย 0.4 μm membrane filter
3. แบ่งหลอดทดลองเป็น 2 ชุด คือ สภาวะที่มี S9 และสภาวะที่ไม่มี S9 ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ และชุด positive control ในสภาวะที่มี S9 และสภาวะที่ไม่มี S9

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

- สภาวะที่มี S9 ทำการเจือจางสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg/tube แล้วเติม S9 mix
- สภาวะที่ไม่มี S9 ทำการเจือจางสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg/tube ไม่เติม S9 mix

การทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารมาตรฐาน (positive control)

- สภาวะที่มี S9 ทำการเจือจางสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-aminoanthracene (2-AA) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{tube}$ ซึ่งใช้ความเข้มข้นเดียวกันทั้งในเชื้อ TA98 และ TA100 แล้วเติม S9 mix
- สภาวะที่ไม่มี S9 ทำการเจือจางสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamido (AF-2) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{tube}$ สำหรับเชื้อ TA98 และที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005, 0.01, 0.02 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{tube}$ สำหรับเชื้อ TA100 ส่วนสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) ใช้ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1, 0.2, 0.4 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{tube}$ สำหรับเชื้อ TA98 และที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.025, 0.05, 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{tube}$ สำหรับเชื้อ TA100 แต่ไม่เติม S9 mix

การทดสอบการกลายพันธุ์ของส่วนของพิวงจุจาง KV 1.2.2 และ KV 5

1. ทำการเติมเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 หรือ TA100 ที่ทำเรื่องเจริญในอาหารเหลว 18 ชม. ผสมเชื้อกับสารทดสอบ ในหลอดทดลองให้เข้ากันดีก่อนที่จะนำไปเขย่า 50 rpm ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 30 นาที
2. เมื่อครบเวลา ทำการเติม Top agar (ซึ่งได้ผสม Histidine และ Biotin ไว้แล้ว) ลงในแต่ละหลอด แล้วผสมให้เข้ากันดีก่อนที่จะเทที่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ V-B medium จากนั้นวางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งที่อุณหภูมิห้อง
3. คำนวณอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้น ทำการนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญ

ผลการศึกษา

- 1) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อในสุนัขที่วางยาสลบ

ตารางที่ 1 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ต่อความดันเลือดแดงในสุนัข

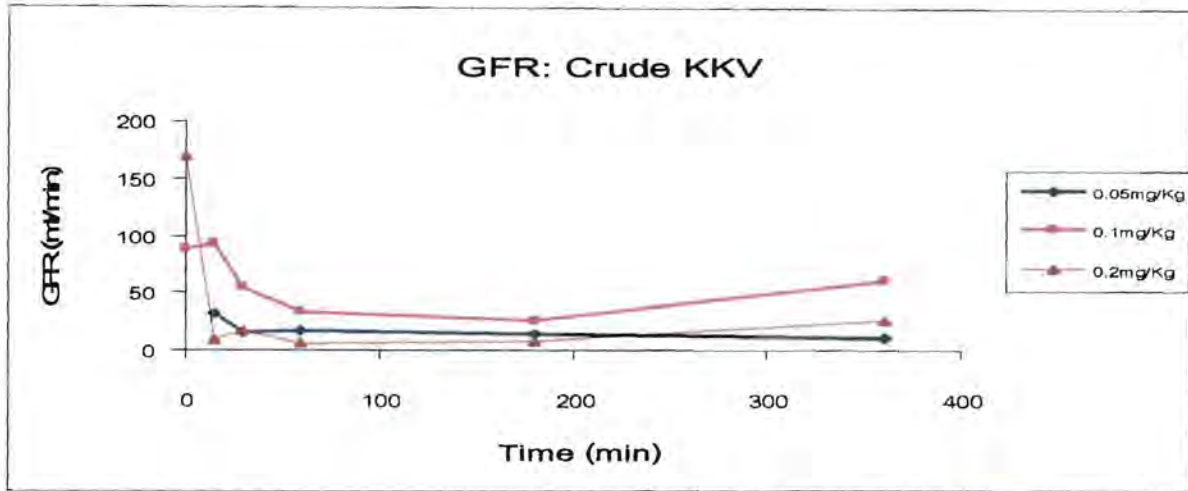
No. Dogs	KVV F1.2.2 $\mu\text{g/kg}$	Mean Arterial Pressure (mmHg)					
		0 min	15 min	30 min	1 hour	3 hour	6 hour
3	6	148.3	136.7	146.1	150.5	163.3	153.9
3	18	122.2	109.4	113.3	102.8	125.0	133.3
3	54	116.1	85.5	74.4	72.2	-	-

ตารางที่ 2 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ต่ออัตราการเต้นของหัวใจในสุนัข

No. Dogs	KVV F1.2.2 $\mu\text{g/kg}$	Heart Rate (beats/min)					
		0 min	15 min	30 min	1 hour	3 hour	6 hour
3	6	85.7	83.3	101.9	123.3	118.6	131.7
3	18	101.9	108.3	116.7	123.3	130.0	156.7
3	54	75.5	70.0	75.3	86.7	death	death

ตารางที่ 3 ผลของพิษงูจงอาง (crude venom) ต่ออัตราการกรองที่ไต (GFR) ในสุนัข

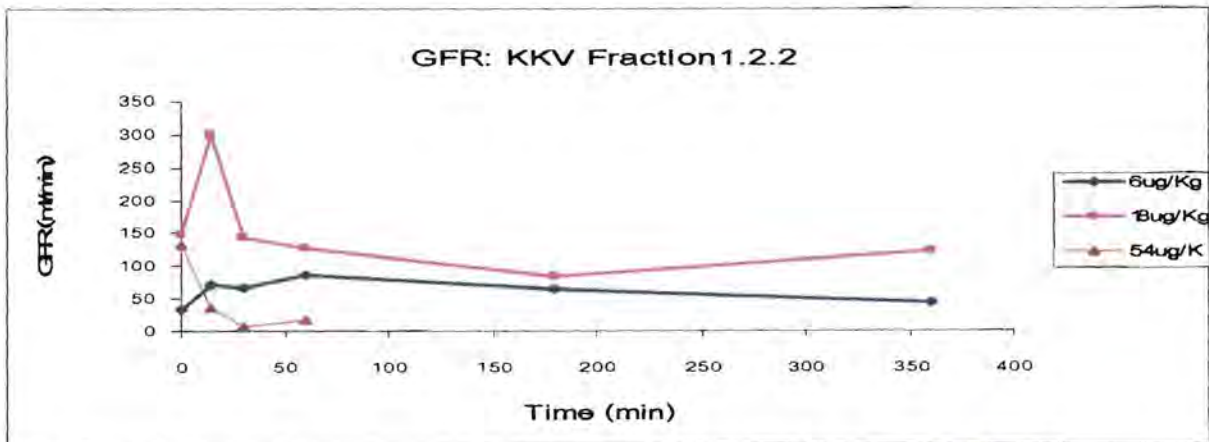
Crude venom mg/Kg	GFR (Mean \pm SE) ml/min					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
0.05 (N=3)	No data*	32.29 \pm 7 \pm 18.14	15.5278 \pm 7.30	17.1384 \pm 6.54	13.6137 \pm 13.20	10.7329 \pm 5.45
0.1 (N=4)	88.9069 \pm 14.01	92.4380 \pm 85.87	55.5422 \pm 14.52	33.6541 \pm 13.77	26.0945 \pm 14.04	61.1387 \pm 60.50
0.2 (N=3)	168.7551**	9.6339 \pm 1.20	16.0456 \pm 13.05	6.4279 \pm 1.87	7.8789 \pm 3.84	25.4923**



ภาพที่ 4 ผลของพิษงูจงอาง (crude venom) ต่ออัตราการกรองที่ไต (GFR) ในสุนัข (◆ 0.05mg/Kg, ■ 0.1mg/Kg, ▲ 0.2mg/Kg)

ตารางที่ 4 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการกรองที่ไต (GFR) ในสุนัข

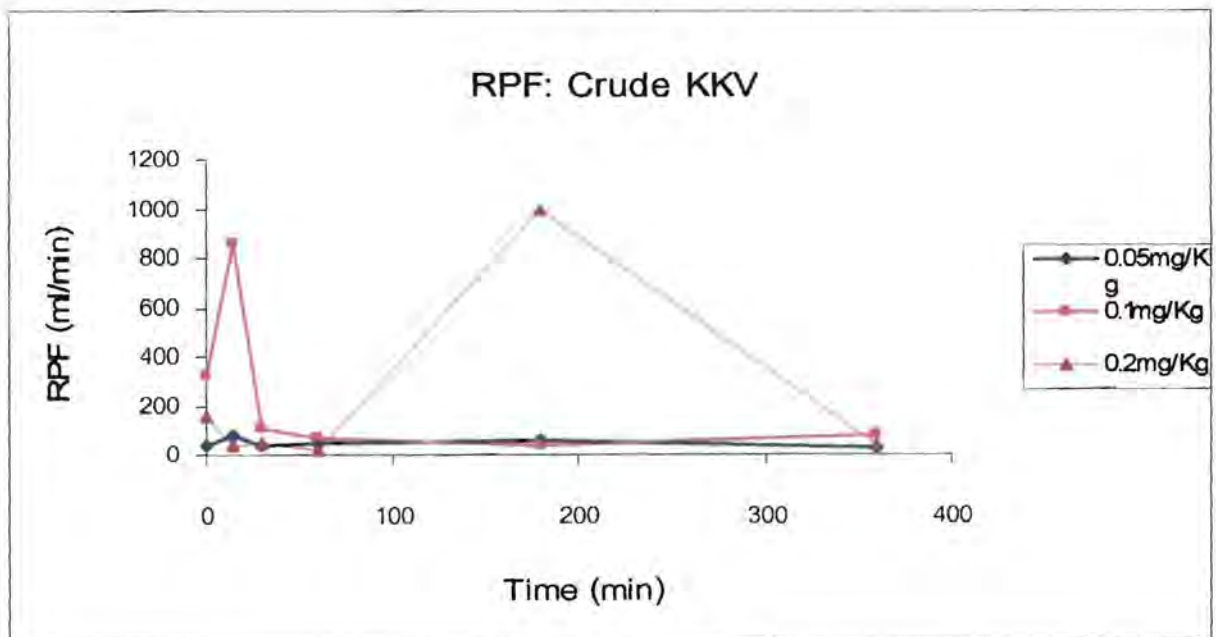
KVV F1.2.2 µg/Kg	GFR (Mean ± SE) ml/min					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
6 (N=3)	32.9380 ±7.10	72.0126 ±42.36	66.2384 ±59.37	86.8704 ±56.41	65.6585 ±25.79	44.0134 ±21.57
18 (N=3)	148.3173 ±52.73	300.8435 ±124.11	143.1220 ±82.25	126.6502 ±65.91	82.8554 ±48.29	121.1082 ±59.79
54 (N=3)	132.4266 ±106.67	36.9444 ±10.56	6.6939 ±5.29	16.9272 ±106.67	No data*	No data*



ภาพที่ 5 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการกรองที่ไต (GFR) ในสุนัข (◆ 6µg/Kg, ■ 18µg/Kg, ▲ 54µg/Kg)

ตารางที่ 5 ผลของพิษงูจงอาง (Crude venom) ต่ออัตราการไหลของพลาสมาที่ไต (renal plasma flow, RPF) ในสุนัข

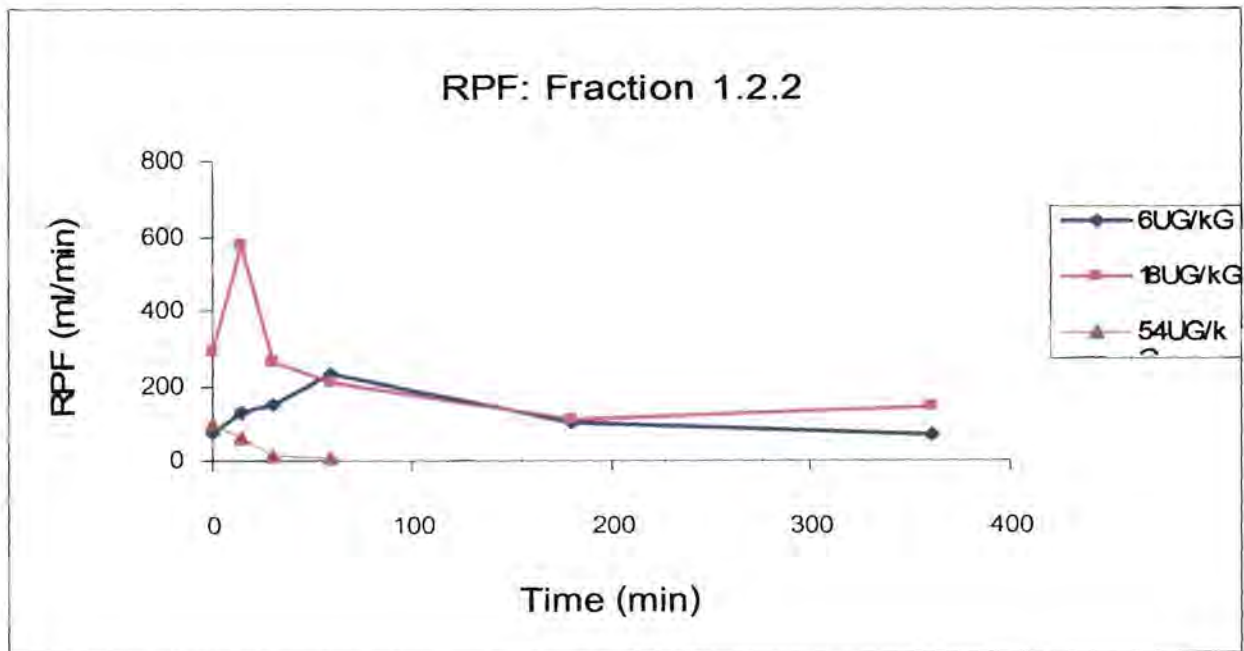
Crude venom mg/Kg	RPF (Mean \pm SE) ml/min					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
0.05 (N=3)	39.2157**	82.8117 ± 47.19	40.8225 ± 22.96	45.9288 ± 18.38	54.1471 ± 53.19	31.9350 ± 5.14
0.1 (N=4)	325.2463 ± 176.42	855.9980 ± 620.92	111.0033 ± 56.49	68.4630 ± 27.58	42.5291 ± 17.27	76.9034 ± 61.65
0.2 (N=3)	155.2100 ± 145.16	36.8382 ± 23.16	50.2318 ± 42.72	14.9305 ± 2.67	992.9480 ± 976.21	No data*



ภาพที่ 6 ผลของพิษงูจงอาง (crude venom) ต่ออัตราการไหลของพลาสมาที่ไต (renal plasma flow, RPF) ในสุนัข (◆ 0.05mg/Kg, ■ 0.1mg/Kg, ▲ 0.2mg/Kg)

ตารางที่ 6 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการไหลของพลาสมาที่ไต (renal plasma flow, RPF) ในสุนัข

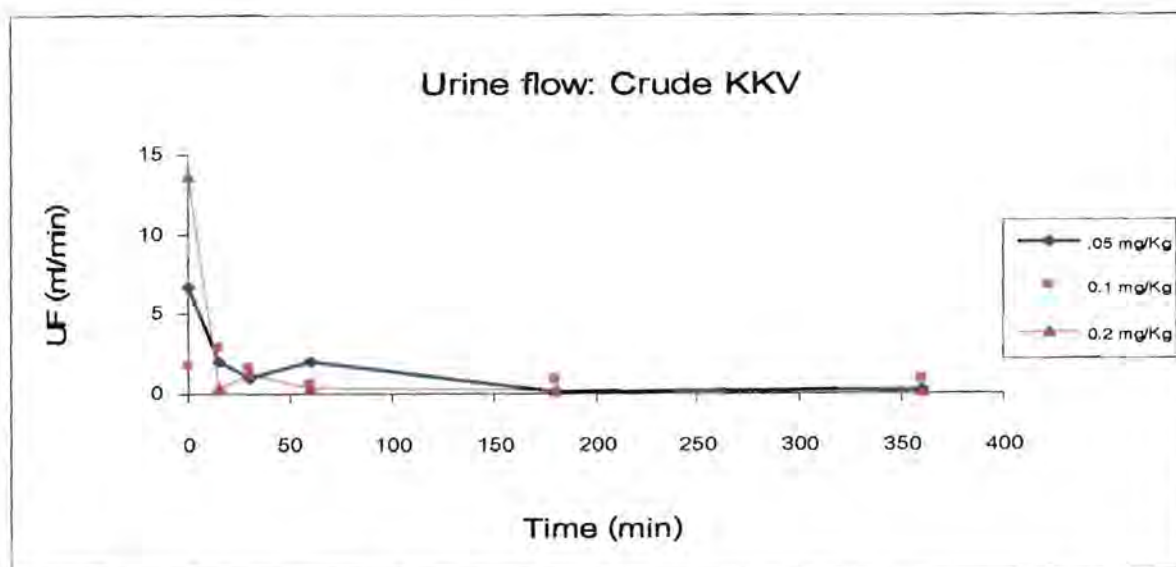
KVV F1.2.2 $\mu\text{g/Kg}$	RPF (Mean \pm SE) ml/min					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
6 (N=3)	71.7283 ± 7.95	130.8839 ± 81.00	152.4538 ± 119.56	227.3292 ± 158.19	99.6271 ± 45.58	67.8546 ± 34.83
18 (N=3)	293.3761 ± 116.32	576.3295 ± 391.64	266.4630 ± 243.23	213.4028 ± 160.83	107.2016 ± 85.59	139.8717 ± 95.04
54 (N=3)	96.0572 ± 66.81	62.8029 ± 14.12	10.4601 ± 8.19	9.0503	No data*	No data*



ภาพที่ 7 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F 1.2.2 ต่ออัตราการไหลของพลาสมาที่ไต (renal plasma flow, RPF) ในสุนัข (\blacklozenge 6 $\mu\text{g/Kg}$, \blacksquare 18 $\mu\text{g/Kg}$, \blacktriangle 54 $\mu\text{g/Kg}$)

ตารางที่ 7 ผลของพิษงูทอง (crude venom) ต่ออัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate, UF) ในสุนัข

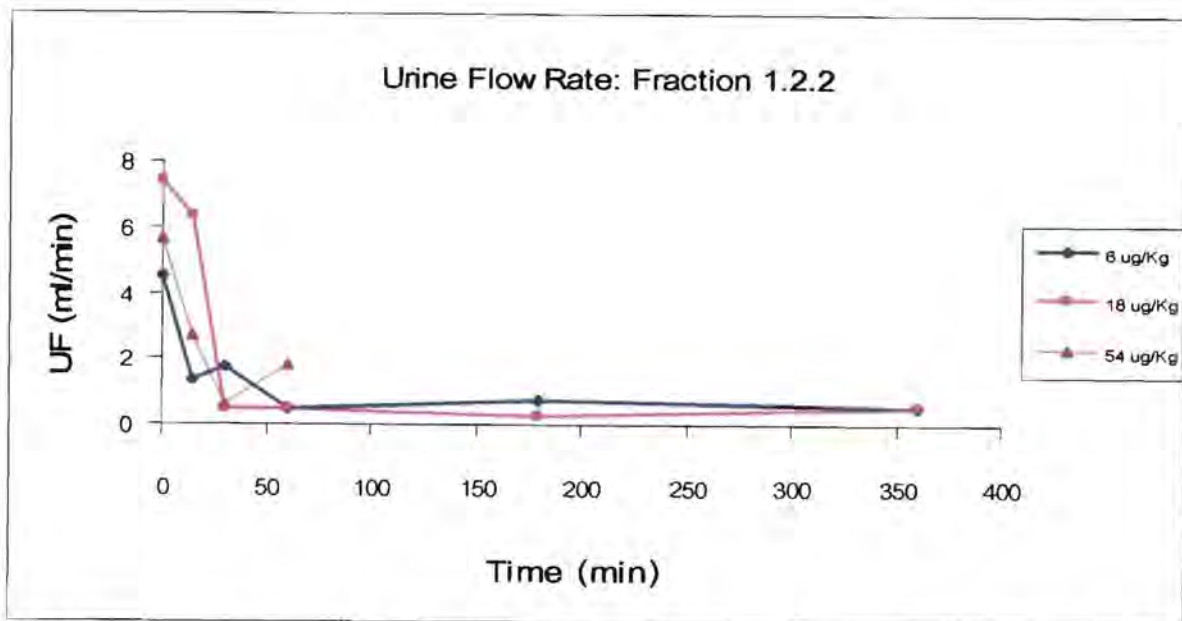
Crude venom mg/Kg	UF (Mean \pm SE) ml/min					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
0.05 (N=3)	6.6667 \pm No data	2.0111 ± 0.21	1.0456 ± 0.71	1.9889 ± 1.34	0.1042 ± 0.05	0.2917 ± 0.18
0.1 (N=4)	1.7889 ± 0.79	2.9250 ± 2.37	1.5778 ± 0.67	0.6889 ± 0.20	0.8847 ± 0.40	0.8819 ± 0.78
0.2 (N=3)	13.5667 ± 3.57	0.3833 ± 0.22	1.2333 ± 1.05	0.4000 ± 0.33	0.2469 ± 0.12	0.1611 \pm No data



ภาพที่ 8 ผลของพิษงูทอง (crude venom) ต่ออัตราการไหลของปัสสาวะ (renal plasma flow, RPF) ในสุนัข (\blacklozenge 0.05mg/Kg, \blacksquare 0.1mg/Kg, \blacktriangle 0.2mg/Kg)

ตารางที่ 8 ผลของส่วนของพิษงูจาง F 1.2.2 ต่ออัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate, UF) ในสุนัข

KV F1.2.2 $\mu\text{g/Kg}$	UF (Mean \pm SE) ml/min					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
6 (N=3)	4.5056 ± 0.73	1.3667 ± 0.64	1.7444 ± 1.46	0.4444 ± 0.09	0.7569 ± 0.20	0.5324 ± 0.22
18 (N=3)	7.3944 ± 1.63	6.3333 ± 5.51	0.4556 ± 0.22	0.4389 ± 0.17	0.3014 ± 0.13	0.5528 ± 0.42
54 (N=3)	5.6611 ± 1.20	2.7000 ± 1.99	0.5800 ± 0.55	1.8000 $\pm \text{No data}^*$	No urine	No urine



ภาพที่ 9 ผลของส่วนของพิษงูจาง F 1.2.2 ต่ออัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate, UF) ในสุนัข

(◆ 6 $\mu\text{g/Kg}$, ■ 18 $\mu\text{g/Kg}$, ▲ 54 $\mu\text{g/Kg}$)

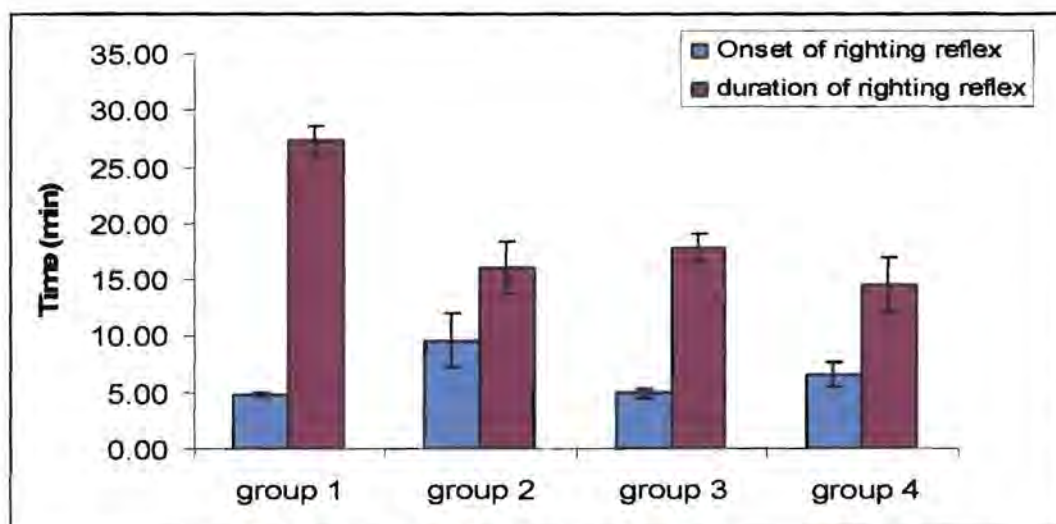
2)ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับ
ก้ามเนื้อ ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system)

2.1 การทรงตัว (Motor Coordination) โดย Rotarod Test จากการทดลองพบว่าหนูทั้ง 4 กลุ่มการ
ทดลอง สามารถเดินทรงตัวบน rod ได้อย่างน้อย 1 นาที ในการได้ทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เวลา 30 นาที, 1
ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง ค่า %pass = 100% ทุกกลุ่ม

2.2 การกดระบบประสาทส่วนกลาง (Central Nervous System Depression)

ตารางที่ 9 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ในการเสริมฤทธิ์กดประสาทส่วนกลางของ pentobarbital
sodium (45 mg/kg BW) ในหนูเม้าส์

KVV F1.2.2	Onset of righting reflex loss (min)	duration of righting reflex loss (min)
-	4.78 ± 0.22	27.34 ± 1.27
0.1 LD50	9.60 ± 2.33	16.02 ± 2.30
0.2 LD50	4.88 ± 0.41	17.73 ± 1.30
0.4 LD50	6.60 ± 1.10	14.82 ± 2.38



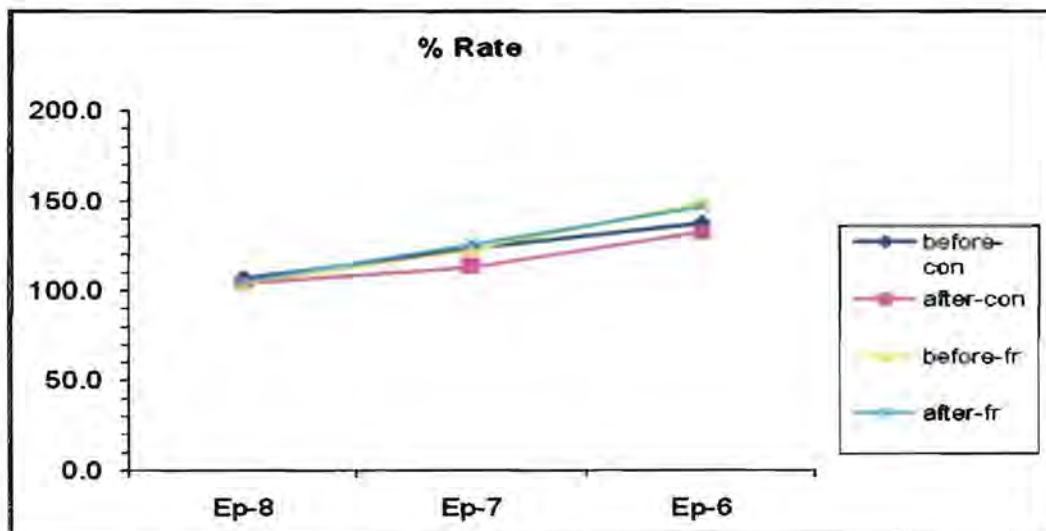
ภาพที่ 10 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ในการเสริมฤทธิ์กดประสาทส่วนกลางของ pentobarbital
sodium ในหนูเม้าส์ (group 1 = pentobarbital, group 2 = pentobarbital + 0.1 LD50 ของ KVV F1.2.2,
group 3 = pentobarbital + 0.2 LD50 ของ KVV F1.2.2, group 4 = pentobarbital + 0.4 LD50 ของ KVV
F1.2.2)

3) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต่อหัวใจ

3.1 ผลการศึกษาใน isolated right auricle ของหนูแรท

ตารางที่ 10 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ต่ออัตราการเต้นของ isolated right auricle ของหนูแรท ที่ให้ตัวกระตุ้น epinephrine ที่ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before-control, after-control, before-fraction) และเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after-fraction)

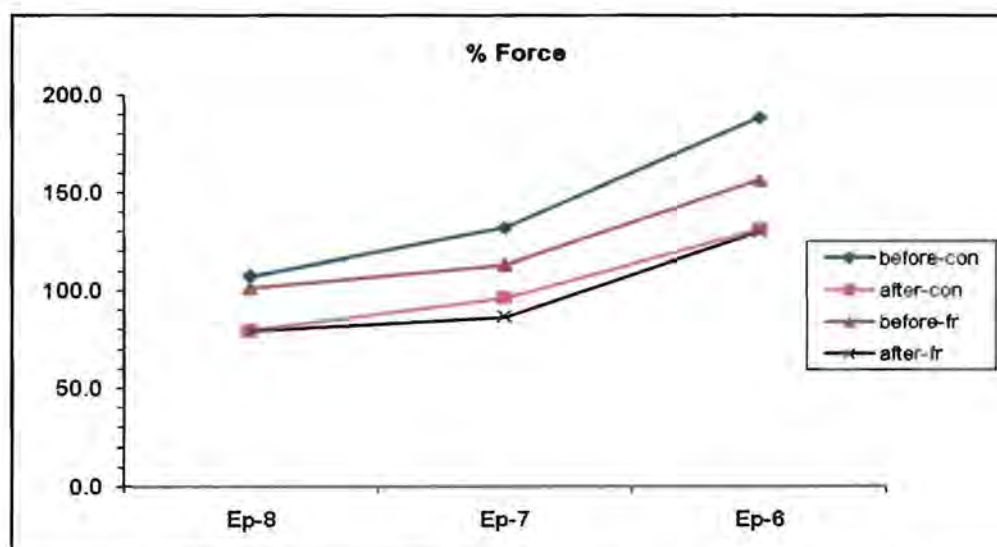
Dose-Response	Rate (% of baseline)		
	Ep 1×10^{-8}	Ep 1×10^{-7}	Ep 1×10^{-6}
before-control	106.52 ± 3.83	123.57 ± 1.67	137.52 ± 6.58
after-control	103.53 ± 0.71	112.86 ± 5.66	132.18 ± 12.25
before-fraction	103.37 ± 0.65	122.69 ± 2.82	148.54 ± 1.81
after-fraction	104.98 ± 0.75	125.43 ± 0.56	146.69 ± 2.24



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบอัตราการเต้นของ isolated right auricle ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น epinephrine ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before-control ◆, after-control ■, before-fraction ▲) และเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after-fraction ✕)

ตารางที่ 11 ผลของส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 ต่อแรงบีบตัวของ isolated right auricle ของหนูแรท ที่ให้ตัวกระตุ้น epinephrine ที่ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before-control, after-control, before-fraction) และเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after-fraction)

Dose-Response	Force (% of baseline)		
	Ep 1×10^{-8}	Ep 1×10^{-7}	Ep 1×10^{-6}
before-control	107.18 \pm 7.73	131.92 \pm 14.72	188.50 \pm 26.10
after-control	79.501 \pm 10.76	96.38 \pm 11.28	131.31 \pm 8.95
before-fraction	101.09 \pm 5.96	113.18 \pm 8.47	156.55 \pm 18.95
after-fraction	79.09 \pm 6.87	86.24 \pm 4.35	129.78 \pm 3.80

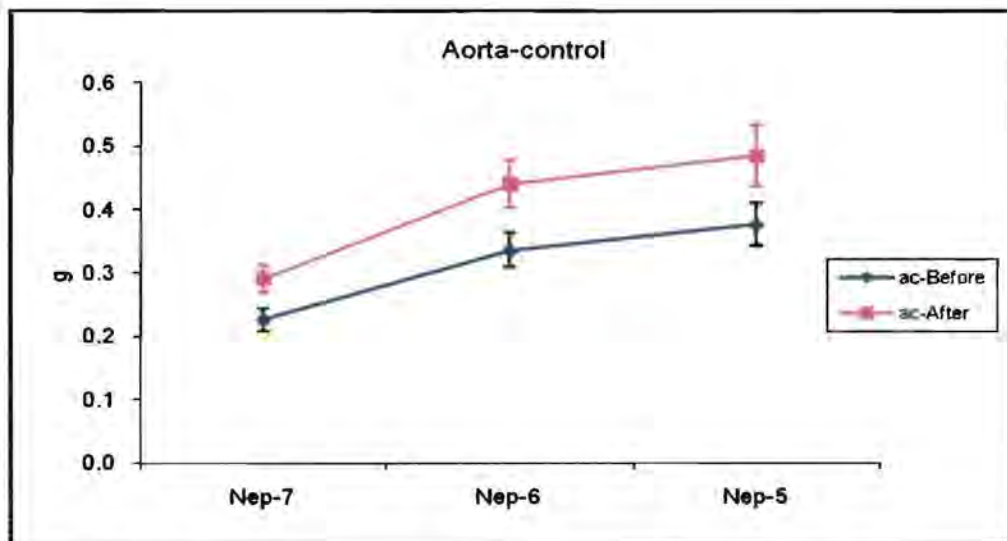


ภาพที่ 12 เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated right auricle ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น epinephrine ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before-control \blacklozenge , after-control \blacksquare , before-fraction \blacktriangle) และเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after-fraction -x-)

3.2 ผลการศึกษาใน isolated aorta ของหนูแรด

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated aorta ของหนูแรดต่อตัวกระตุ้น norepinephrine ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) หลังจากให้ชุดแรก (before) แล้วทดลองซ้ำชุดที่ 2 (after)

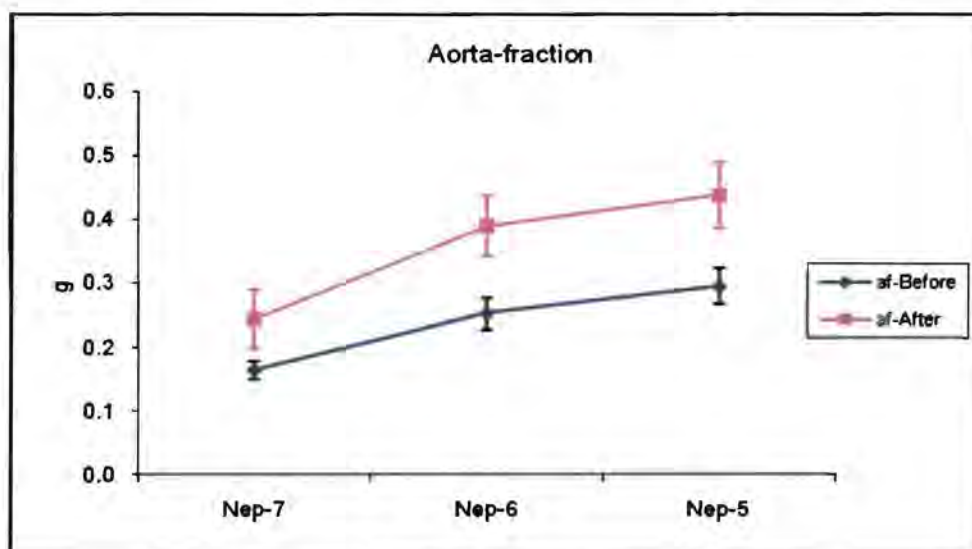
Dose-Response	Tension (% of baseline)		
	Nep 1×10^{-7}	Nep 1×10^{-6}	Nep 1×10^{-5}
before	0.23 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.38 ± 0.03
after	0.29 ± 0.02	0.44 ± 0.04	0.49 ± 0.05



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated aorta ของหนูแรดต่อตัวกระตุ้น norepinephrine ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) หลังจากให้ชุดแรก (before \blacklozenge) แล้วทดลองซ้ำชุดที่ 2 (after \blacksquare)

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated aorta ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น norepinephrine (NE) ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before) และเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after)

Dose-Response	NE 1×10^{-7}	NE 1×10^{-6}	NE 1×10^{-5}
before	0.16 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.03
after	0.24 ± 0.05	0.39 ± 0.05	0.44 ± 0.05

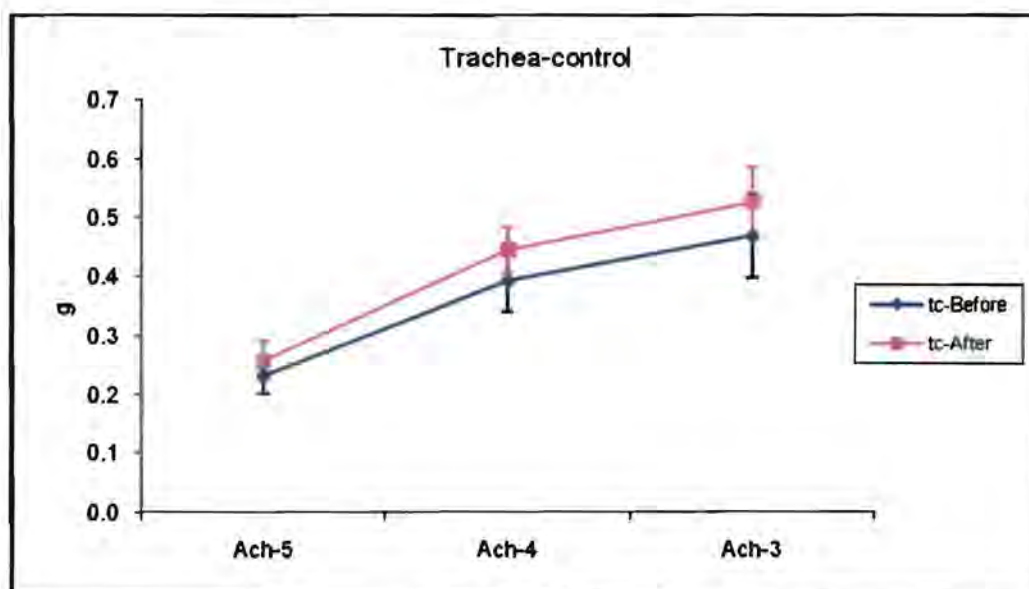


ภาพที่ 14 เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated aorta ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น norepinephrine ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before ■) และเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after ◆)

- 4)ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต่อหลอดลม (trachea)

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated trachea ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น Acetylcholine (ACh) ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) หลังจากให้ชุดแรก (before) แล้วทดลองซ้ำชุดที่ 2 (after)

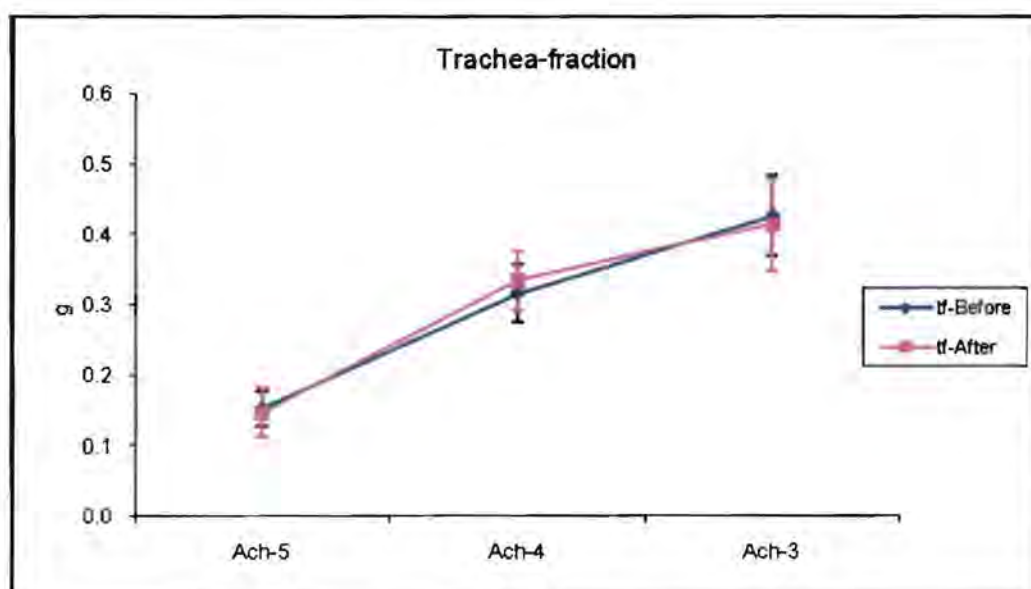
Dose-Response	Tension (% of baseline)		
	ACh 1×10^{-5}	ACh 1×10^{-4}	ACh 1×10^{-3}
before	0.23 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.47 ± 0.07
after	0.26 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.53 ± 0.06



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated trachea ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น Acetylcholine ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) หลังจากให้ชุดแรก (before \blacklozenge) แล้วทดลองซ้ำชุดที่ 2 (after \blacksquare)

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated trachea ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น Acetylcholine ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before) และเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after)

Dose-Response	Tension (% of baseline)		
	ACh 1×10^{-5}	ACh 1×10^{-4}	ACh 1×10^{-3}
before	0.15 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.43 ± 0.06
after	0.15 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.41 ± 0.06

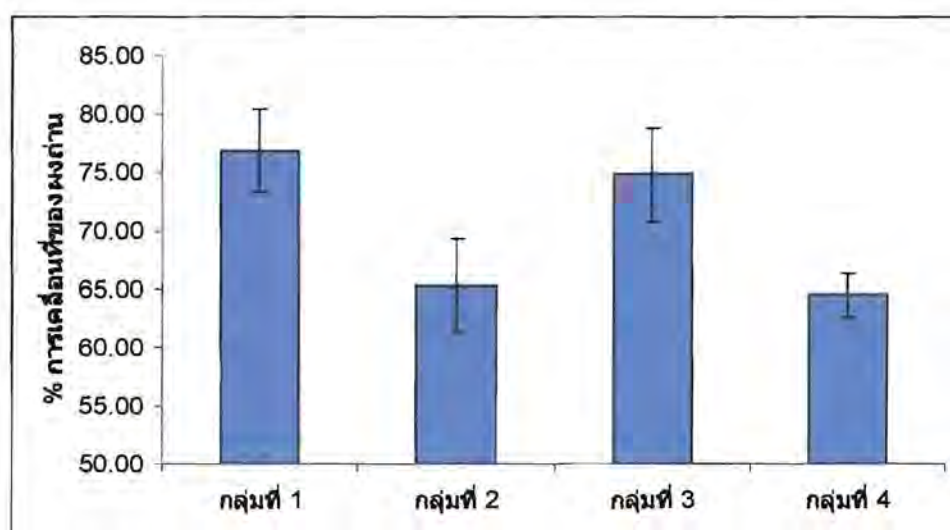


ภาพที่ 14 เปรียบเทียบแรงบีบตัวของ isolated trachea ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น Acetylcholine ที่ให้ 3 ความเข้มข้น (1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} Molar) แบบสะสม (cumulative dose) เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before ◆) และเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after ■)

- 5) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบของพืชจางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต่อระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal system)
- 5.1 การทดลอง *in vivo* ในหนูเม้าส์โดยดูการบีบตัวของลำไส้จากการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้

ตารางที่ 16 ผลต่อการบีบตัวของลำไส้ในหนูเม้าส์ (*in vivo* study) (group 1 = 2% tragacanth mucilage, group 2 = 0.1 LD50 ของ KVV F1.2.2 ใน 2% tragacanth mucilage, group 3 = 0.2 LD50 ของ KVV F1.2.2 ใน 2% tragacanth mucilage, group 4 = 0.4 LD50 ของ KVV F1.2.2 ใน 2% tragacanth mucilage)

group	% การเคลื่อนที่ของผงถ่าน
1	76.87 ± 3.61
2	65.37 ± 4.09
3	74.80 ± 4.03
4	64.50 ± 1.87

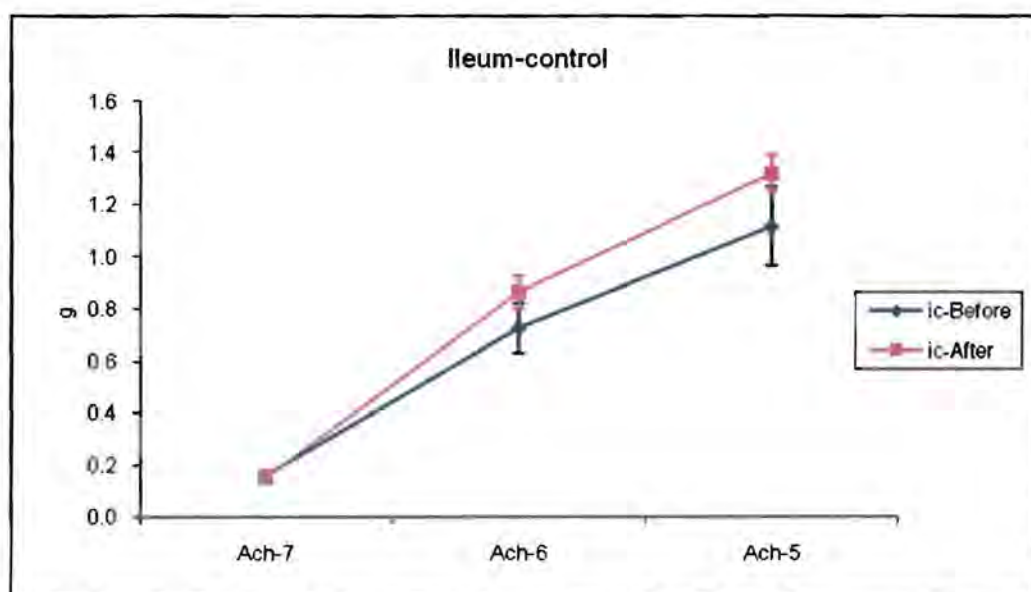


ภาพที่ 15 ผลของส่วนของพืชจาง F1.2.2 ต่อการบีบตัวของลำไส้ในหนูเม้าส์ (*in vivo* study) (group 1 = 2% tragacanth mucilage, group 2 = 0.1 LD50 ของ KVV F1.2.2 ใน 2% tragacanth mucilage, group 3 = 0.2 LD50 ของ KVV F1.2.2 ใน 2% tragacanth mucilage, group 4 = 0.4 LD50 ของ KVV F1.2.2 ใน 2% tragacanth mucilage)

5.2 การทดลองใน isolated ileum ของหนูแรท

ตารางที่ 17 การตอบสนองของ isolated ileum ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น acetylcholine ที่ให้ 3 ความเข้มข้นแบบสะสม (cumulative dose) หลังจากให้ชุดแรก (before) แล้วทดลองซ้ำชุดที่ 2 (after)

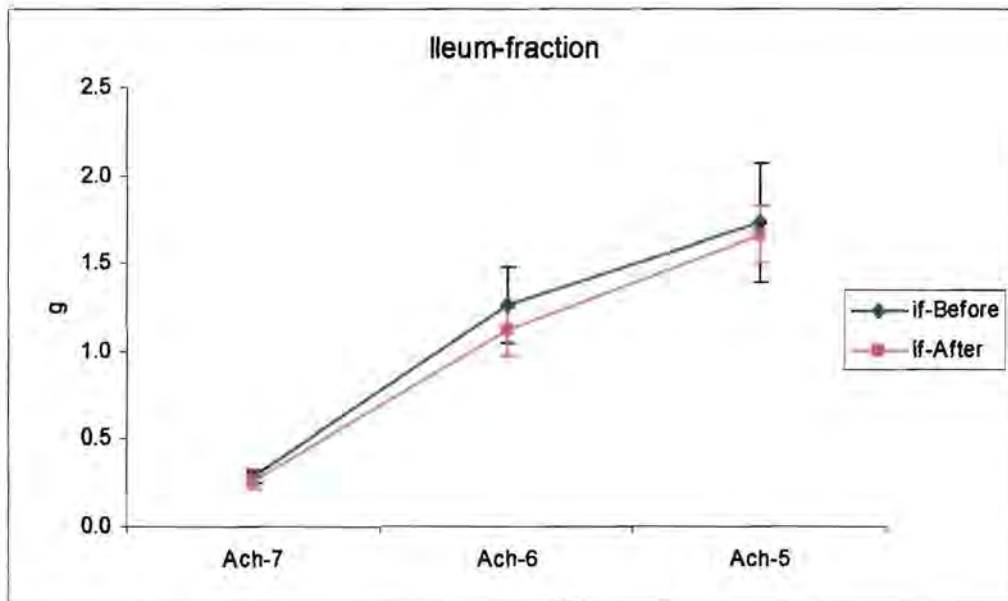
Dose-Response	Tension (% of baseline)		
	ACh 1×10^{-7}	ACh 1×10^{-6}	ACh 1×10^{-5}
before	0.16 ± 0.01	0.73 ± 0.10	1.12 ± 0.15
after	0.15 ± 0.02	0.86 ± 0.06	1.32 ± 0.07



ภาพที่ 16 การตอบสนองของ isolated ileum ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น acetylcholine ที่ให้ 3 ความเข้มข้นแบบสะสม (cumulative dose) หลังจากให้ชุดแรก (before \blacklozenge) แล้วทดลองซ้ำชุดที่ 2 (after \blacksquare)

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบการตอบสนองของ isolated ileum ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น acetylcholine (ACh) ที่ให้ 3 ความเข้มข้นแบบสะสม เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before) กับการตอบสนองเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after)

Dose-Response	Tension (% of baseline)		
	ACh 1×10^{-7}	ACh 1×10^{-6}	ACh 1×10^{-5}
before	0.29 ± 0.03	1.26 ± 0.21	1.73 ± 0.25
after	0.27 ± 0.06	1.11 ± 0.16	1.66 ± 0.18



ภาพที่ 17 เปรียบเทียบการตอบสนองของ isolated ileum ของหนูแรทต่อตัวกระตุ้น acetylcholine ที่ให้ 3 ความเข้มข้นแบบสะสม เมื่อไม่มีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (before \blacklozenge) และเมื่อมีส่วนของพิษงูจงอาง F1.2.2 (after \blacksquare)

2. การศึกษาพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (TOXICOLOGICAL STUDIES)
 - 1) การหาค่าความเป็นพิษ (lethality)
 - 1.1 ผลการหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจงอาง (crude venom)

ตารางที่ 19 ผลการหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจงอาง (crude venom) (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*					

*ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่ได้ทำการฉีดให้สัตว์ทดลองเนื่องจากที่ความเข้มข้น 49 ไมโครกรัมสัตว์ทดลองตายหลังฉีดพิษไม่เกินครึ่งชั่วโมง

$$\log LD50 = \log \text{ of lower dilution} + \{ \log \text{ of dilution factor} \times [50\% \text{-mortality lower} / \text{mortality upper- lower}] \}$$

$$= \log 25 + \{ \log 1.4 \times [50-20/100-20] \}$$

$$= 1.3979 + \{ 0.146128 \times 0.375 \}$$

$$= 1.3979 + 0.054798$$

$$\log LD50 = 1.4527$$

$$LD50 = 28.36 \mu\text{g/mouse}$$

1.2 ผลการหาค่าความเป็นพิษของส่วนของพิษของพิษงูจงอางที่แยกด้วย Q-Sepharose ได้ 7 fractions (KV 1 ถึง KV 7)

ตารางที่ 20 Preliminary test ฉีดพิษแต่ละ fraction 3 ความเข้มข้น, ความเข้มข้นละ 3 ตัว (S = Survival, D = Death)

Fraction No.	OD 280	mg/ml	mg/mouse	0.2 ml	เจือจาง 1:2	เจือจาง 1:4
KV 1	1.1629	1.06*	0.053	D	D	S
KV 2	0.5629	0.51	0.102	S	S	S
KV 3	0.4199	0.38	0.076	S	S	S
KV 4	0.4258	0.39	0.078	S	S	S
KV 5	0.4844	0.44	0.088	S	S	S
KV 6	0.1229	0.11	0.022	S	S	S
KV 7	0.1642	0.15	0.03	S	S	S

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

ตารางที่ 21 เจือจางพิษพีคที่ 1 (KV 1) ที่ความเข้มข้นระหว่างการเจือจางที่ 1:2 และ 1:4 โดยมี dilution factor เท่ากับ 1.4 (S = Survival, D = Death)

Dose $\mu\text{g}/\text{mouse}$			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

$\log \text{LD}_{50}$ = \log of lower dilution + $\{\log$ of dilution factor X $[\text{50\%-mortality lower/ mortality upper- lower}]$

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

= $0.984 + 0.1096$

$\log \text{LD}_{50}$ = 1.094

LD_{50} ของ KV 1 = 12.4 $\mu\text{g}/\text{mouse}$

1.3. ผลการหาค่าความเป็นพิษ ของพิษงูจงอางจากการแยกส่วน KV 1 ด้วย Cellulofine GCL-1000 sf column ได้ 3 fractions (KV 1.1 ถึง KV 1.3)

ตารางที่ 22 Preliminary test ฉีดพิษแต่ละฟีด 3-4 ความเข้มข้น ใช้หนูเม้าส์ ความเข้มข้นละ 3 ตัว (S = Survival, D = Death)

Fraction No.	OD 280	mg/ml	mg/mouse	0.2 ml	เจือจาง 1:2	เจือจาง 1:4	เจือจาง 1:8
KV 1.1	0.8925	0.80*	0.040	S	S	S	
KV 1.2	0.7377	0.66*	0.044	D	D	D	S
KV 1.3	0.4364	0.39*	0.040	S	S	S	

*เจือจางพิษงูแต่ละฟีดให้มีความเข้มข้นมากกว่า 2LD₅₀ ของพิษงูก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (2 x 12.4=24.8 µg/ml) ในที่นี้ใช้ความเข้มข้น 40 µg/ml

ตารางที่ 23 เจือจางพิษ fraction KV 1.2 ที่ความเข้มข้นระหว่างการเจือจางที่ 1:4 และ 1:8 โดยมี dilution factor เท่ากับ 1.4 (S = Survival, D = Death)

Dose µg/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 LD₅₀ = log of lower dilution + {log of dilution factor X [50%-mortality lower/ mortality upper- lower]}

= log 5.6 + {log 1.4 X [50-25 75-25]}

= 0.74818 + 0.07306

log LD₅₀ = 0.8212

LD₅₀ ของ KV 1.2 = 6.63 µg/mouse

1.4 ผลการหาค่าความเป็นพิษ ของพิษงูจงอางจากการแยกส่วน KV 1.2 ด้วย SP-Sepharose column ได้ 6 fractions (KV 1.2.1 ถึง KV 1.2.6)

ตารางที่ 24 Preliminary test; ใช้หนูเม้าส์ ความเข้มข้นละ 3 ตัว (S = Survival, D = Death)

Fraction No.	OD 280	mg/ml	mg/mouse	0.2 ml	เจือจาง 1:2	เจือจาง 1:4
KV 1.2.1	0.0944	0.085	0.0170	D	D	S
KV 1.2.2	0.1817	0.163*	0.0163	D	D	S
KV 1.2.3	0.0927	0.083	0.0166	D	D	S
KV 1.2.4	0.0895	0.080	0.0160	D	D	S
KV 1.2.5	0.0455	0.041	0.0082	S		
KV 1.2.6	0.0466	0.042	0.0084	S		

*เจือจางพิษงู 2 เท่าเพื่อให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับ Fraction 1-4 ซึ่งปริมาณโปรตีนดังกล่าวมากกว่า 2LD50 ของพิษงูก่อนการทำให้เป็นริสุทธ์ ($2 \times 6.6 = 13.26 \mu\text{g/m}$) ในที่นี้ใช้ความเข้มข้นประมาณ $16 \mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 25 การหาค่าความเป็นพิษของส่วนพิษงูจงอาง KV 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
6.09	2	1	3	1	25
8.5	1	2	1	3	75

$$\begin{aligned} \log \text{LD50} &= \log \text{ of lower dilution} + \{ \log \text{ of dilution factor} \times [50\% \text{-mortality} \\ &\quad \text{lower/ mortality upper- lower}] \\ &= \log 6.09 + \{ \log 1.4 \times [50-25/75-25] \} \\ &= 0.7846 + 0.07306 \end{aligned}$$

$$\log \text{LD50} = 0.8576$$

$$\text{LD50 ของ KV 1.2.1} = 7.2 \mu\text{g/mouse}$$

ตารางที่ 26 การหาค่าความเป็นพิษของส่วนพิษงูจาง KV 1.2.2 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose (S = Survival, D = Death)

Dose µg/mouse			total		% mortality
	S	D	S	D	
2.92	3	0	6	0	0
4.07	3	0	3	0	0
5.84	0	3	0	3	100
8.15	0	3	0	6	100

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

$$\log LD_{50} = 0.6826$$

$$LD_{50} \text{ ของ KV 1.2.2} = 4.8 \text{ } \mu\text{g/mouse}$$

ตารางที่ 27 การหาค่าความเป็นพิษของส่วนพิษงูจาง KV 1.2.3 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose (S = Survival, D = Death)

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

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

$$LD_{50} = 0.6911$$

$$LD_{50} \text{ ของ KV 1.2.3} = 4.91 \text{ } \mu\text{g/mouse}$$

ตารางที่ 28 การหาค่าความเป็นพิษของพิษงูจาง KV 1.2.4 ที่ผ่านคอลัมน์ SP-Sepharose (S = Survival, D = Death)

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

$$\begin{aligned}
 \text{LD}_{50} &= \log \text{ of lower dilution} + \{ \log \text{ of dilution factor} \times [50\% \text{-mortality} \\
 &\quad \text{lower/ mortality upper- lower}] \\
 &= \log 4.0 + \{ \log 1.4 \times [50-0/100-0] \} \\
 &= 0.602 + 0.07306 \\
 \text{LD}_{50} &= 0.6751 \\
 \text{LD}_{50} \text{ ของ KV 1.2.4} &= 4.73 \mu\text{g/mouse}
 \end{aligned}$$

- 2) พิษวิทยาของส่วนของพิษงูจาง KV 1.2.2 ต่อระบบภายในร่างกาย (systemic toxicity test) แบบเฉียบพลัน (acute toxicity) และพิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity) ตามข้อกำหนดของ WHO (1993) และ OECD (2001)

2.1 การศึกษา single dose toxicity

ฉีด F1.2.2 ปริมาตร 0.1 ml เข้ากล้ามเนื้อเนื้อขาหลังหนูเม้าส์

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ Normal saline

กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 2.6 µg/mouse

กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 3.6 µg/mouse

กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 5.0 µg/mouse

กลุ่มที่ 5 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 7.1 µg/mouse

พบว่ากลุ่มที่ 1-3 สัตว์ทดลองมีชีวิตรอดจนครบ 14 วัน ส่วนกลุ่มที่ 4-5 สัตว์ทดลองตายภายใน 1 ชั่วโมง หลังฉีด F1.2.2 เมื่อครบตามระยะเวลา euthanized สัตว์ทดลอง ตัดอวัยวะได้แก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด ม้าม ตรวจทางพยาธิวิทยา ได้ผลดังนี้

Pathological Findings: NSS, F1.2.2 (2.6 µg, 3.6 µg, 5.0 µg, and 7.1 µg)

When we administrated different amount of venom F1.2.2, at 2.6 µg, 3.6 µg, 5.0 µg, and 7.1 µg and used control as NSS, we observed significant change in multiple major organs including liver, kidney, heart, lung, spleen, and genital organs.

Liver tissue was in well recognized architecture with intact central vein and unremarkable change of portal triads. Hepatic sinusoids and regional Kuffer Cells had no significant change. Nonspecific congestion was observed, possible nonspecific post-mortem change.

Kidneys showed well demarcated cortex and medulla area with nonspecific vascular congestion. Glomeruli were intact with no significant change in renal tubules and blood vessels. Interstitium was unremarkable. No significant histopathologic change is found.

Heart muscle revealed no evidence of ischemia or infarction.

Endocardium was smooth and intact. Pericardium was unremarkable. Sampling lung tissue exhibited nonspecific congestion without occupying lesion. Alveoli were empty in good shape with thin interstitium and capillaries.

Broncheal tree had no significant change. Pleura was thin and no abnormal infiltration.

Spleen had no significant histologic change. Congestion in splenic parenchyma was remarkable with intact lymphoid tissue.

Testes showed well preserved seminiferous tubules with active secondary spermatogenesis.

No abnormal cellular infiltration was detected.

Ovaries were unremarkable.

2.2 การศึกษา repeated-dose toxicity

ฉีด F1.2.2 ปริมาตร 0.1 ml เข้ากล้ามเนื้อขาหลังวันละครั้งติดต่อกัน 28 วัน

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ Normal saline

กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.1 LD50 (0.4 µg)

กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.2 LD50 (0.8 µg)

กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.4 LD50 (1.6 µg)

เมื่อครบตามระยะเวลา euthanized สัตว์ทดลอง ตัดอวัยวะได้แก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด ม้าม และอวัยวะสืบพันธุ์ ตรวจทางพยาธิวิทยา พบว่าเมื่อให้ F1.2.2 ทุกวันจนครบ 28 วัน กลุ่มที่ 1-3 สัตว์ทดลองทั้ง

เพศผู้และเพศเมียมีชีวิตรอด ทำการเก็บเลือดเพื่อตรวจค่าเม็ดเลือด และเก็บอวัยวะต่างๆ เพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไป ในขณะที่กลุ่มที่ 4 สัตว์ทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมียตายในวันที่ 5 หลังได้รับสารทดสอบ แต่ไม่สามารถเก็บเลือดได้ เก็บได้เพียงอวัยวะต่าง ๆ เพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยาเท่านั้น

ตารางที่ 29 ผลของพิษงูจงอาง F1.2.2 ที่ให้ติดต่อกัน 28 วัน (subacute toxicity) ในหนูเม้าส์ต่อเม็ดเลือด

Group	% Differential count					
	Neutrophils	Band	Eosinophils	Basophils	Lymphocytes	Monocytes
NSS/Male	38.4	0	1.6	0	59.6	0.4
NSS/Female	27.4	0	3	0	69.2	0.2
0.1 LD50/Male	37.5	0	2.5	0	60	0
0.1 LD50/Female	26.4	0	1.8	0	71.6	0.2
0.2 LD50/Male	34	0	2.4	0	62.4	1.2
0.2 LD50/Female	33	0	1	0	65	1
0.4 LD50/Male	พบสัตว์ทดลองตายในวันที่ 5 หลังฉีดพิษงู (ไม่สามารถเก็บเลือดมาตรวจได้)					
0.4 LD50/Female	พบสัตว์ทดลองตายในวันที่ 5 หลังฉีดพิษงู (ไม่สามารถเก็บเลือดมาตรวจได้)					

ตารางที่ 30 ผลของพิษงูจงอาง F1.2.2 ที่ให้ติดต่อกัน 28 วัน (subacute toxicity) ในหนูเม้าส์ต่อเม็ดเลือด (ต่อ)

Group	R.B.C.	Hemoglobin	Hematocrit	Platelets	W.B.C
	per μ l ($\times 10^6$)	g/dl	%	per μ l ($\times 10^3$)	per μ l
NSS/Male	6.29	12.00	38.80	469.80	4420.00
NSS/Female	6.8	13.0	41.8	466.4	4700.0
0.1 LD50/Male	6.08	11.80	37.80	557.40	3340.00
0.1 LD50/Female	6.24	12	38.6	434.8	4280
0.2 LD50/Male	6.82	10.60	38.80	552.40	5740.00
0.2 LD50/Female	6.56	11.8	38.2	444.4	5800
0.4 LD50/Male	พบสัตว์ทดลองตายในวันที่ 5 หลังฉีดพิษงู (ไม่สามารถเก็บเลือดมาตรวจได้)				
0.4 LD50/Female	พบสัตว์ทดลองตายในวันที่ 5 หลังฉีดพิษงู (ไม่สามารถเก็บเลือดมาตรวจได้)				

Pathological Findings: NSS, F1.2.2 (0.1, 0.2 and 0.4 LD50)

At 0.1, 0.2 and 0.4 LD50 in both male and female groups, there was no significant change in multiple major organs including liver, kidney, heart, lung, spleen, and genital organs.

Hepatic parenchyma was in well recognized architecture with intact central vein and unremarkable change of portal triads. Hepatic sinusoids and their neighbors (Kuffer Cells) had no significant change. Nonspecific congestion was observed, which was more likely be post mortem change.

Kidneys showed well demarcated cortex and medulla area with nonspecific vascular congestion. Glomeruli were intact with no significant change in renal tubules and blood vessels.

Interstitium was unremarkable. Four functional components of kidney were examined and founded no serious pathologic condition.

Heart muscle revealed no evidence of ischemia or infarction.

Endocardium was smooth and intact. Pericardium was unremarkable. Sampling lung tissue exhibited nonspecific congestion without occupying lesion.

Alveoli were empty in good shape with thin interstitium and capillaries. Broncheal tree had no significant change. Pleura was thin and no abnormal infiltration.

Spleen had no significant histologic change. Congestion in splenic parenchyma was remarkable with intact lymphoid tissue.

Testes showed well preserved seminiferous tubules with active secondary spermatogenesis. No abnormal cellular infiltration was detected.

Ovaries were in normal histology.

4) ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (Mutagenicity) ของส่วนของพิษงูจงอาง KV 1.2.2 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และ KV 5 ที่แสดงฤทธิ์ anticancer และ antimicrobial

1. การทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์

จากการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของส่วนของพิษงูจงอาง KV 1.2.2 และ KV 5 โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสถานะที่มีและไม่มี S9 พบว่าสาร KV 1.2.2 และ KV 5 ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 และ ดังรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

สำหรับฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของ positive control ของสารมาตรฐาน 2-AA, AF-2 และ 4-NQO ดังแสดงในตารางที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ และดังรูปที่ 3

ตารางที่ 31 จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของส่วนของพิษงู จงอาง KV 1.2.2

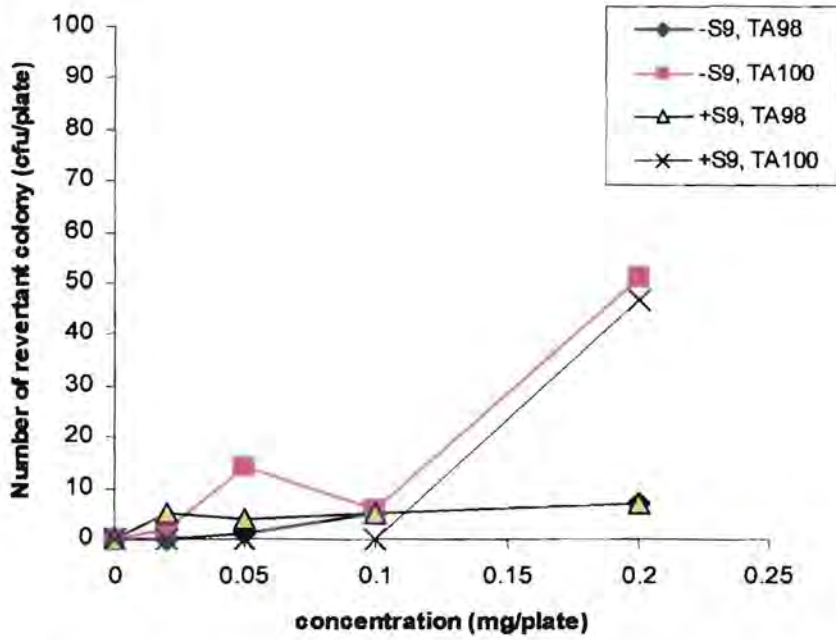
สารทดสอบ KV 1.1.2 (mg/plate)	-S9		+S9	
	TA98	TA100	TA98	TA100
0	13	124	20	132
0.02	13	126	25	128
0.05	15	137	23	125
0.1	19	130	25	128
0.2	20	174	26	179

หมายเหตุ ค่าตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก triplicate

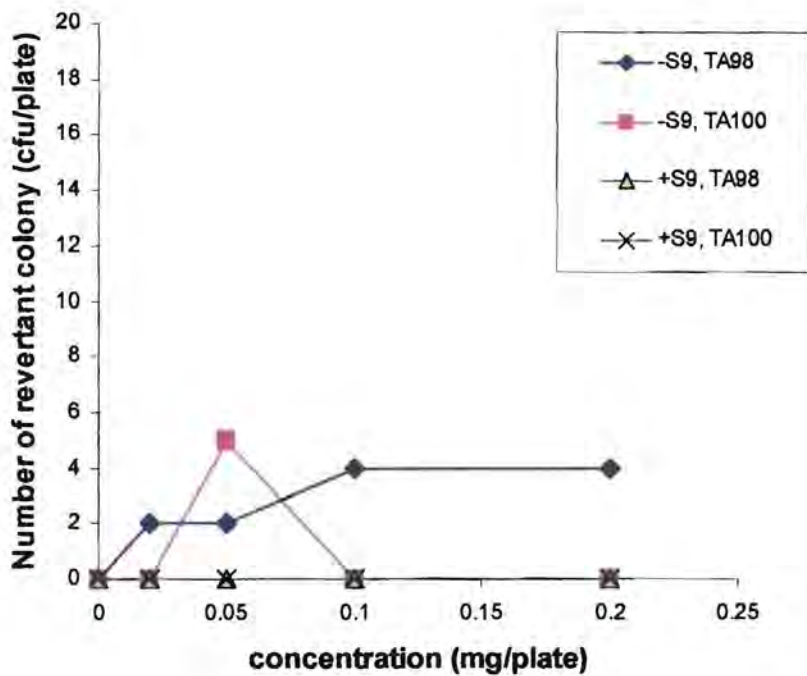
ตารางที่ 32 จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของส่วนของพิษงู จงอาง KV 5

สารทดสอบ KV 1.1.2 (mg/plate)	-S9		+S9	
	TA98	TA100	TA98	TA100
0	12	119	17	131
0.02	14	110	12	122
0.05	14	124	15	118
0.1	16	118	10	103
0.2	16	118	13	90

หมายเหตุ ค่าตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก triplicate



ภาพที่ 20 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของส่วนของพิษงูจงอาง KV 1.2.2



ภาพที่ 21 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของส่วนของพิษงูจงอาง KV 5

ตารางที่ 33 จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารมาตรฐาน

2-AA

2-AA ($\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{plate}$)	TA98	TA100
0.25	141	166
0.5	465	921
1.0	758	1298

หมายเหตุ ค่าตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก triplicate

ตารางที่ 34 จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารมาตรฐาน

AF-2

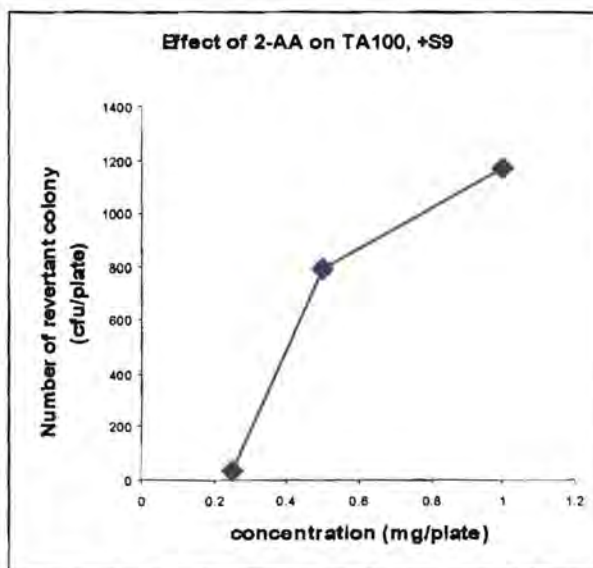
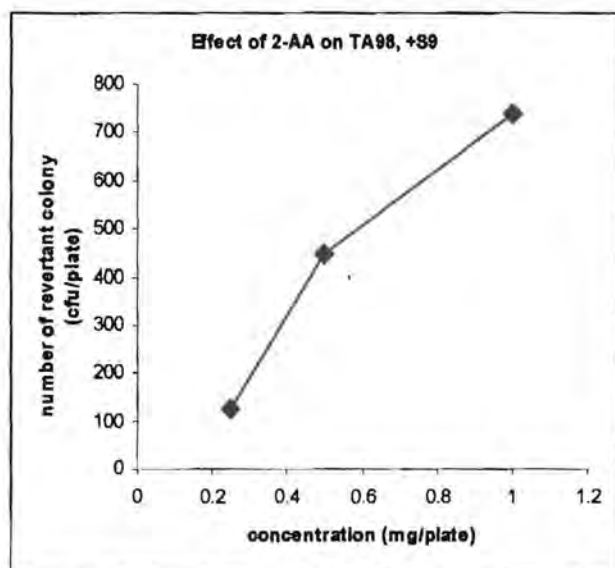
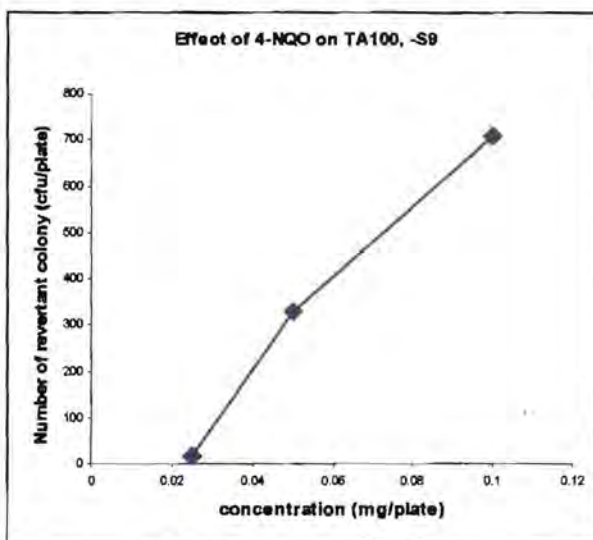
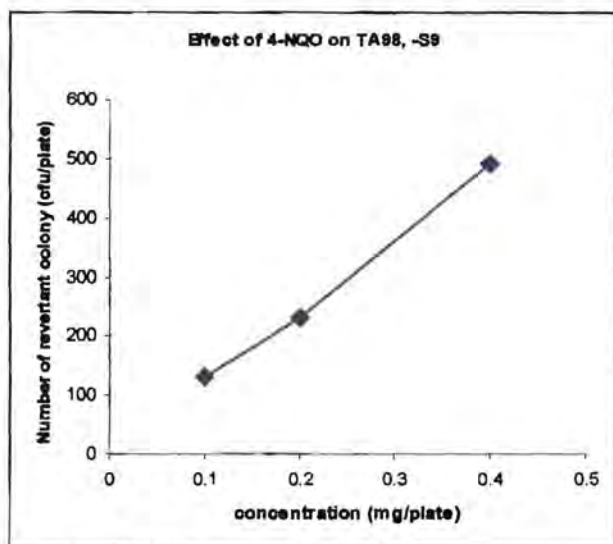
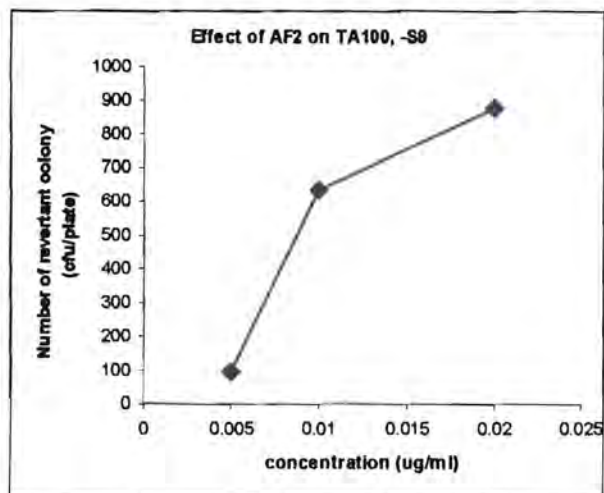
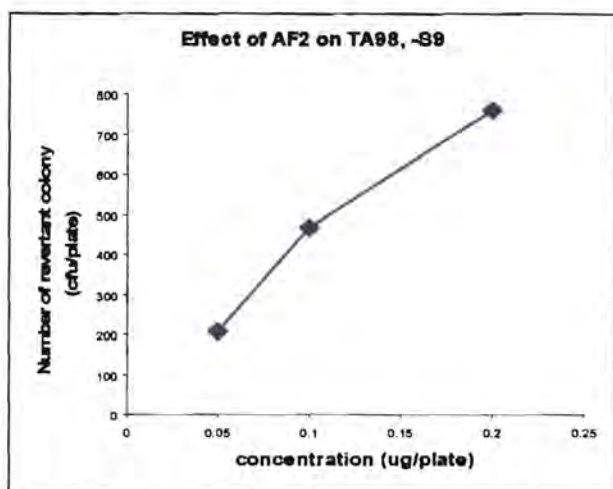
AF-2 ($\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{plate}$)	-S9	
	TA98	TA100
0.005	-	213
0.01	-	754
0.02	-	995
0.05	220	-
0.1	480	-
0.2	771	-

หมายเหตุ ค่าตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก triplicate

ตารางที่ 35 จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารมาตรฐาน

4-NQO (ค่าตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก triplicate)

4-NQO ($\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{plate}$)	-S9	
	TA98	TA100
0.025	-	138
0.05	-	449
0.1	142	826
0.2	244	-
0.4	504	-



ภาพที่ 22 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานชนิดต่างๆ

อภิปรายผลการศึกษา

เภสัชวิทยา

ในการศึกษาส่วนที่แยกได้จากพิษงูจงอาง (crude venom) นั่นคือ F1.2.2 ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทต่อกับกล้ามเนื้อ (โดยใช้ isolated mouse's phrenic nerve-diaphragm เป็นรูปแบบการศึกษา) ในสุนัขที่วางยาสลบ พบว่าเมื่อให้ F1.2.2 ในขนาด 6, 18, 54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ เข้าหลอดเลือดดำในครึ่งชั่วโมงแรก ความดันเลือดลดลง สัมพันธ์กับขนาดของ F1.2.2 ถ้าขนาด F1.2.2 สูงจะลดความดันเลือดมากจนสุนัขตาย ขณะที่ความดันเลือดลดลง อัตราการเต้นของหัวใจจะเพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นผลของ F1.2.2 โดยตรงต่อหัวใจ เพราะมีรายงานว่าในพิษงูจงอางมีสารพิษต่อหัวใจ ในปี ค.ศ. 1999^{13, 14} มีรายงานสารสำคัญที่เป็นสารพิษต่อหัวใจ (cardiotoxic factor) จากพิษงูจงอางของอินเดีย (Indian snake King Cobra *Ophiophagus hannah*) และมีการแยกสารสำคัญหลายชนิดจากพิษงู สารจากพิษงูบางชนิดมีคุณสมบัติ cardiotoxic/anti-arrhythmic และพบผลการศึกษาซึ่งสอดคล้องกันใน rat's isolated right auricle ซึ่งพบว่า F1.2.2 ลดแรงบีบตัวของ isolated right auricle ที่ตอบสนองต่อตัวกระตุ้น epinephrine แต่ไม่ได้ศึกษาผลโดยตรงของ F1.2.2 ต่อแรงบีบตัวของหัวใจ อัตราการเต้นของหัวใจที่เพิ่มขึ้นเป็นการตอบสนองของร่างกาย (compensatory mechanism) ด้วยเช่นกันเพื่อให้ความดันเลือดกลับมาเป็นปกติ ผลต่อความดันเลือดไม่ได้เป็นผลมาจากหลอดเลือดเนื่องจาก F1.2.2 ไม่มีผลต่อ rat's isolated blood vessel แสดงว่าไม่มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบ จะเห็นว่า F1.2.2 ไม่มีผลต่อ rat's isolated trachea เช่นกัน ส่วนผลต่อการบีบตัวของลำไส้โดยการเคลื่อนที่ของผนังในหนูเม้าส์ พบว่าลดลงประมาณ 15% ในกลุ่มที่ให้ F1.2.2 ขนาด 0.1 และ 0.4 LD₅₀ แต่ไม่มีนัยสำคัญ จึงอาจไม่ใช่ specific effect เพราะการศึกษาใน rat's isolated ileum พบว่า F1.2.2 ไม่มีผลต่อการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก

ผลต่อการทำหน้าที่ของไตพบว่าฤทธิ์ของพิษงูจงอางในขนาด 0.05, 0.1 0.2 mg/Kg และ F1.2.2 ในขนาด 6, 18, 54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มีผลคล้ายคลึงกัน พบว่าลดอัตราการไหลของเลือดและพลาสมา ลดการกรองที่โกลเมอรูลัส ลดการไหลของปัสสาวะสัมพันธ์กับขนาดของพิษงู และ F1.2.2 แม้ว่าจะมีการเพิ่มขึ้นบางจุดเวลา แต่มีความแปรปรวนมาก ผลนี้เป็นผลสืบเนื่องจากการลดความดันเลือด พิษงูจงอาง (crude venom) ผลการศึกษา Motor Coordination โดย Rotarod Test ไม่พบว่า F1.2.2 มีผลต่อการเคลื่อนไหวของหนูเม้าส์ และยังพบว่า F1.2.2 ลดการออกฤทธิ์ของ pentobarbital sodium ซึ่งกดประสาทส่วนกลางในหนูเม้าส์ ผลนี้ตรงข้ามกับรายงานการพบโปรตีนชนิดใหม่ ohanin จากพิษงูจงอางซึ่งมีฤทธิ์ชักนำให้ลดการเคลื่อนไหวในหนูเม้าส์ และทำให้เกิดอาการปวดเพิ่มขึ้น (dose-dependent hyperalgesic effect) โดยออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง^{15, 16} และพบสารที่ออกฤทธิ์เป็นยาต้านการชัก (anticonvulsant)¹⁷

พิษวิทยา

ในการหาค่าความเป็นพิษ (Lethality) พบว่า LD50 ของ crude venom = 28.36 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, F1 = 12.4 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, F1.2 = 6.63 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, F1.2.2 = 4.8 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ แสดงถึงส่วนที่แยกจากพิษงูจะมีความเป็นพิษสูงกว่า crude venom แต่ละ fraction มีคุณสมบัติอย่างไรได้รายงานไว้ในโครงการที่ 1 (Study of Quality Specification of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom for Standardization)

ผลการศึกษา single dose toxicity ซึ่งเป็น acute toxicity พบว่า F1.2.2 ขนาด 2.6, 3.6, 5.0 และ 7.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ไม่ทำให้หนูเม้าส์ตายและการตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญของอวัยวะสำคัญ ได้แก่ liver, kidney, heart, lung, spleen, and genital organs ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญ

ผลการศึกษา multiple dose toxicity หรือ subacute toxicity โดยให้ F1.2.2 วันละครึ่งติดต่อกัน 28 วัน พบว่า F1.2.2 ขนาด 0.1 LD50 (0.4 μg), 0.2 LD50 (0.8 μg), ไม่ทำให้หนูเม้าส์เพศผู้และเพศเมียตาย แต่หนูเม้าส์ทั้งเพศผู้ และเพศเมียที่ได้รับ F1.2.2 0.4 LD50 (1.6 μg) ได้ตายในวันที่ 5 ผลการตรวจเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาการก่อกลายพันธุ์ ด้วยวิธี Ames' Test โดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสภาวะที่มี S9 และสภาวะที่ไม่มี S9 เปรียบเทียบกับ สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 4 nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) พบว่า KV ทั้ง F1.2.2 (เป็น fraction ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง neuromuscular junction) และ F5 (เป็น fraction ที่มีศักยภาพ) ไม่เพิ่มจำนวน revertant colony แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์

สรุป

มีการนำพิษงูมาใช้ในทางการแพทย์มาอย่างยาวนานแล้วยืนยันจากหลักฐานในตำรายาอายุรเวท และตำรายาแผนดั่งเดิมหลายประเทศ และมีผู้สนใจศึกษาพัฒนายาจากพิษงูมาเป็นเวลานานเช่นกัน มีการแยก biomolecules จากพิษงูหลายชนิด มีรายงานการแยกสารออกฤทธิ์จากพิษงูจงอาง เช่น ยาละลายลิ่มเลือดชนิดใหม่ (novel fibrinolytic peptide หรือ Hannahpep)^{18, 19, 20} ยารักษา มะเร็ง ยาลดอาการปวด²¹ ที่มีฤทธิ์คล้ายคลึงกับ morphine ในการศึกษาวิจัยที่รายงานนี้ได้แยกพิษงูจงอางได้ F1.2.2 ที่มีฤทธิ์ neuromuscular blocking action เมื่อศึกษาเภสัชวิทยา และพิษวิทยาของ F1.2.2 พบว่าไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นอันตรายร้ายแรงนอกจากอาจมีฤทธิ์ต่อหัวใจ ซึ่งในการศึกษานี้ไม่แสดงฤทธิ์ที่มีนัยสำคัญ แต่ควรระวัง F1.2.2 ในขนาดที่ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (2.6, 3.6, 5.0 และ 7.1 µg/mouse) และพิษกึ่งเฉียบพลัน ((0.4, 0.8 และ 1.6 µg) ไม่มีพิษที่มีนัยสำคัญ ดังนั้นน่าจะนำ F1.2.2 ไปศึกษาพัฒนาต่อไปให้ได้ยาที่มีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อ (muscle relaxant)

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Stocker KF. Research, Diagnostic and Medicinal uses of snake venom enzymes. In: Enzymes from snake venom. Bailey GS (ed.). Colorado: Fort Collins. Alaken Inc., 1998: 705-36
2. Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, Jerusalinsky DA. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 1998; 36(11): 1635-40
3. Tan NH, Saifuddin MN. Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus Hannah* (king cobra) venom and venom fractions. *Toxicon* 1989; 27(6): 689-95.
4. Tan NH, Saifuddin MN. Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Ophiophagus Hannah* (king cobra). *Toxicon* 1990; 28(4): 385-92.
5. Joubert F.J. Snake venom toxins: The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom. *Biochim Biophys acta* 1973;317:85-98.
6. Tan NH, Saifuddin MN. Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom and venom fractions. *Toxicon* 1989;27(6):689-695
7. Chang C, Huang T, Kuo K, Chen S, Huang K, Chiou S. Sequence characterization of a novel α -neurotoxin from the king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom. *Biochem Biophys rese comm.* 1993; 191(1):214-223.
8. Lin S, Chang L, Chang C. Disulfide isomers of α -neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom *Biochem Biophys rese comm.* 1999; 254:104-108.
9. Chang L, Liou J, Lin S, Huang H. Purification and characterization of a neruotoxin from the venom of *Ophiophagus hanna* (king cobra) venom. *Biochem Biophys rese comm.* 2001; 294:574-578.
10. De P, Dasgupta SC, Gomes A. A lethal neurotoxic protein from Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Indian J Exp Biol.* 2002; 40(12):1359-64.
11. He YY, Lee WH, Zhang Y. Cloning and purification of alpha-neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon.* 2004; 44(3):295-303.
12. OECD guidelines for testing of chemicals. Organization for economic cooperation and development. (2001).
13. Gomes and De, 1999;Gomes, De & Dasgupta, (in press) , DPI-201-206
14. Romey G, Quart U, Pauron D, Frelin C, Renand J and Lazdunski M. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 896-900

15. Lewis RL, Gutmann L (2004) Snake venoms and the neuromuscular junction *Seminars in Neurology* 24:175-9 PMID 15257514
16. Pung, Yuh Fen (YF); Wong, Peter T H (PT); Kumar, Prakash P (PP); Hodgson, Wayne C (WC); Kini, R Manjunatha (RM); Ohanin, a novel protein from king cobra venom, induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice. *The Journal of biological chemistry (J Biol Chem)*, published in United States. PMID: 15668253, status: MEDLINE (last retrieval date: 2/18/2009)
17. Saha A, Gomes A, Chakravarty AK, Biswas AK, Giri B, Dasgupta SC, Gomes A. CNS and anticonvulsant activity of a non-protein toxin (KC-MMTx) isolated from King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Toxicon*. 2006 Mar;47(3):296-303.
18. SONG, YULIANG XIONG, WANYU WANG, AND XIAOCHUN PU. A Study on the Purification and Pharmacological Properties of Two Neurotoxins from the Venom of the King Cobra (*Ophiophagus Hannah*) December 1993 *Asiatic Herpetological Research* Vol. 5, pp. 143-146
19. M. Z. Huang, P. Gopalakrishnakone, R. M. Kini. Inhibition of human platelet aggregation by a phospholipase A₂ platelet inhibitor from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom *Toxicon, Volume 35, Issue 4, April 1997, Page 492*
20. De, Pallabi, S.C. Dasgupta and A. Gomes. Haematological studies on the venom of Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) *Indian Journal of Pharmacology* 29, 1, 1997, 53--54 (abstract No. 141)
21. X. C. Pu, P. T. H. Wong and P. Gopalakrishnakone. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) *Toxicon* Volume 33, Issue 11, November 1995, Pages 1425-1431

ภาคผนวก

สารบัญภาพการตรวจเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยาในการศึกษาพิษวิทยาในหนูเม้าส์

ภาพที่	เนื้อเยื่อ	การศึกษาพิษวิทยา	ขนาดของสารทดสอบ	เพศ	หน้า
1	Liver	Single-dose	NSS	Male	1
2	Kidney			Male	1
3	Heart			Male	1
4	Lung			Male	1
5	Spleen			Male	2
6	Testes			Male	2
7	Liver	Single-dose	F1.2.2 2.6 üg	Male	2
8	Kidney			Male	2
9	Heart			Male	3
10	Lung			Male	3
11	Spleen			Male	3
12	Testes			Male	3
13	Liver	Single-dose	F1.2.2 3.6 üg	Male	3
14	Kidney			Male	4
15	Heart			Male	4
16	Lung			Male	4
17	Spleen			Male	4
18	Testes			Male	4
19	Liver	Single-dose	F1.2.2 5 üg	Male	5
20	Kidney			Male	5
21	Heart			Male	5
22	Lung			Male	5
23	Spleen			Male	6
24	Testes			Male	6
25	Liver	Single-dose	F1.2.2 7.1 üg	Female	6
26	Kidney			Female	6

27	Heart			Female	7
28	Lung			Female	7
29	Spleen			Female	7
30	Testes			Female	7
31	Liver	Single-dose	NSS	Female	7
32	Kidney			Female	8
33	Heart			Female	8
34	Lung			Female	8
35	Spleen			Female	8
36	Ovaries			Female	8
37	Liver	Single-dose	F1.2.2 2.6 üg	Female	9
38	Kidney			Female	9
39	Heart			Female	9
40	Lung			Female	9
41	Spleen			Female	10
42	Ovaries			Female	10
43	Liver	Single-dose	F1.2.2 3.6 üg	Female	10
44	Kidney			Female	10
45	Heart			Female	11
46	Lung			Female	11
47	Spleen			Female	11
48	Ovaries			Female	11
49	Liver	Single-dose	F1.2.2 5 üg	Male	11
50	Kidney			Male	12
51	Heart			Male	12
52	Lung			Male	12
53	Spleen			Male	12
54	Ovaries			Male	12

55	Liver	Single-dose	F1.2.2 7.1 µg	Male	13
56	Kidney			Male	13
57	Heart			Male	13
58	Lung			Male	13
59	Spleen			Male	14
60	Ovaries			Male	14
61	Liver	Repeated-dose	NSS	Male	14
62	Kidney			Male	14
63	Heart			Male	15
64	Lung			Male	15
65	Spleen			Male	15
66	Testes			Male	15
67	Liver	Repeated-dose	F1.2.2 0.1 LD50	Male	15
68	Kidney			Male	16
69	Heart			Male	16
70	Lung			Male	16
71	Spleen			Male	16
72	Testes			Male	16
73	Liver	Repeated-dose	F1.2.2 0.2 LD50	Male	17
74	Kidney			Male	17
75	Heart			Male	18
76	Lung			Male	18
77	Spleen			Male	18
78	Testes			Male	18
79	Liver	Repeated-dose	F1.2.2 0.4 LD50	Male	18
80	Kidney			Male	19
81	Heart			Male	19
82	Lung			Male	19

83	Spleen			Male	19
84	Testes			Male	19
85	Liver	Repeated-dose	NSS	Female	20
86	Kidney			Female	20
87	Heart			Female	20
88	Lung			Female	20
89	Spleen			Female	21
90	Ovaries			Female	21
91	Liver			Repeated-dose	F1.2.2 0.1 LD50
92	Kidney	Female	21		
93	Heart	Female	22		
94	Lung	Female	22		
95	Spleen	Female	22		
96	Ovaries	Female	22		
97	Liver	Repeated-dose	F1.2.2 0.2 LD50	Female	22
98	Kidney			Female	23
99	Heart			Female	23
100	Lung			Female	23
101	Spleen			Female	23
102	Ovaries			Female	23
103	Liver	Repeated-dose	F1.2.2 0.4 LD50	Female	24
104	Kidney			Female	24
105	Heart			Female	24
106	Lung			Female	24
107	Spleen			Female	25
108	Ovaries			Female	25

Pathological Findings: I single-dose toxicity of F1.2.2 (2.6 μg , 3.6 μg , 5.0 μg , and 7.1 μg)

1. Normal Saline Solution in male mice

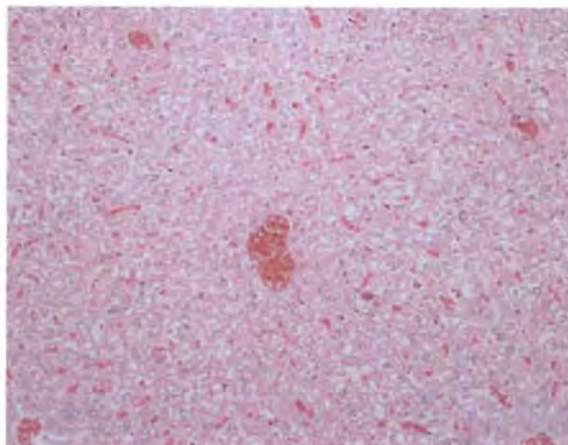


Figure 1 (male: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

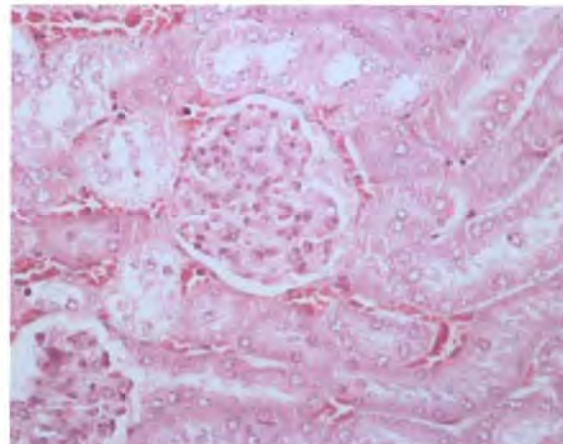
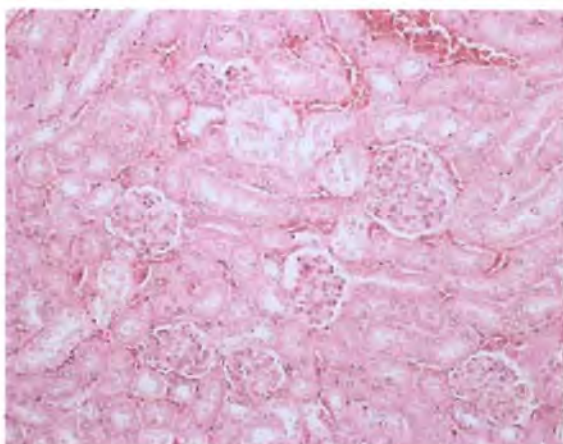


Figure 2 (male kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

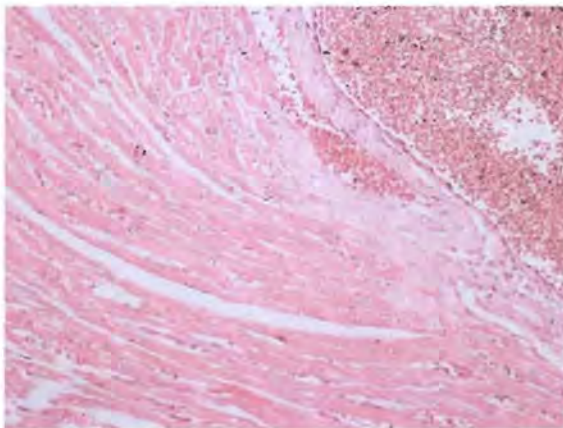


Figure 3 (male: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

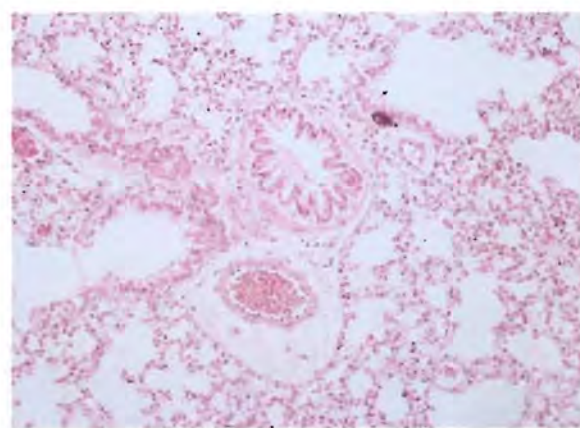


Figure 4 (male: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels with suspicious parenchymal hemorrhage. Alveoli and broncheal epithelium are good shape or intact. (x20)

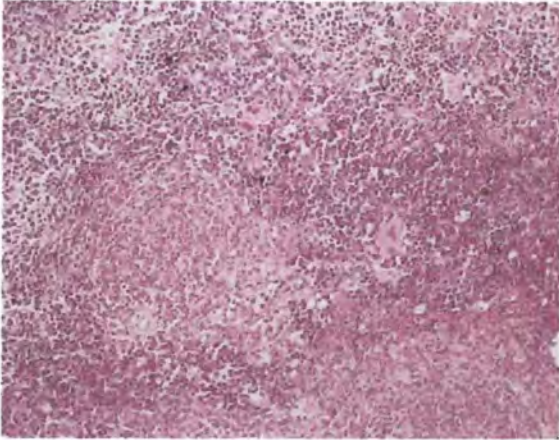


Figure 5 (male: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

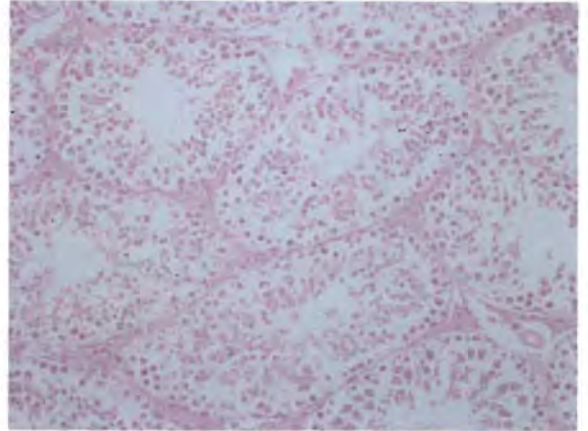


Figure 6 (testes) Well preserved testicular tissue reveals benign appearing with active secondary spermatogenesis. (x20)

2. F1.2.2: 2.6 μ g in male mice

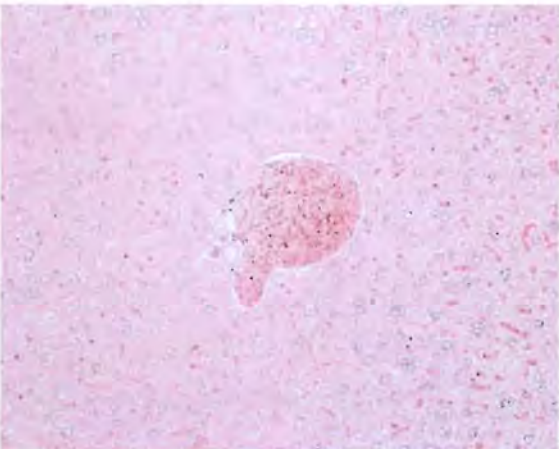


Figure 7 (male: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. (x20)

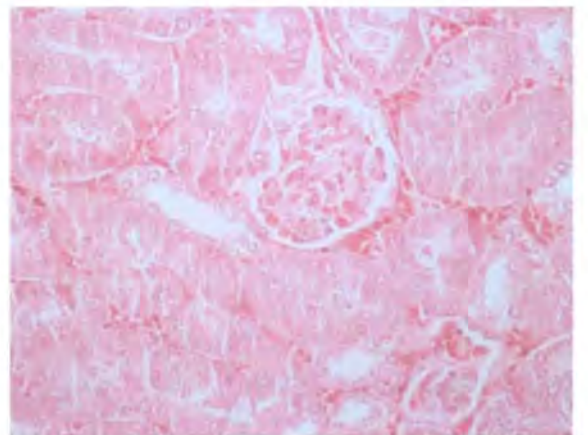
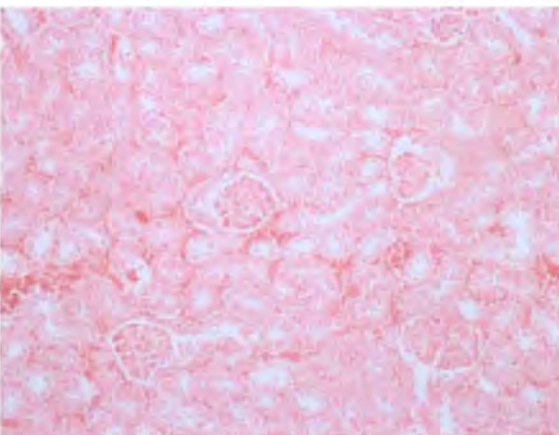


Figure 8 (male kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted.. (Left x20, right x40)

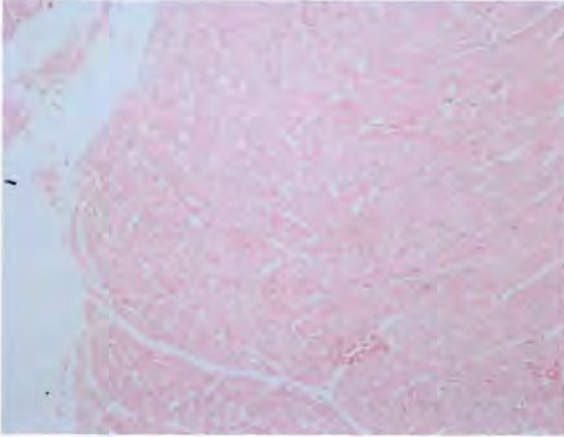


Figure 9 (male: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

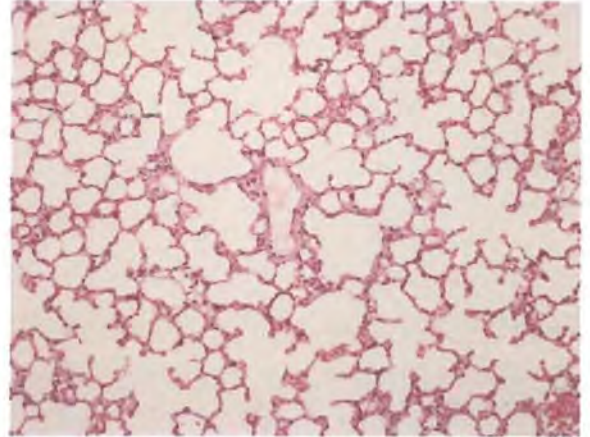


Figure 10 (male: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and bronchial epithelium are good shape or intact. (x20)

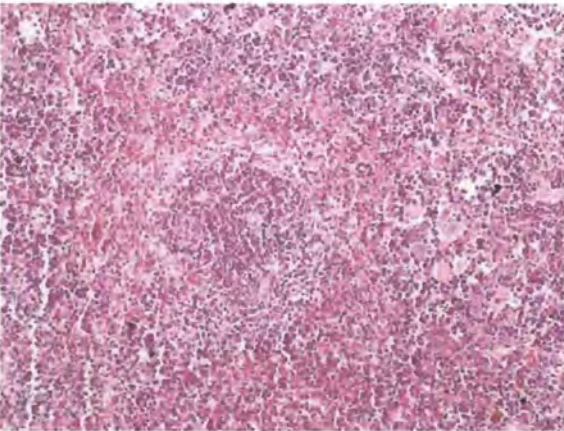


Figure 11 (male: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

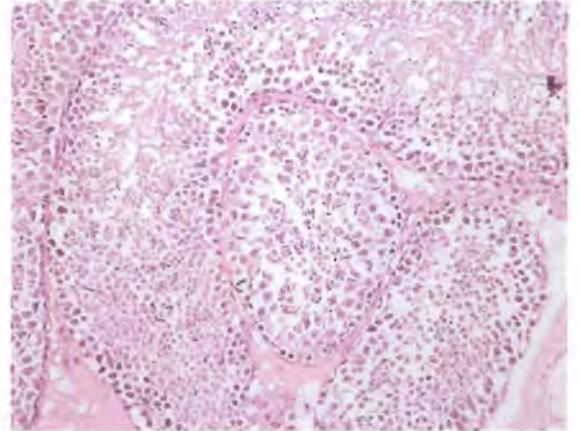


Figure 12 (testes) Well preserved testicular tissue reveals benign appearing with active secondary spermatogenesis. (x20)

3. F1.2.2: 3.6 μg in male mice

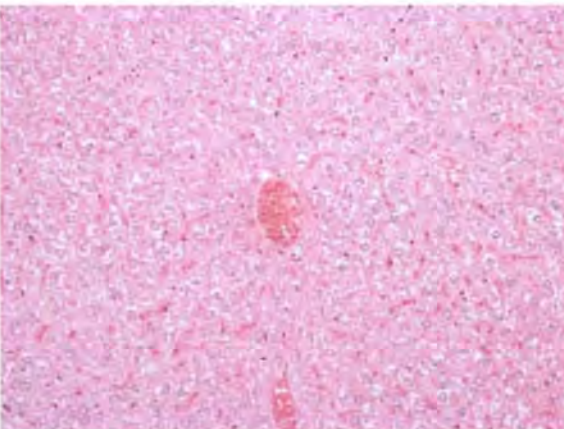


Figure 13 (male: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

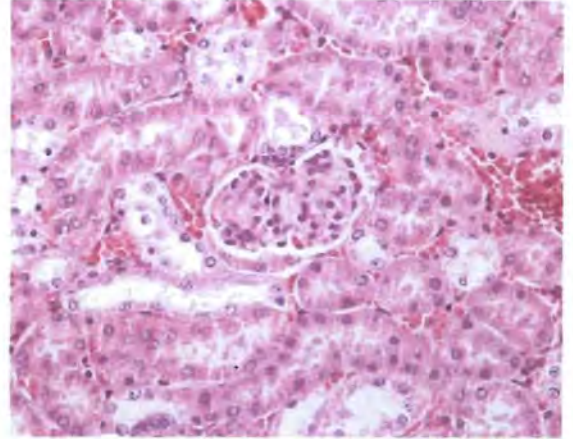
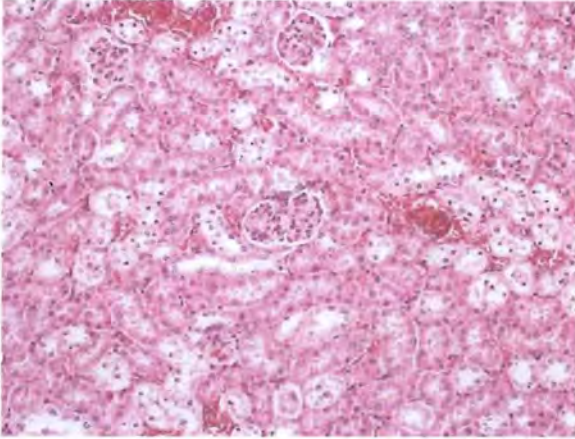


Figure 14 (male kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation (Left x20, right x40)

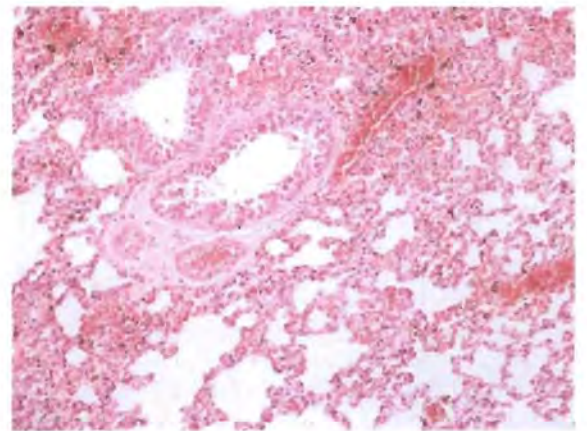
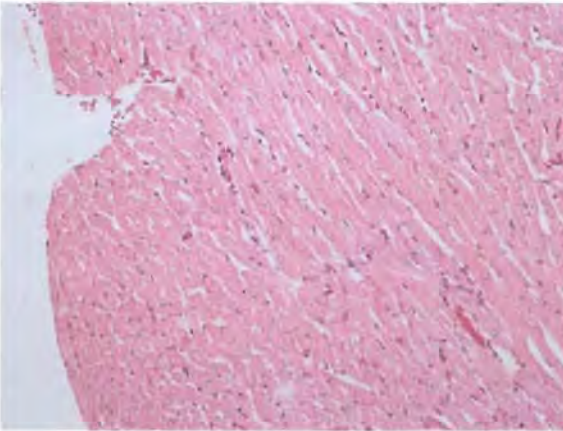


Figure 15 (male: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

Figure 16 (male: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels with suspicious parenchymal hemorrhage. Alveoli and broncheal epithelium are good shape or intact. (x20)

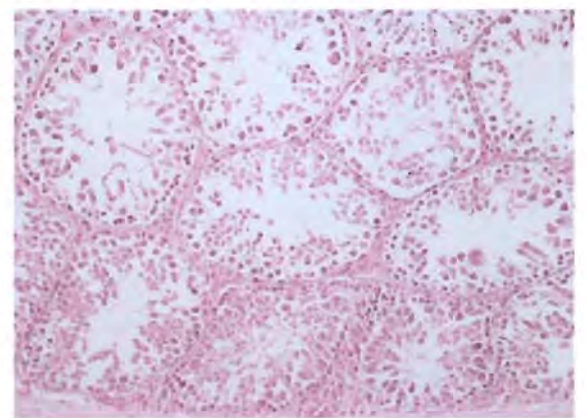
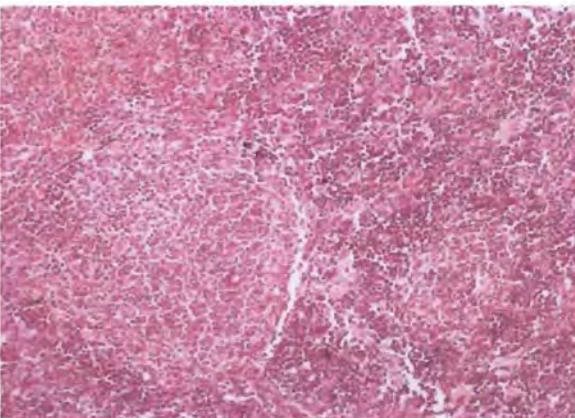


Figure 17 (male: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue

Figure 18 (testes) Well preserved testicular tissue reveals benign appearing with active secondary

4. F1.2.2: 5.0 μg in male mice

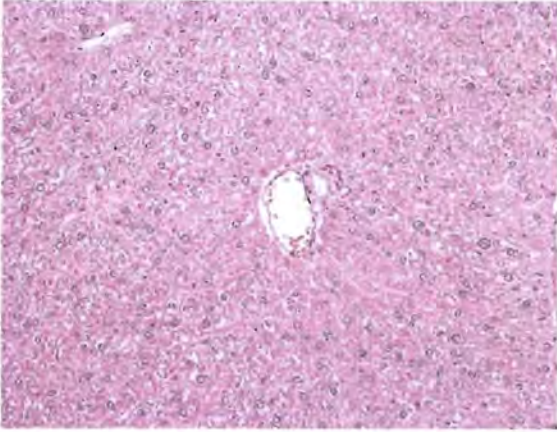


Figure 19 (male: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. (x20)

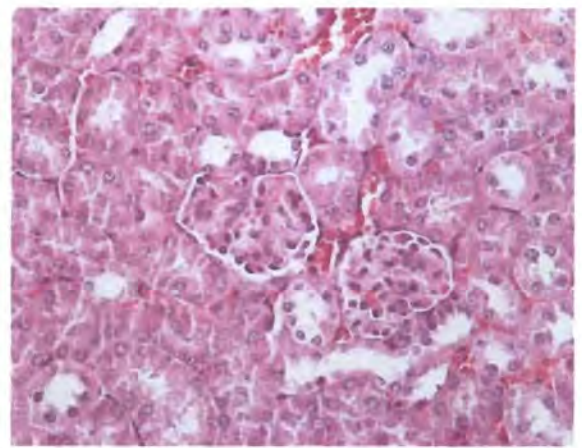
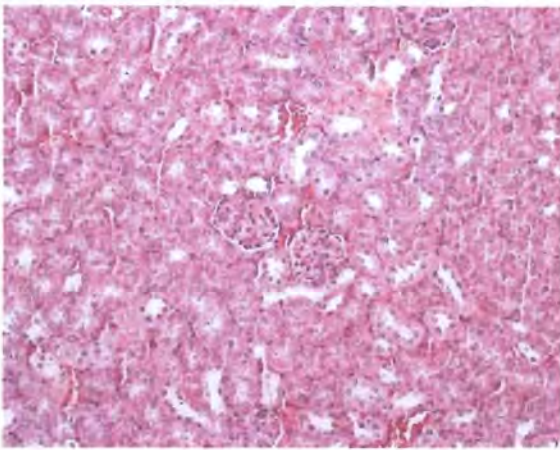


Figure 20 (male kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

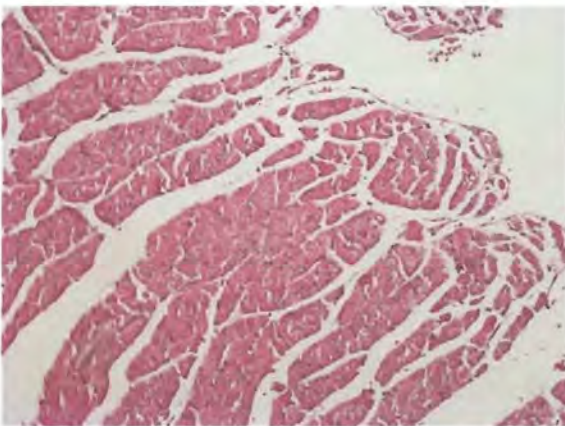


Figure 21 (male: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

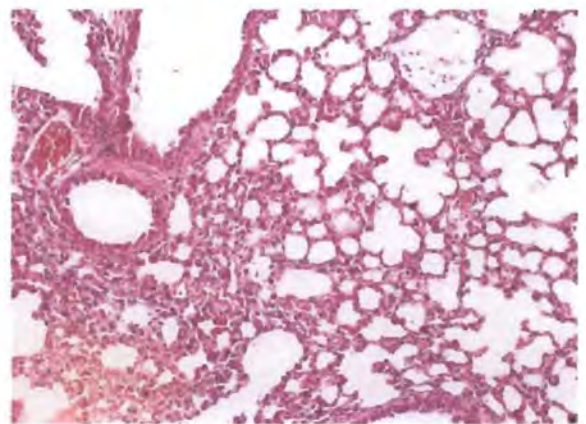


Figure 22 (male: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and broncheal epithelium are good shape or intact. (x20)

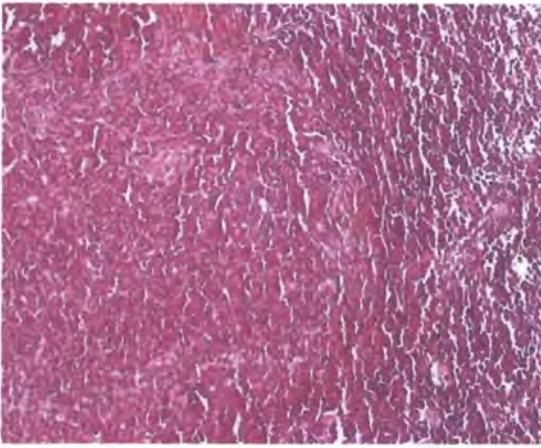


Figure 23 (male: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

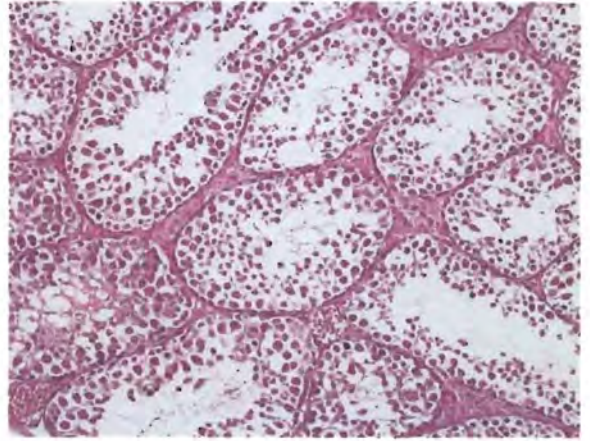


Figure 24 (testes) Well preserved testicular tissue reveals benign appearing with active secondary spermatogenesis. (x20)

5. F1.2.2: 7.1 μg in male mice

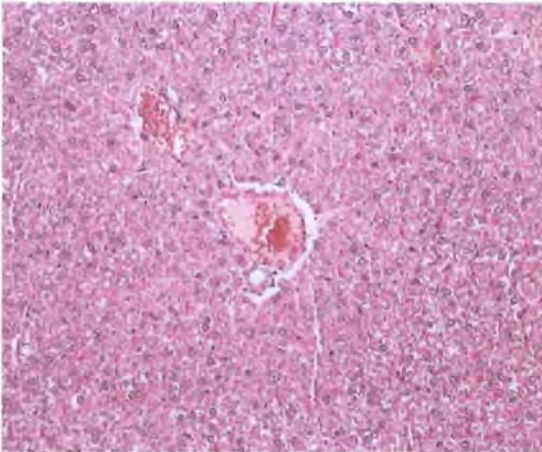


Figure 25 (male: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

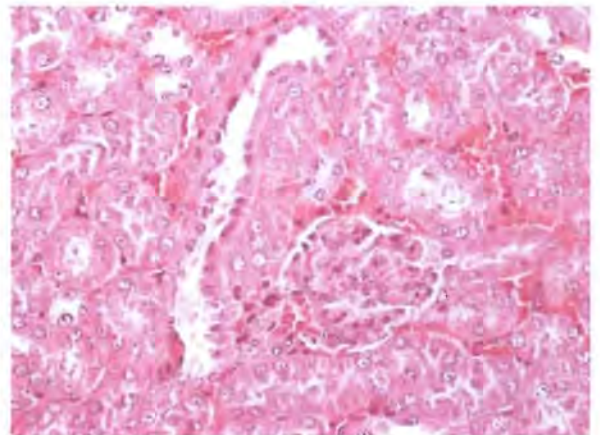
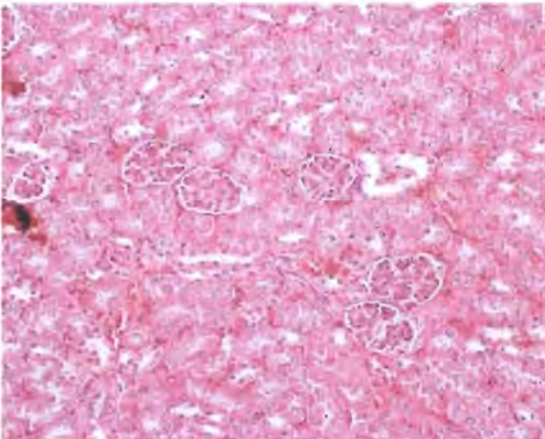


Figure 26 (male kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

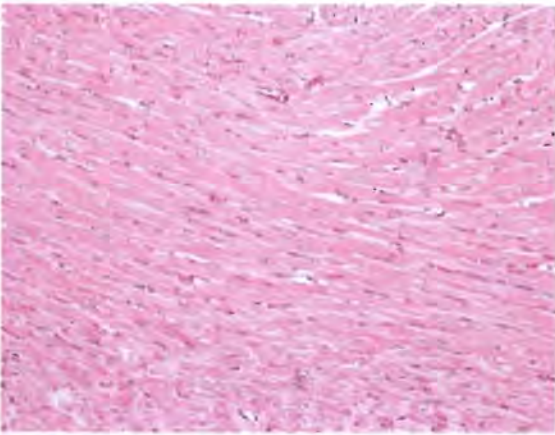


Figure 27 (male: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

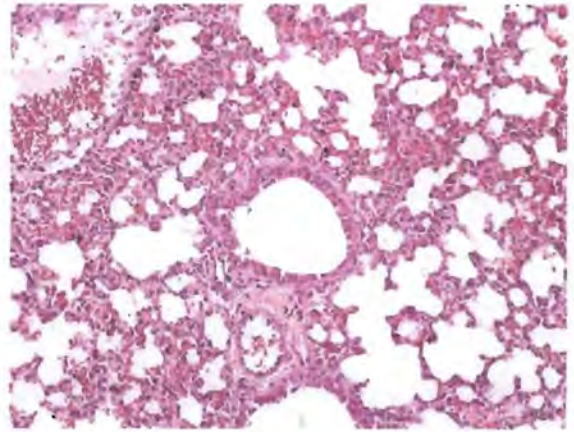


Figure 28 (male: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and broncheal epithelium are good shape or intact. (x20)

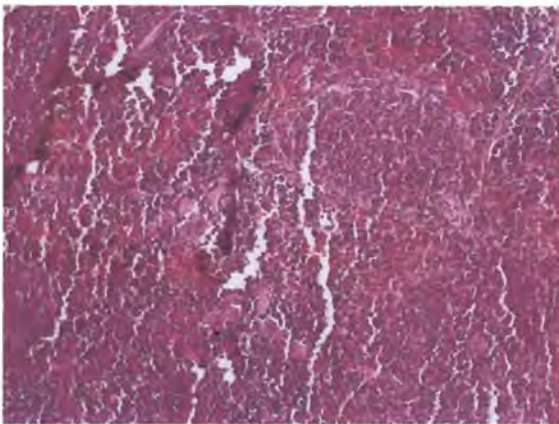


Figure 29 (male: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

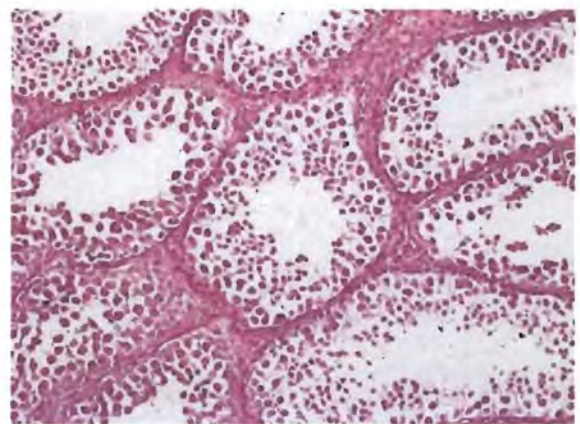


Figure 30 (testes) Well preserved testicular tissue reveals benign appearing with active secondary spermatogenesis. (x20)

6. Normal Saline Solution in female mice

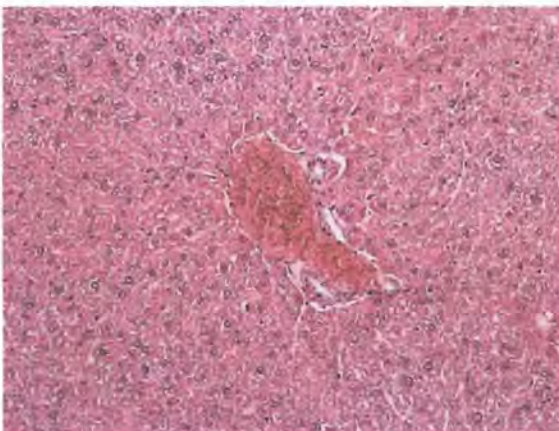


Figure 31 (female: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

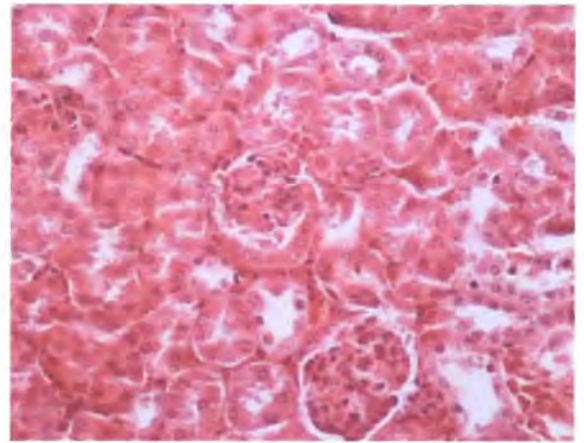
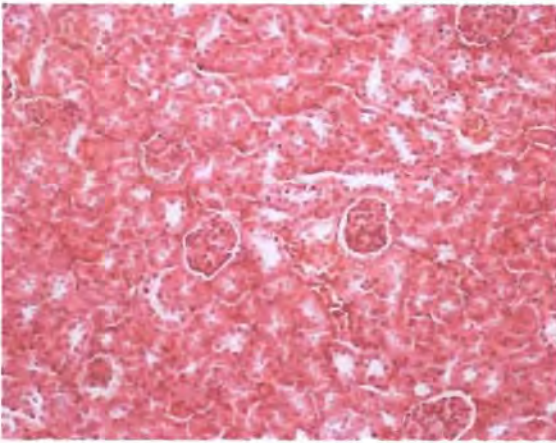


Figure 32 (female kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

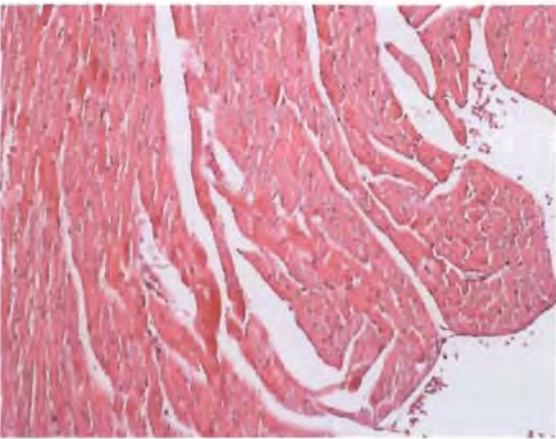


Figure 33 (female: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

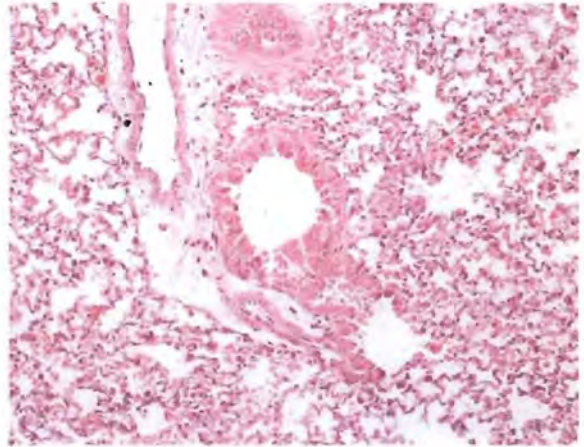


Figure 34 (female: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and broncheal epithelium are good shape or intact. (x20)

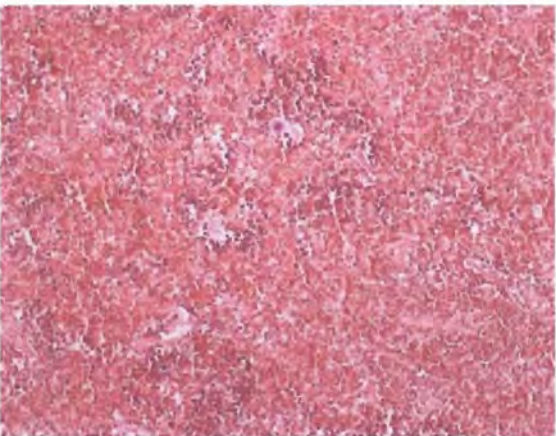


Figure 35 (female: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable

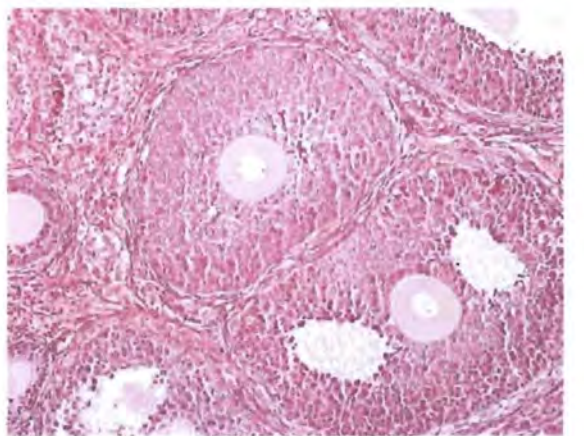


Figure 36 (ovary) Well preserved ovaries reveal intact normal structure with unremarkable change of benign ovarian stroma and eggs. (x20)

7. F1.2.2: 2.6 µg in female mice

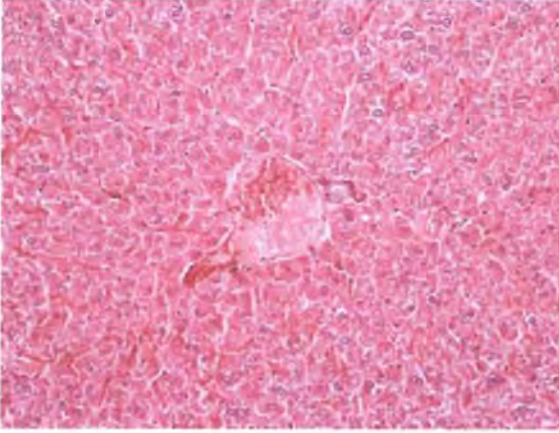


Figure 37 (female: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change (x20)

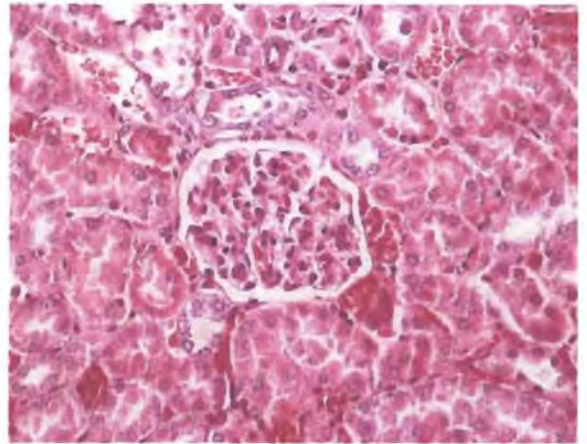
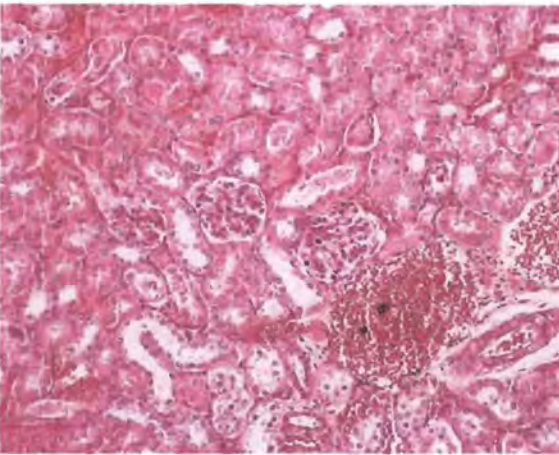


Figure 38 (female kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

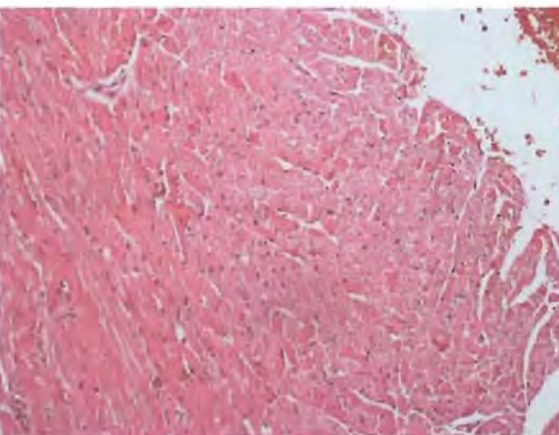


Figure 39 (female: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. Suspicious intraluminal thrombus formation in cardiac ventricle is observed.. (x20)

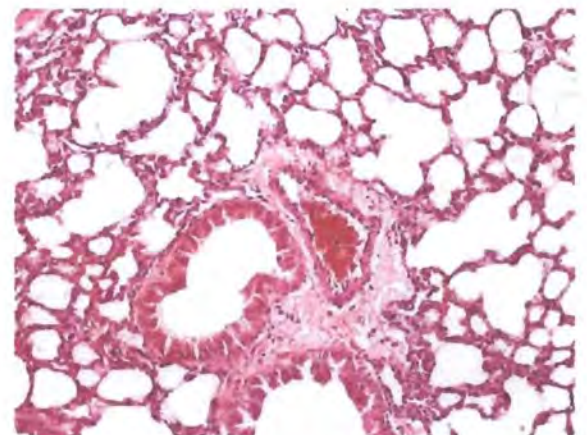


Figure 40 (female: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and bronchial epithelium are good shape or intact. (x20)

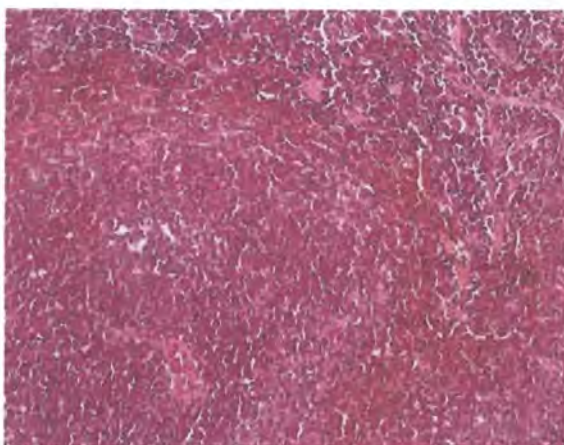


Figure 41 (female: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

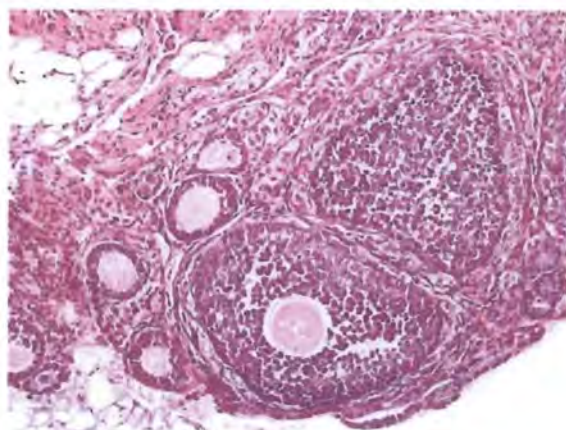


Figure 42 (ovary) Well preserved ovaries reveal intact normal structure with unremarkable change of benign ovarian stroma and eggs. (x20)

8. F1.2.2: 3.6 μ g in female mice

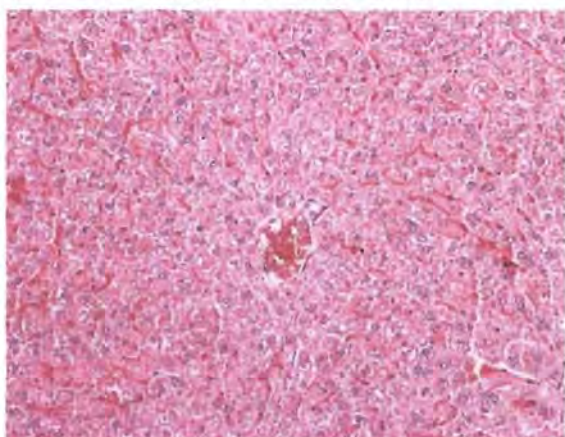


Figure 43 (female: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. change (x20)

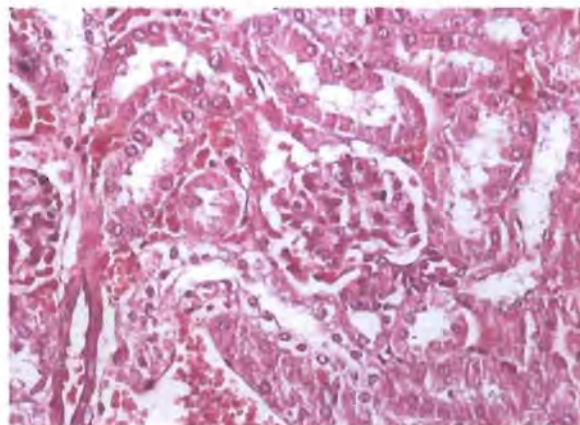
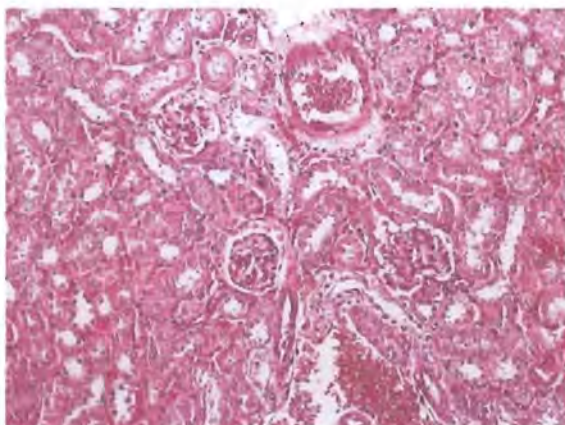


Figure 44 (female kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

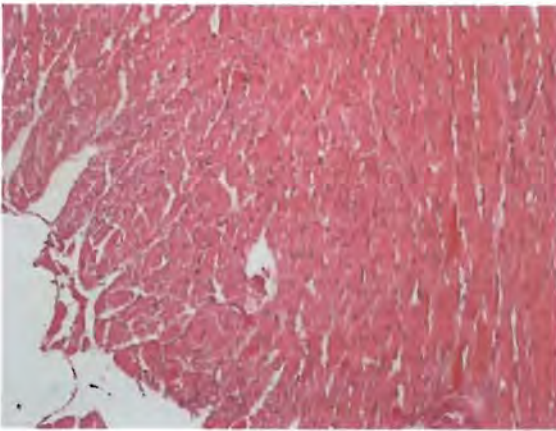


Figure 45 (female: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

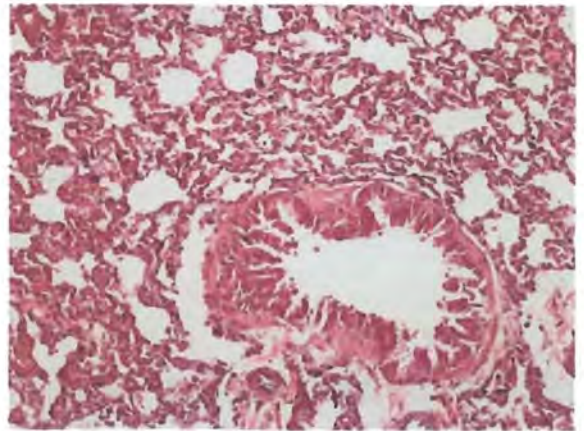


Figure 46 (female: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and bronchial epithelium are good shape or intact. (x20)

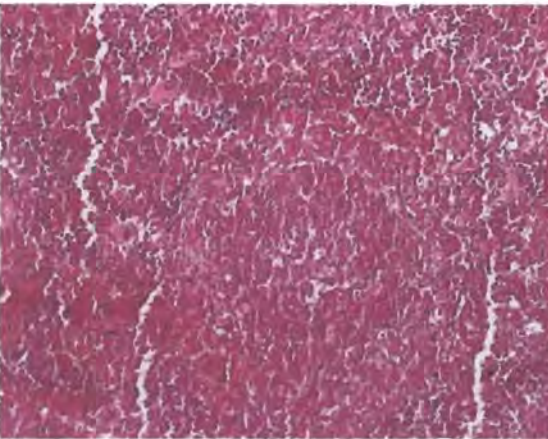


Figure 47 (female: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

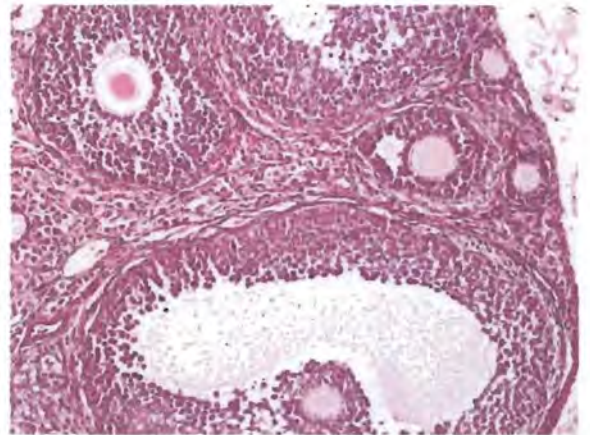


Figure 48 (ovary) Well preserved ovaries reveal intact normal structure with unremarkable change of benign ovarian stroma and eggs. (x20)

8. F1.2.2: 5.0 μ g in female mice

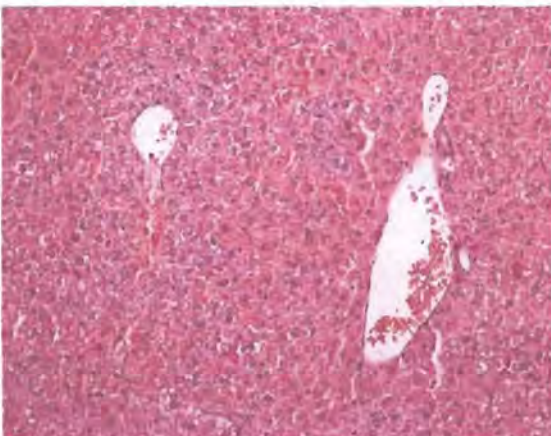


Figure 49 (female: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

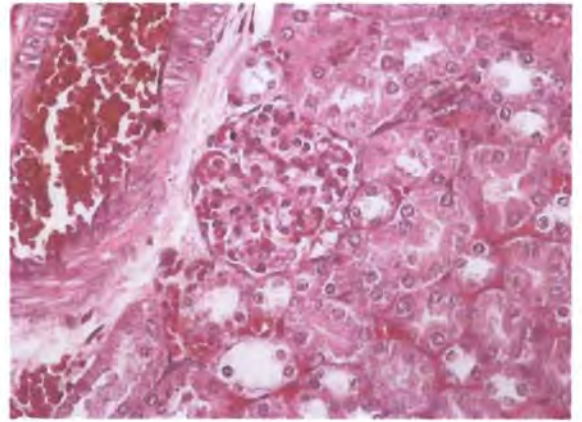
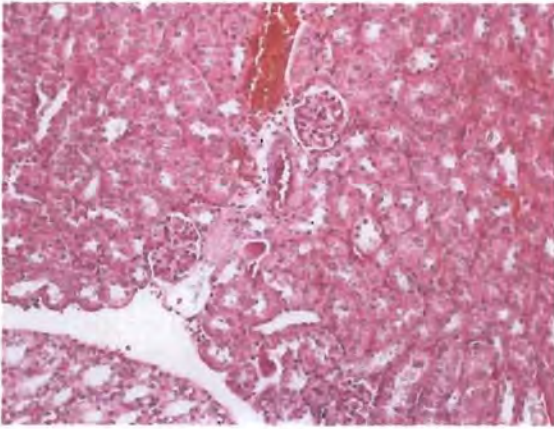


Figure 50 (female kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

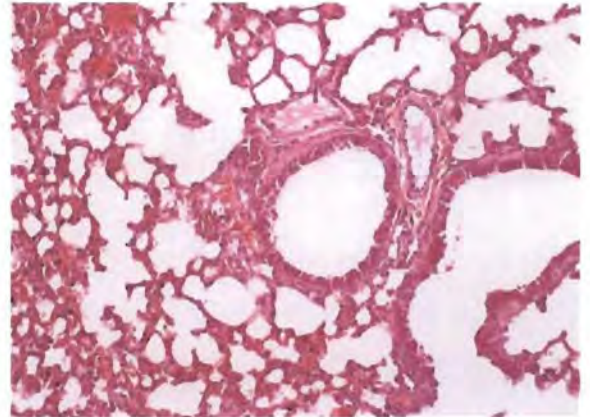
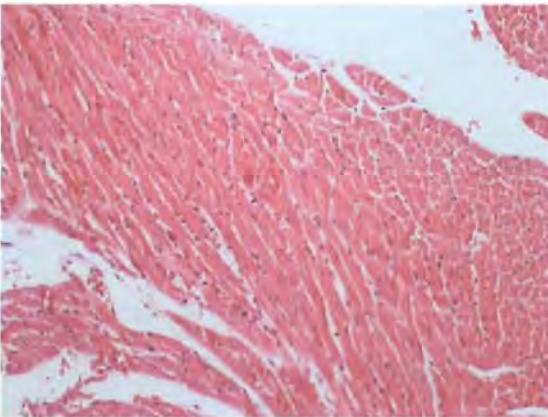


Figure 51 (female: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

Figure 52 (female: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels with suspicious spotty parenchymal hemorrhage. Alveoli and broncheal epithelium are good shape or intact. (x20)

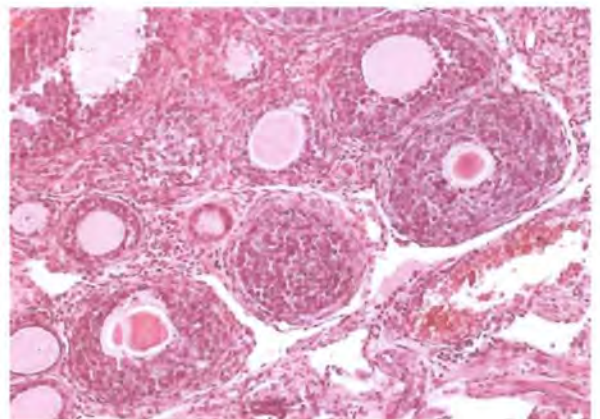
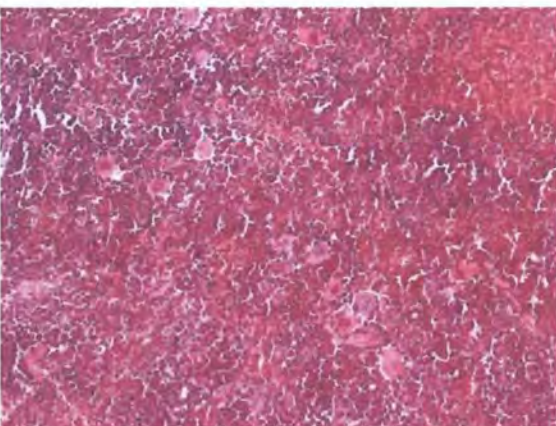


Figure 53 (female: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

Figure 54 (ovary) Well preserved ovaries reveal intact normal structure with unremarkable change of benign ovarian stroma and eggs. (x20)

9. F1.2.2: 7.1 µg in female mice

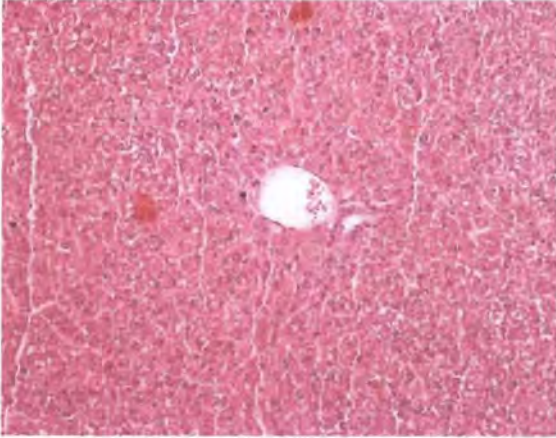


Figure 55 (female: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

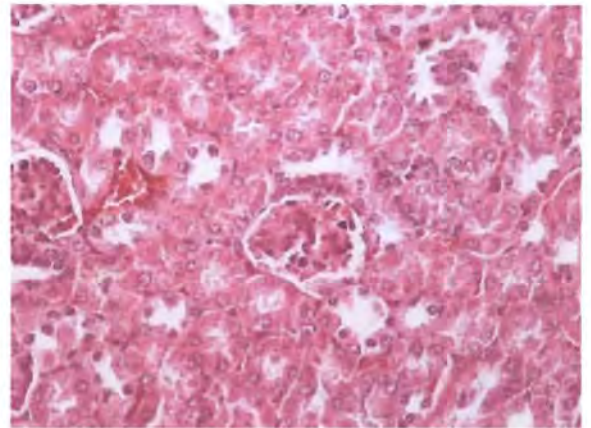
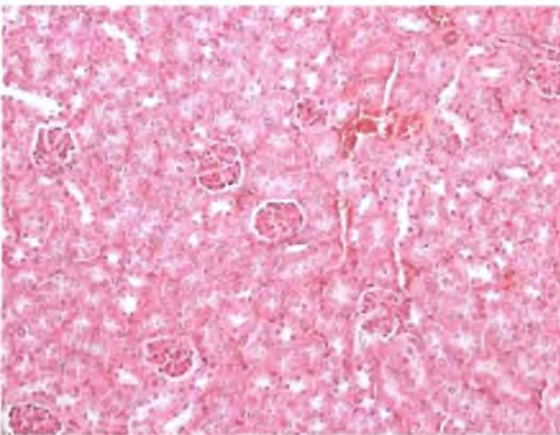


Figure 55 (female kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstitium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted.. (Left x20, right x40)

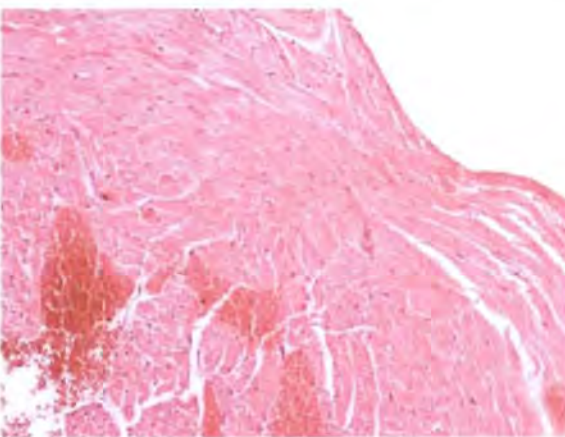


Figure 57 (female: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

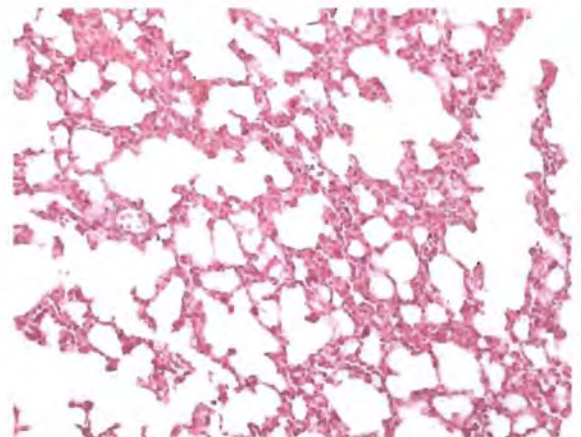


Figure 58 (female: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and bronchial epithelium are good shape or intact. (x20)

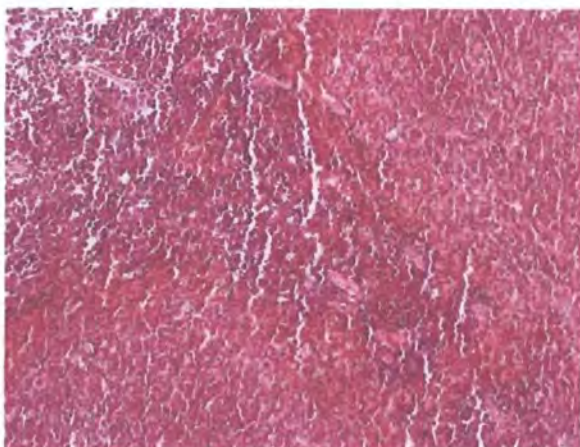


Figure 59 (female: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

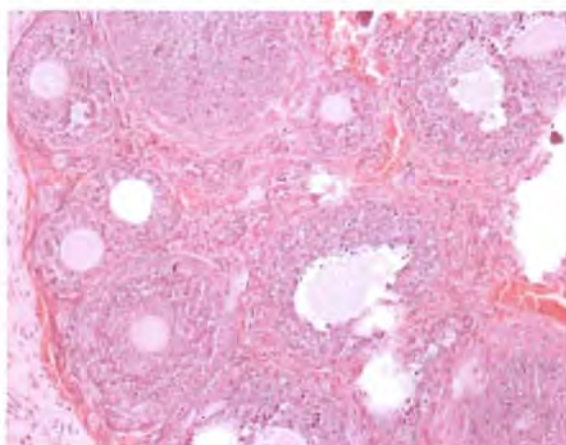


Figure 60 (ovary) Well preserved ovaries reveal intact normal structure with unremarkable change of benign ovarian stroma and eggs. (x20)

Pathological Findings: II. Repeated-dose toxicity of F1.2.2 (0.1 LD50, 0.2 LD50, 0.4 LD50)

1. Normal Saline Solution in male mice

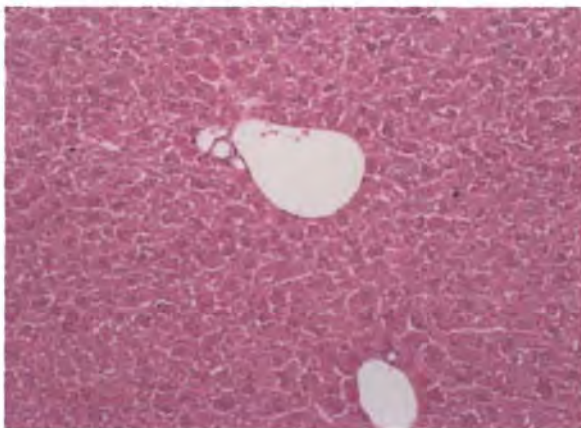


Figure 61 (male: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

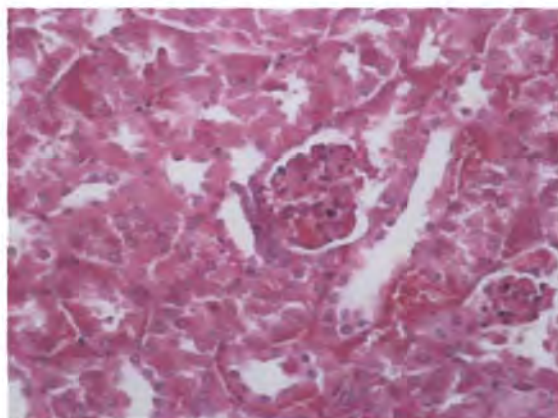
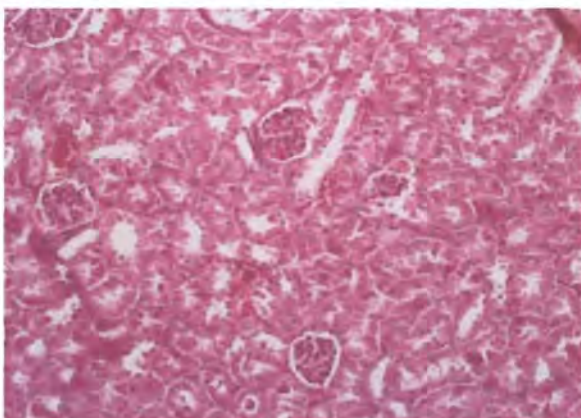


Figure 62 (male: kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

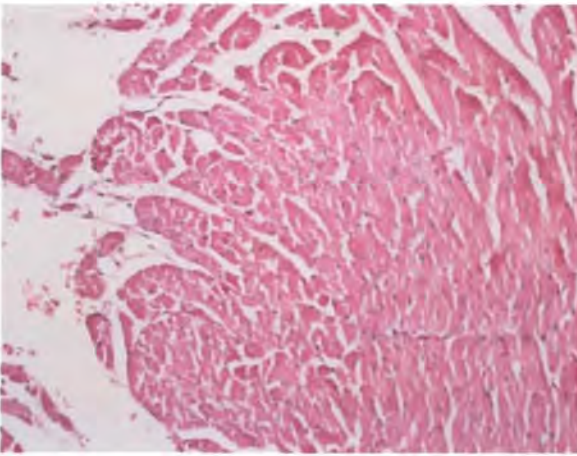


Figure 63 (male: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

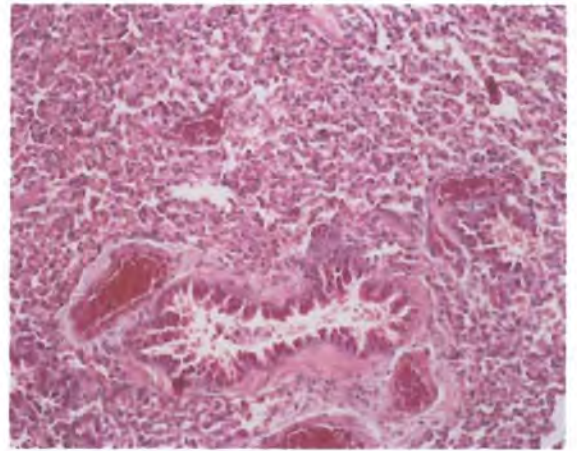


Figure 64 (male: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and broncheal epithelium are good shape or intact. (x20)

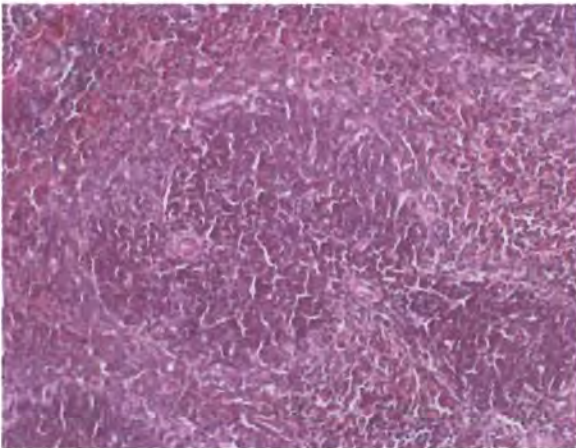


Figure 65 (male: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

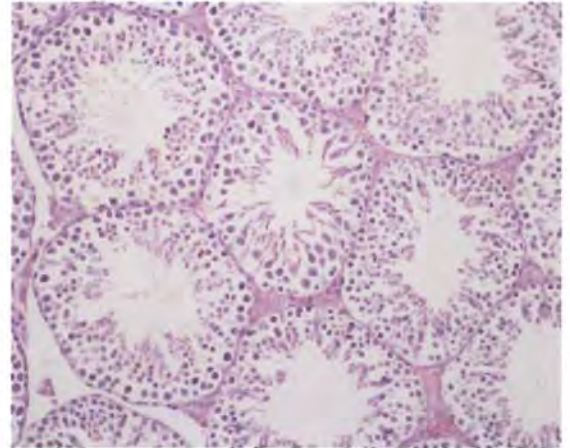


Figure 66 (testes) Well preserved testicular tissue reveals benign appearing with active secondary spermatogenesis. (x20)

2. F1.2.2: 0.1 LD50 in male mice

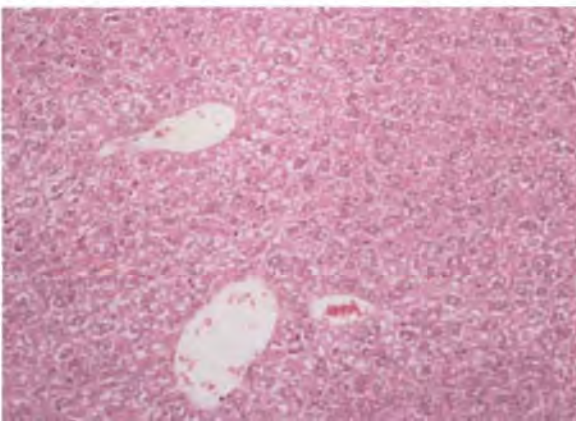


Figure 67 (male: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

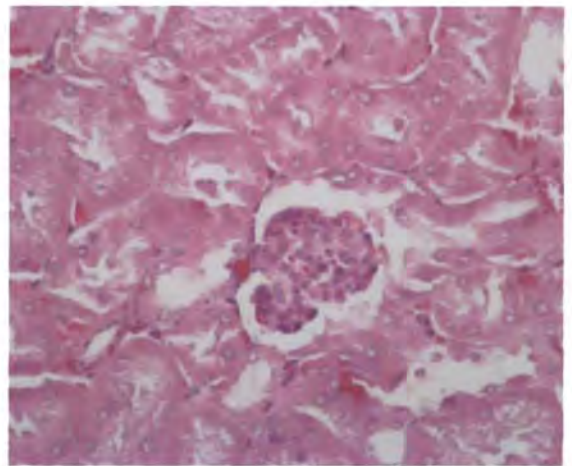
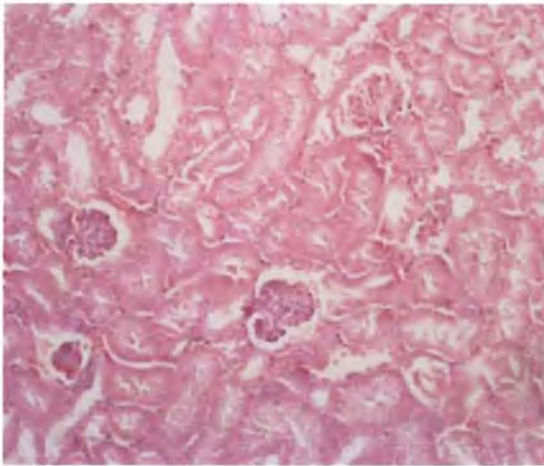


Figure 68 (male kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

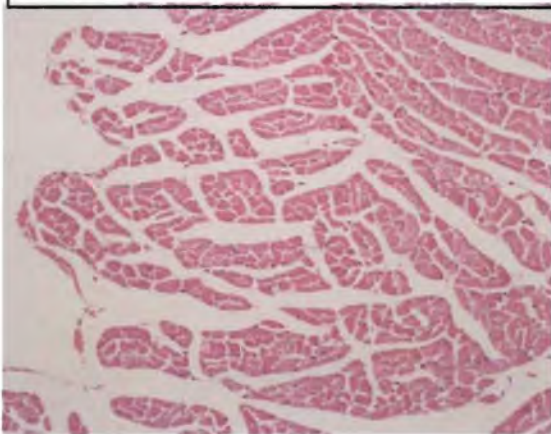


Figure 69 (male: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

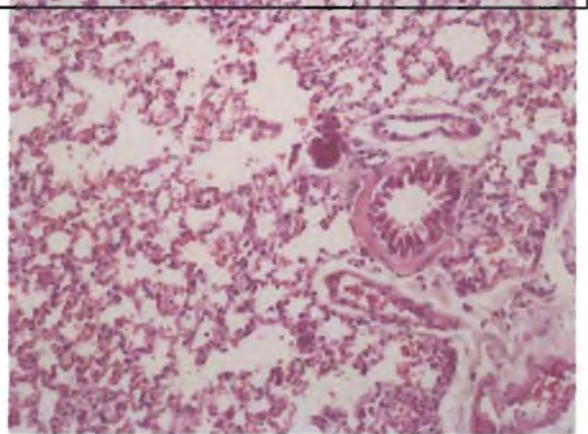


Figure 70 (male: lung) Benign lung tissue reveals spottily congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and broncheal epithelium are good shape or intact. (x20)

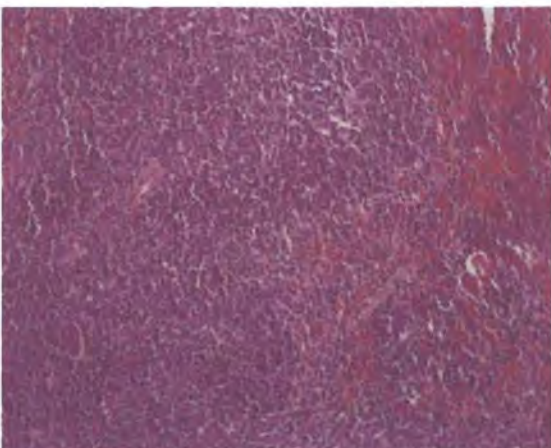


Figure 71 (male: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

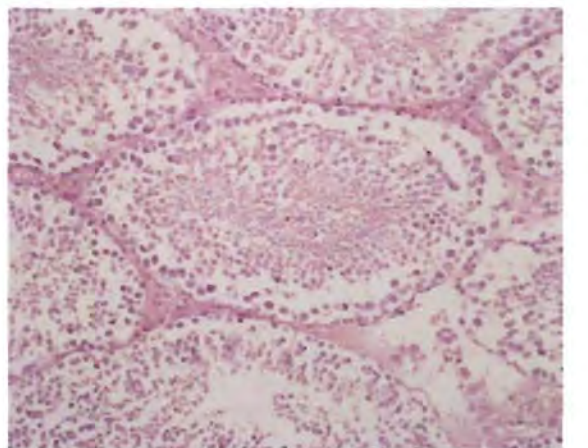


Figure 72 (testes) Well preserved testicular tissue reveals benign appearing with active secondary spermatogenesis. (x20)

3. F1.2.2: 0.2 LD50 in male mice

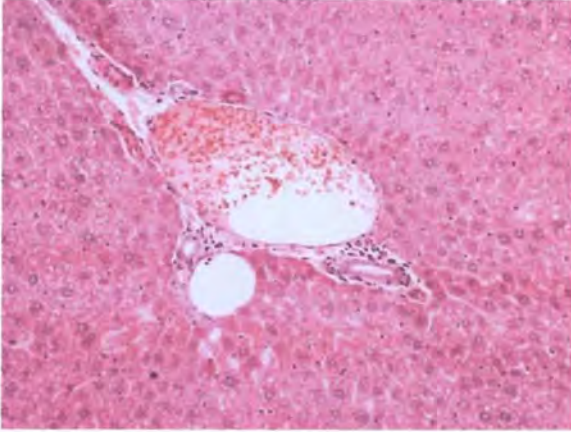


Figure 73 (male: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

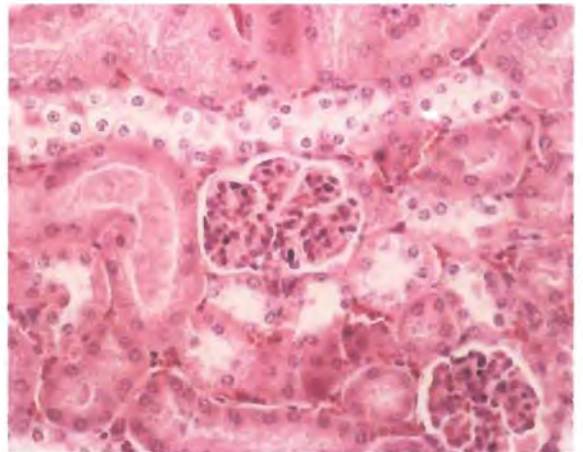
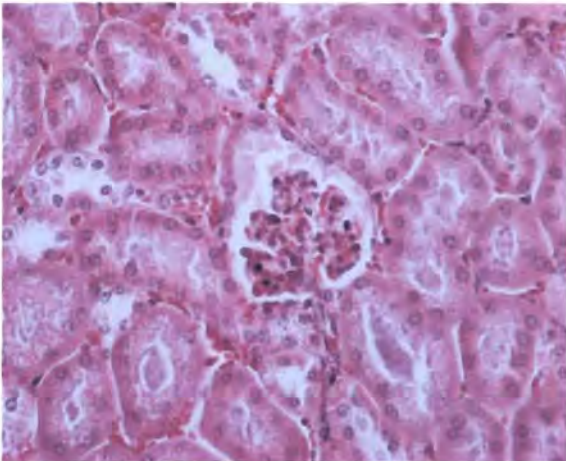
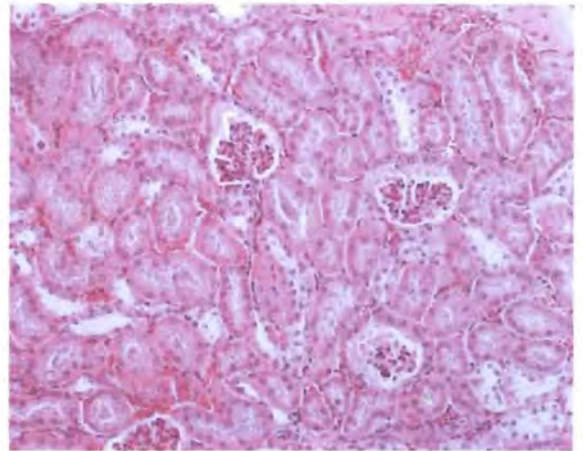
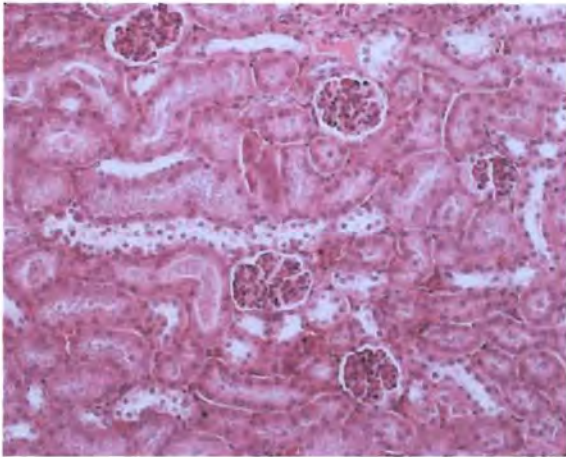


Figure 74 (male kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (upperx20, lower x40)

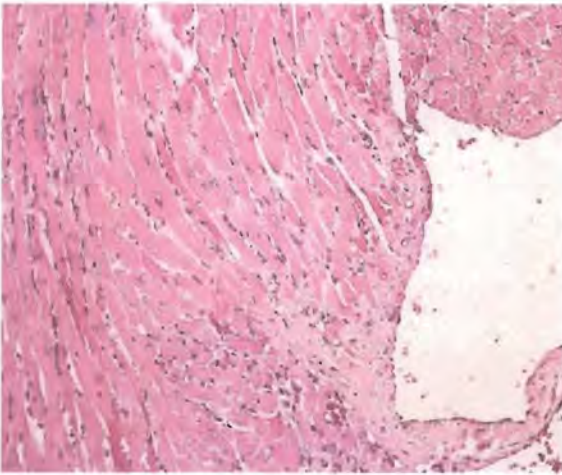


Figure75 (male: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

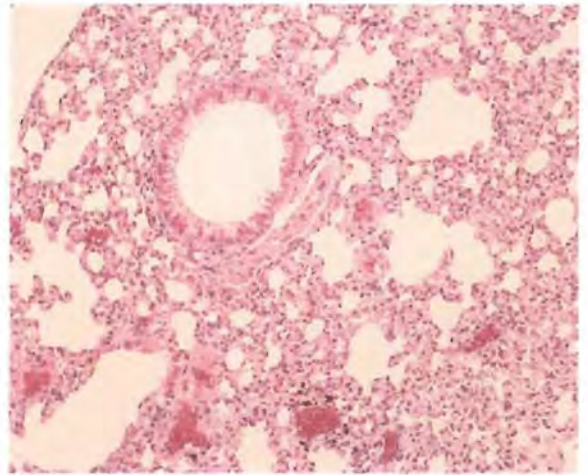


Figure 76 (male: lung) Benign lung tissue reveals spottily congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and bronchial epithelium are good shape or intact. (x20)

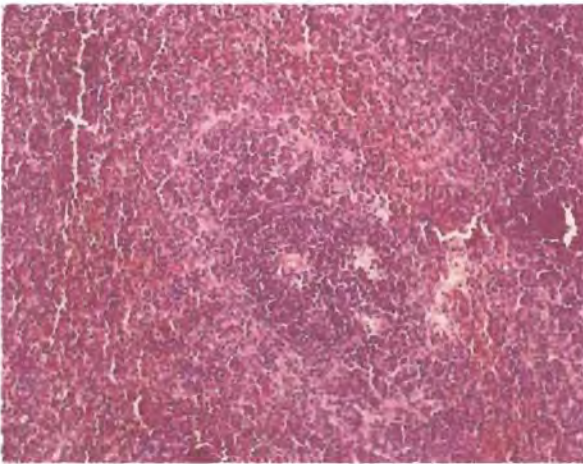


Figure 77 (male: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

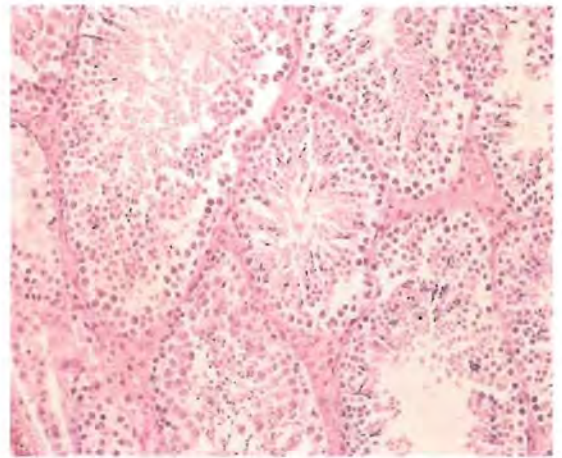


Figure 78 (testes) Well preserved testicular tissue reveals benign appearing with active secondary spermatogenesis. (x20)

4. F1.2.2: 0.4 LD50 in male mice

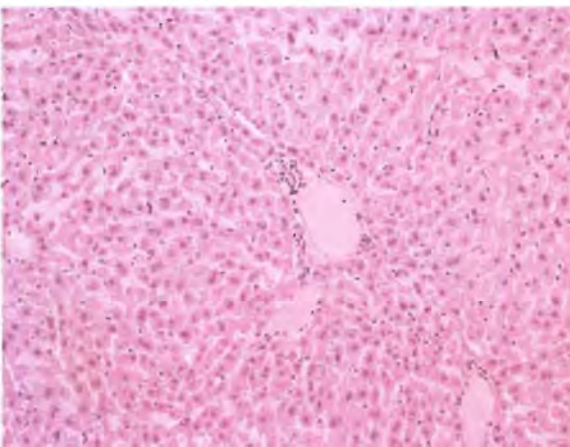


Figure 79 (male: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

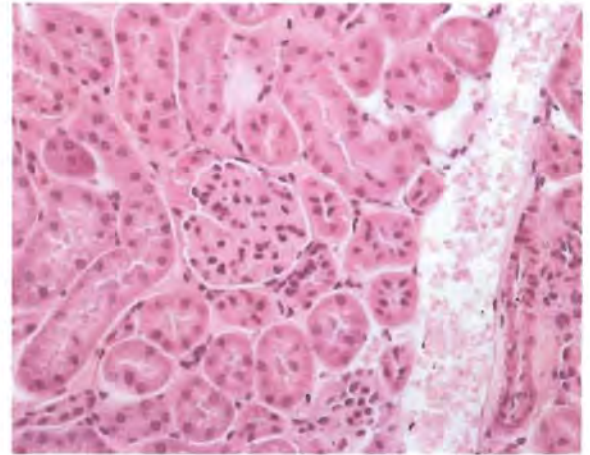
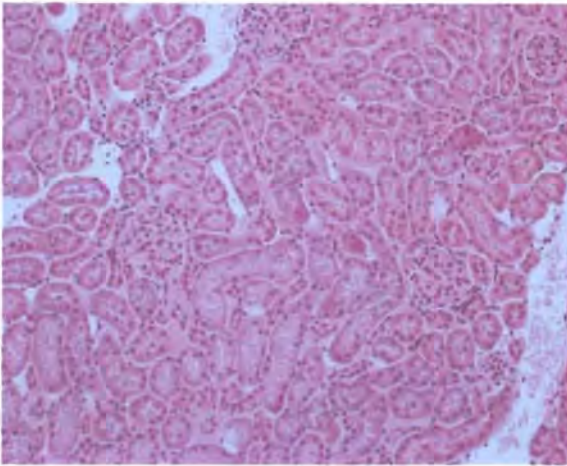


Figure 80 (male kidney) Kidney has well defined cortex and medulla zone with unremarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstitium and blood vessels. (Left x20, right x40)

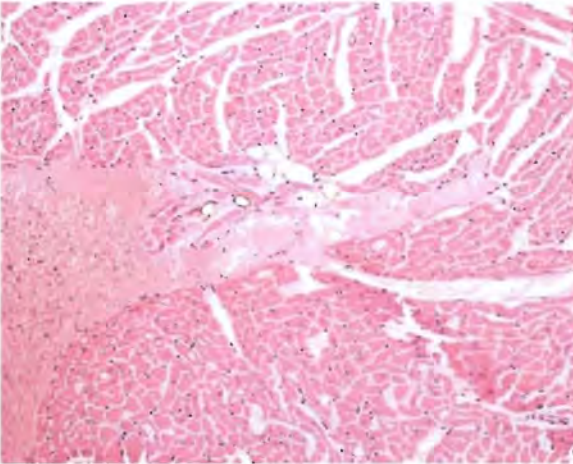


Figure 81 (male: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

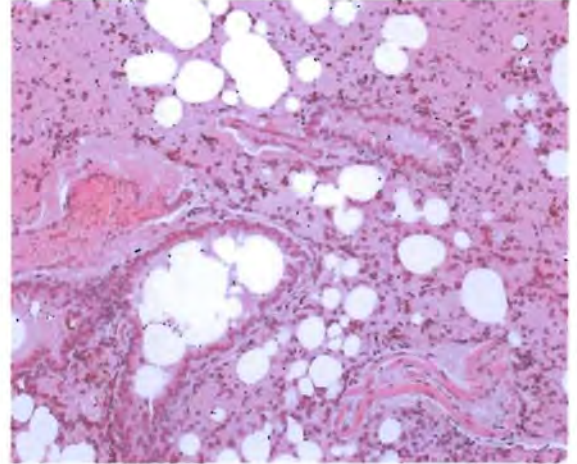


Figure 82 (male: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and bronchial epithelium are good shape or intact. (x20)

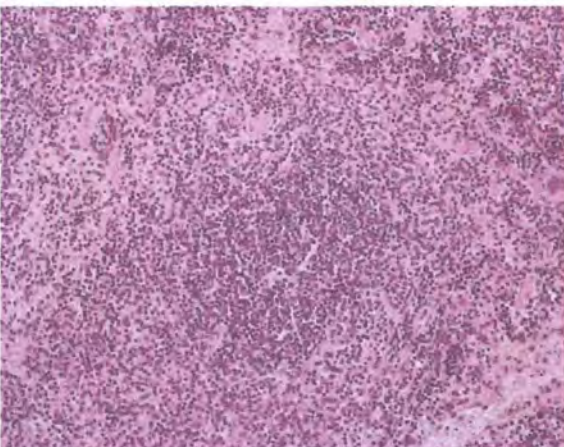


Figure 83 (male: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable

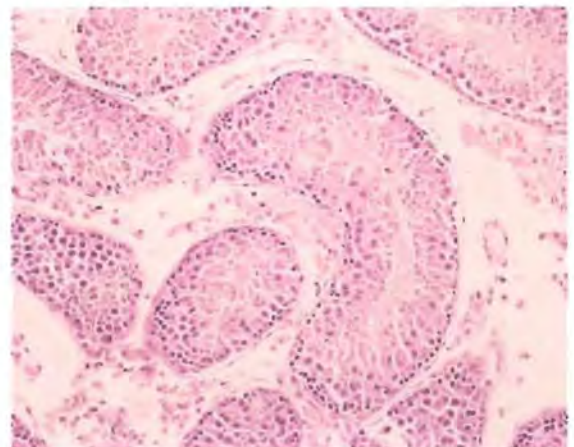


Figure 84 (testes) Well preserved testicular tissue reveals benign appearing with active secondary spermatogenesis. (x20)

5. Normal Saline Solution in female mice

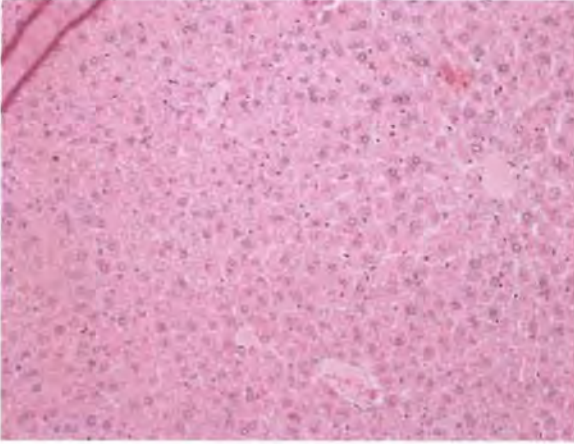


Figure 85 (female: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

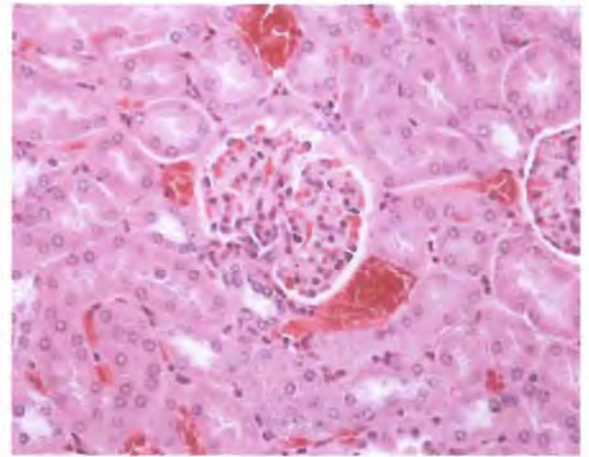
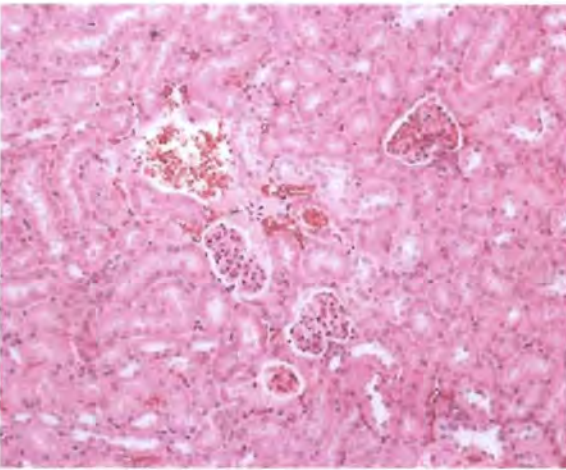


Figure 86 (female kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstitium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

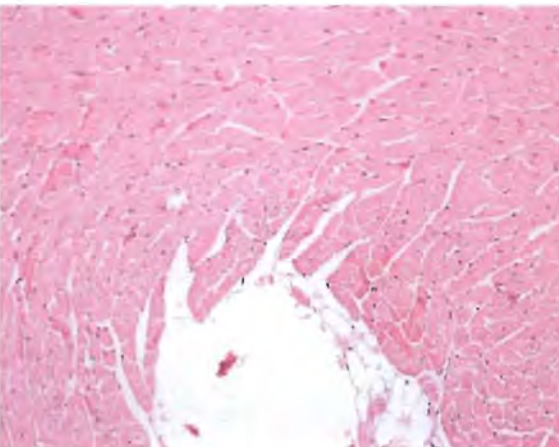


Figure 87 (female: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is

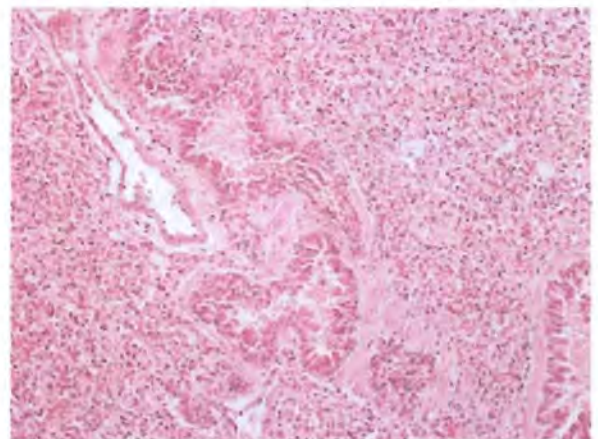


Figure 88 (female: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and bronchial epithelium are good shape or intact. (x20)

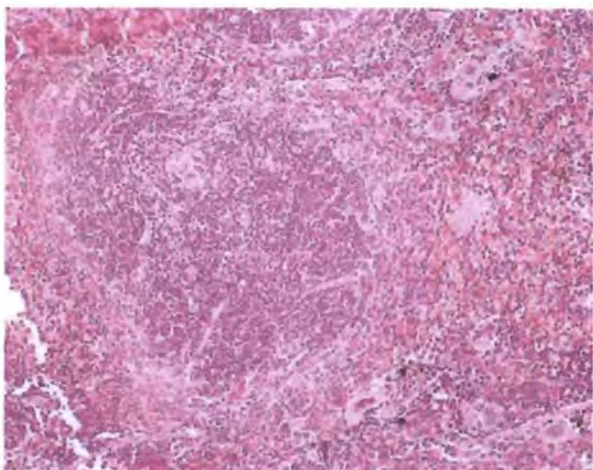


Figure 89 (female: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

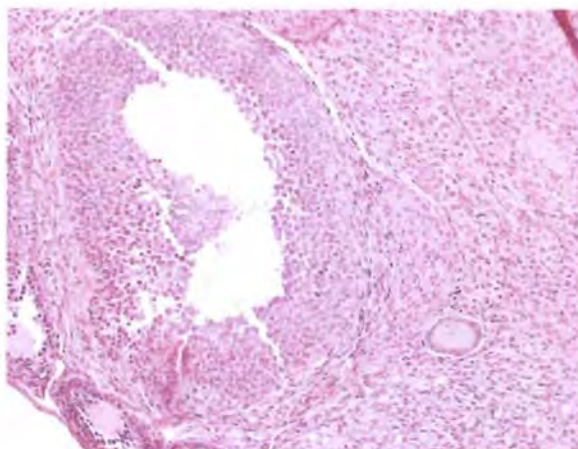


Figure 90 (ovary) Well preserved ovaries reveal intact normal structure with unremarkable change of benign ovarian stroma and eggs. (x20)

6. F1.2.2: 0.1 LD50 in female mice

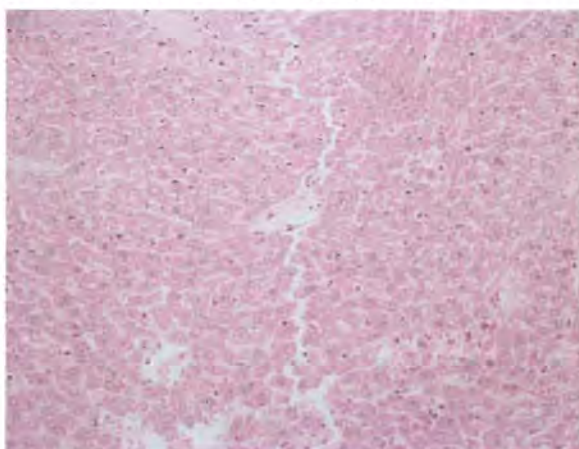


Figure 91 (female: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

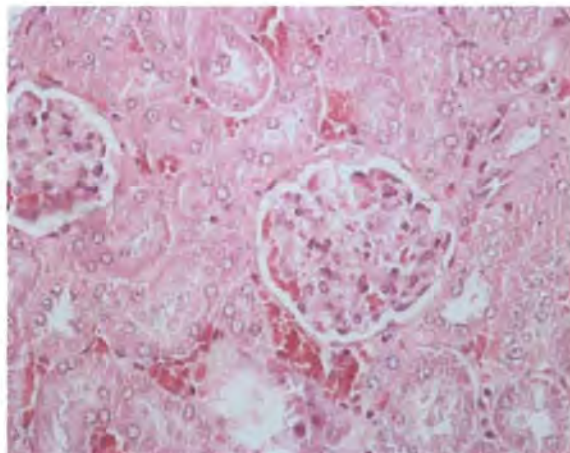
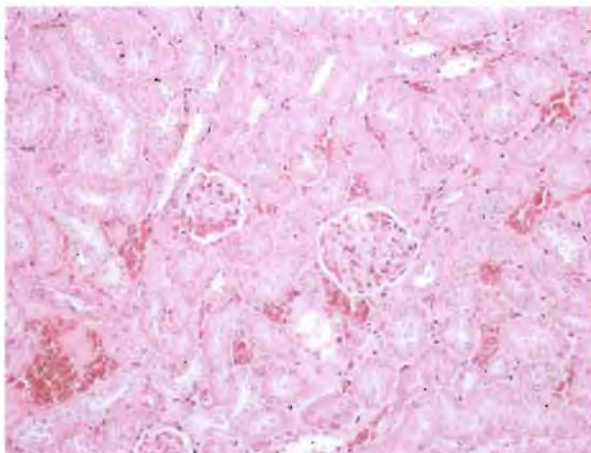


Figure 92 (female kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

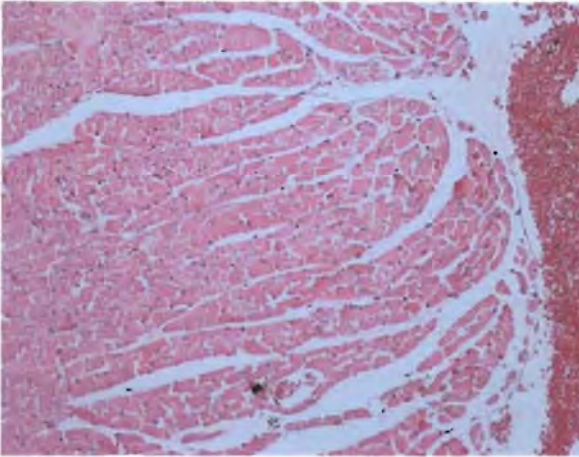


Figure 93 (female: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

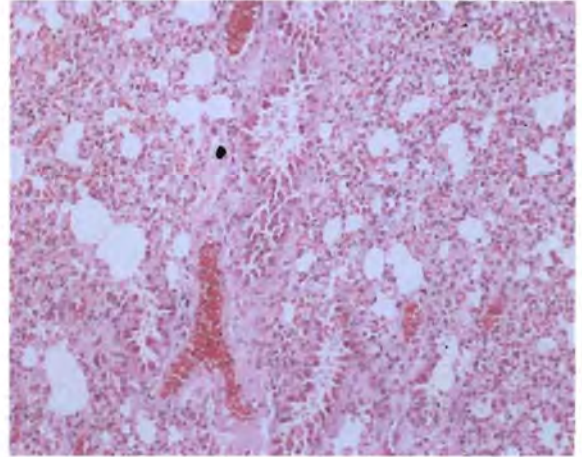


Figure 94 (female: lung) Benign lung tissue reveals spottily congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and bronchial epithelium are good shape or intact. (x20)

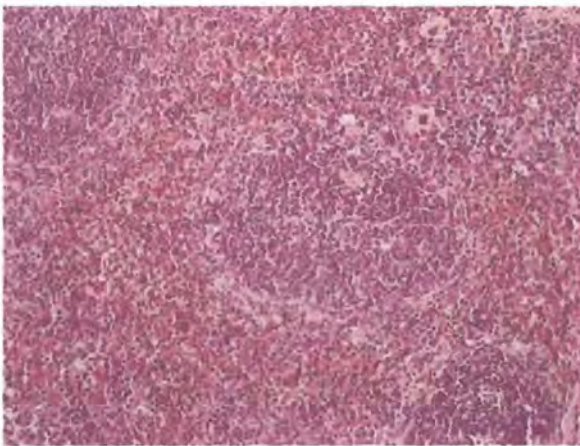


Figure 95 (female: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

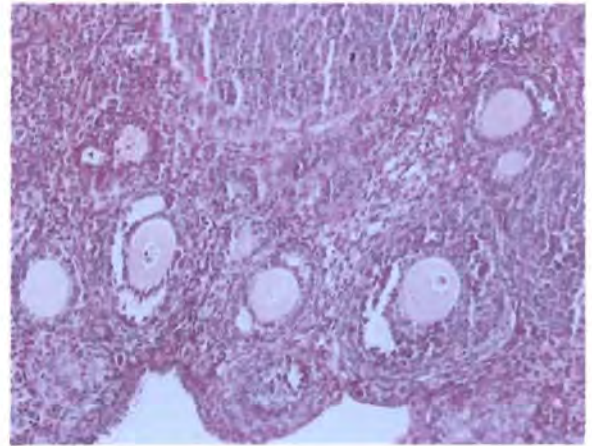


Figure 96 (ovary) Well preserved ovaries reveal intact normal structure with unremarkable change of benign ovarian stroma and eggs. (x20)

7. F1.2.2: 0.2 LD50 in female mice

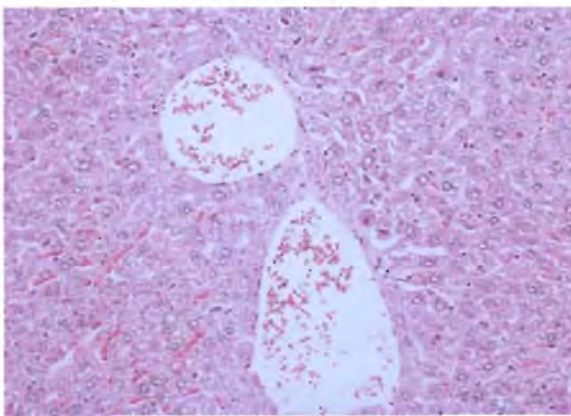


Figure 97 (female: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

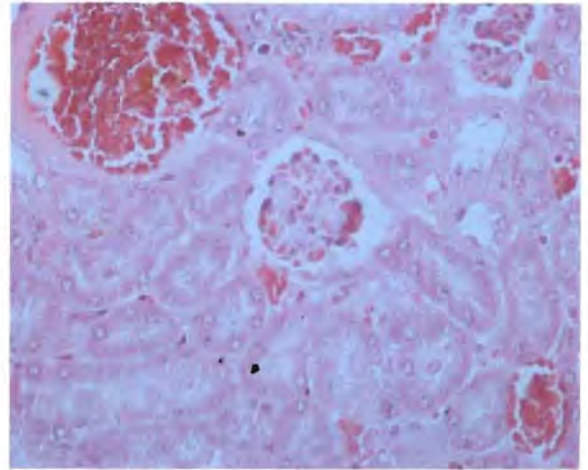
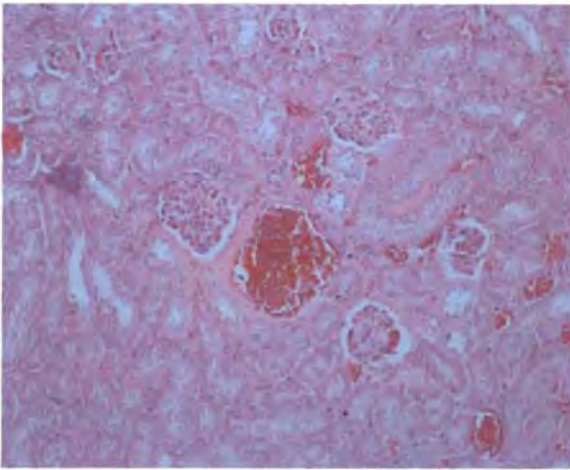


Figure 98 (female kidney) Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

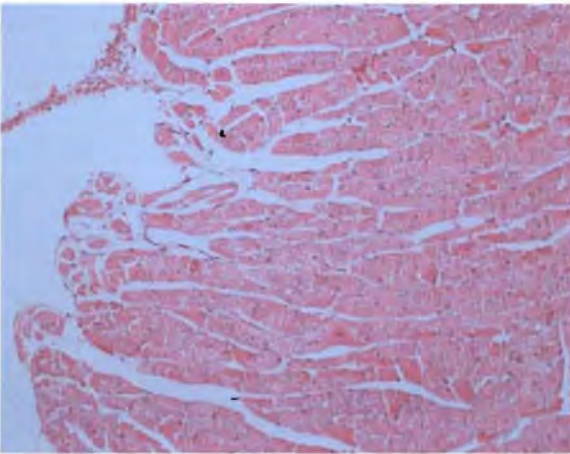


Figure 99 (female: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact. (x20)

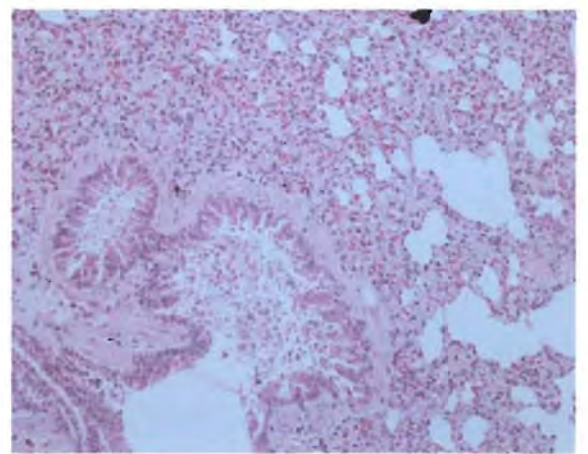


Figure 100 (female: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and broncheal epithelium are good shape or intact. (x20)

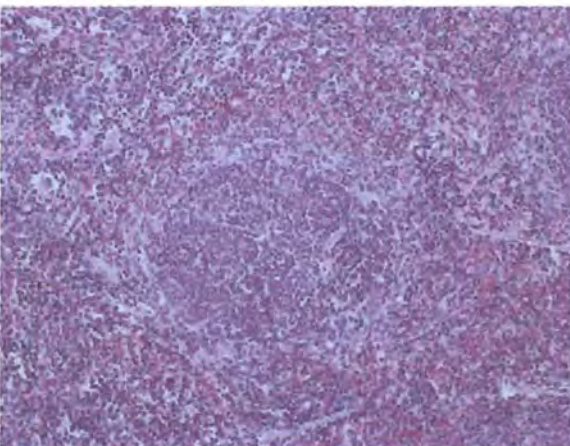


Figure 101 (female: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable

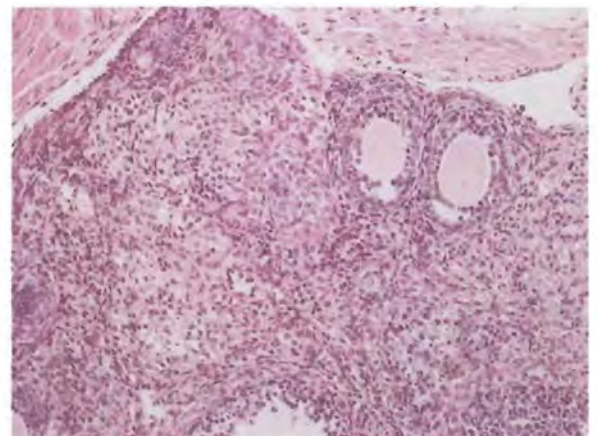


Figure 102 (ovary) Well preserved ovaries reveal intact normal structure with unremarkable change of benign ovarian stroma and eggs. (x20)

8. F1.2.2: 0.4 LD50 in female mice

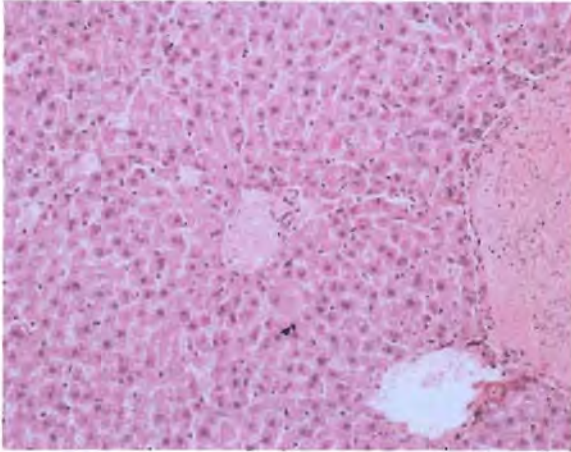


Figure103 (female: liver) Well preserved hepatic architecture with intact portal veins, hepatocytes and portal triads. No mass or abnormal lesion is noted. No remarkable change of hepatocytes is detected. No sinusoid dilatation or infiltration is seen. (x20)

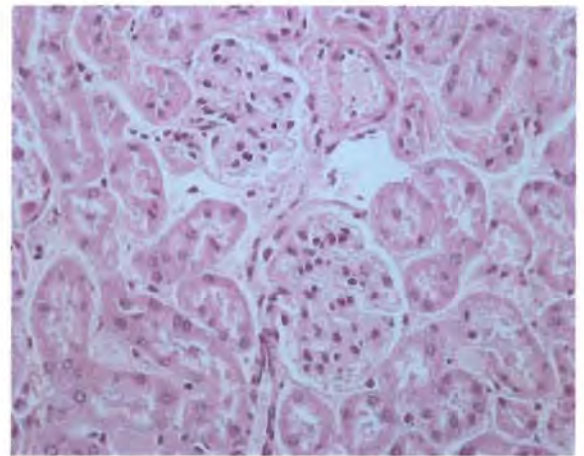
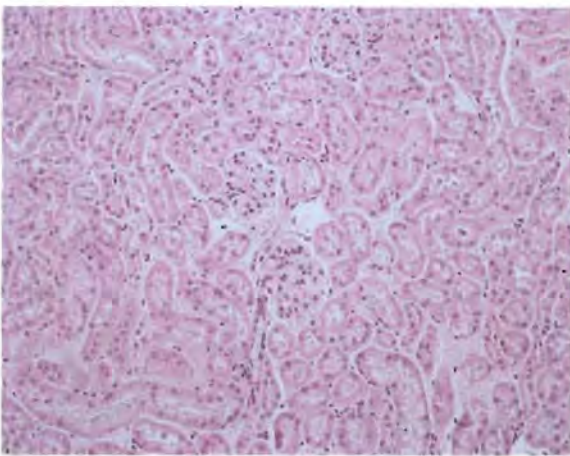


Figure 104 (female kidney) Kidney Kidney demonstrated well defined cortex and medulla areas with no remarkable change affecting renal glomeruli, renal tubules, interstitium and blood vessels. Fluid accumulation in capsular space of some glomeruli is noted. (Left x20, right x40)

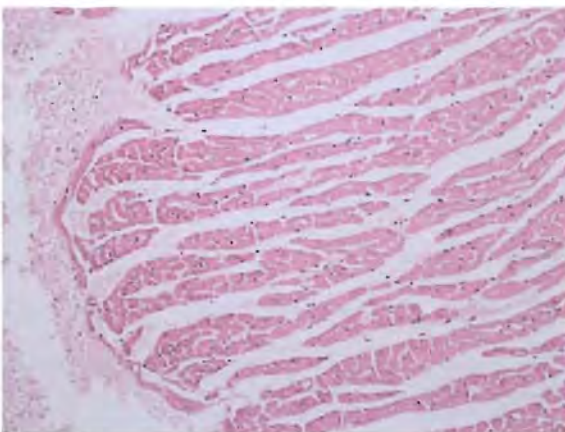


Figure 105 (female: heart) Cardiac muscle is free of infarction or ischemia. No significant change is detected. Vascular structure is intact.. (x20)

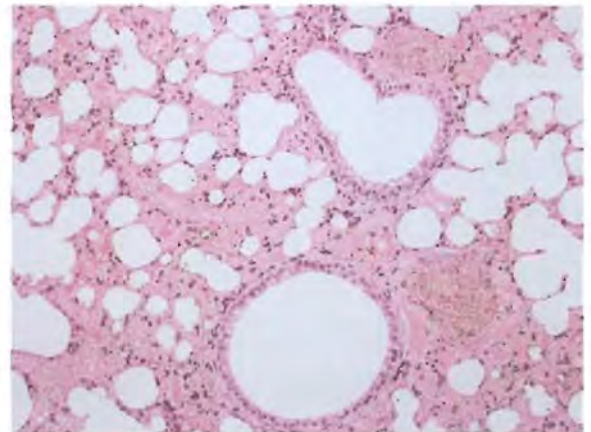


Figure 106 (female: lung) Benign lung tissue reveals spotty congested dilated vessels without parenchymal hemorrhage. Alveoli and bronchial epithelium are good shape or intact. (x20)

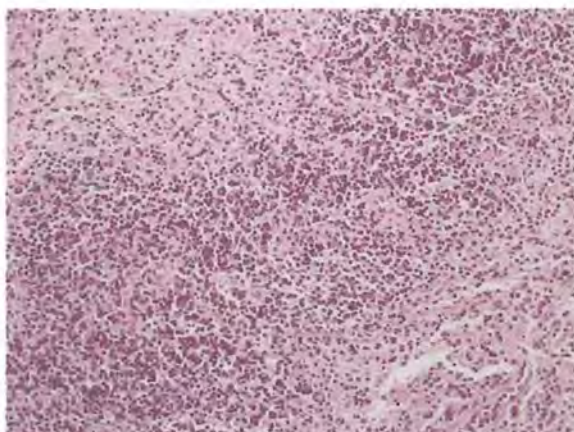


Figure 107 (female: spleen) Benign splenic parenchyma is composed of lymphoid tissue with mild congestion and no remarkable change. (x20)

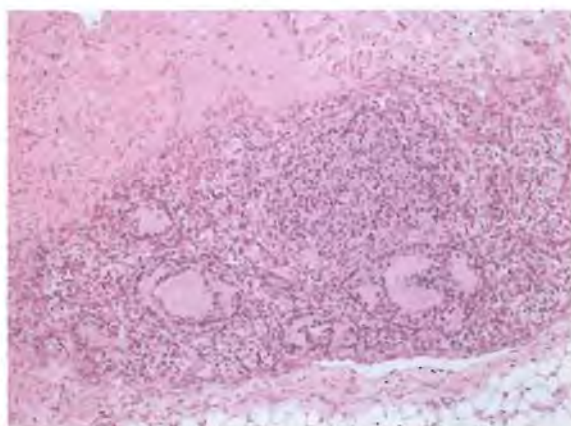


Figure 108 (ovary) Well preserved ovaries reveal intact normal structure with unremarkable change of benign ovarian stroma and eggs. (x20)

โครงการที่ 5

การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มี
ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

รายงานการวิจัย

การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย และ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒมพงษ์

น.ส. สุนุชชา สุนทรารชุน

นางสุจิตตรา ขุนทรัพย์

น.ส. อรวรรณ แซ่ไคว่

นาง พรรณีภา จุลสุคนธ์

น.ส. จุรีพร น้อยพรหม

รศ. โสภิต ธรรมอารี

รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการ (ไทย)

การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

ชื่อโครงการ (อังกฤษ)

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

หน่วยงานที่รับผิดชอบ

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
1871 ถนนพระรามสี่ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทร.(02)252 0161-4
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถนนพระรามสี่ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

ผู้ร่วมวิจัย

1. ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์
2. น.ส. สุนุชชา สุนทรารชุน
3. นางสุจิตตรา ขุนทรัพย์
4. น.ส. อรวรรณ แซ่ไคว่
5. นาง พรรณีภา จุลสุคนธ์
6. น.ส. จุรีพร น้อยพรหม
7. รศ.โสภิต ธรรมอารี

บทคัดย่อ

นำส่วนประกอบย่อย F 1.2.2 ที่แยกได้จากโครงการที่ 2 (การแยกส่วนพิษงูจงอาง เพื่อหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ) มาแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2 Dimensional gel electrophoresis พบจุดโปรตีน 18 จุด กระจายอยู่ระหว่าง pH 4.5 - 6 เมื่อย่อยจุดโปรตีน และ วิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วย Mass spectrometer และ MASCOT แล้วนำไปเทียบกับมวลโมเลกุลในฐานข้อมูลโปรตีนที่มีผู้รายงานไว้ (NCBI) พบว่า ที่ค่าความเชื่อมั่น > 0.95 ($p < 0.05$) มีจุดโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับมวลโมเลกุลโปรตีนของงูจงอาง 2 ชนิด จุดโปรตีนที่ 1, 2, 3 และ 4 มวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับมวลโมเลกุลของโปรตีน opharin precursor (ophanin) จุดที่ 7 และ 8 มวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับมวลโมเลกุลของโปรตีน long chain neurotoxin

ทำการออกแบบ primer ตามโปรตีนทั้ง 2 ชนิด สกัด mRNA จากต่อมพิษงูจงอาง จากนั้นทำ RT-PCR ได้ DNA ของ opharin precursor ขนาด 720 bp และ 276 bp ของ long chain neurotoxin ตามต้องการ นำ DNA เข้าสู่ PCR 2.1 cloning vector ตรวจสอบขนาดที่ถูกต้องด้วย restriction enzyme EcoRI และย้ายชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวเข้าสู่ pGEX-2T expression vector เพิ่มจำนวนใน DH5 α host strain ตรวจสอบความถูกต้องโดยใช้ EcoRI และทำ DNA sequencing พบว่ามี Opharin precursor อยู่ใน vector ในขนาดและทิศทางที่ถูกต้อง ขณะที่ Long chain neurotoxin ไม่พบ DNA ขนาดที่ถูกต้องและผล DNA sequencing ไม่เป็นไปตามที่ต้องการ จึงแก้ไขโดยทำการออกแบบ primer ใหม่ให้มี restriction site EcoRI และ BamHI เชื่อมต่อด้าน 5' primer ของ Long chain neurotoxin เพื่อง่ายต่อการเข้าสู่ pGEX-2T ซึ่งอยู่ระหว่างดำเนินการ ส่วน Opharin precursor ที่อยู่ใน pGEX-2T ใช้ตัวกระตุ้น IPTG ที่ความเข้มข้น อุณหภูมิ และเวลาต่างๆ กระตุ้นให้สร้างโปรตีน พบว่าที่ความเข้มข้นของ IPTG ที่ 0.1 mM อุณหภูมิ 37°C และ เวลา 3-4 ชม. เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง opharin precursor จากนั้นจึงแยกออกมาหาปริมาณโปรตีนได้ 0.35 mg/ml

Abstract

Eighteen protein spots were found distributed between pH 4.5-6 when two dimensional gel electrophoresis of Fraction 1.2.2 (from "Fractionation of the neuromuscular blocking compound from the venom of King cobra") was carried out. Analysis of protein spots by Mass spectrometer and "Mascot" showed that protein spot no. 1, 2, 3 and 4 were similar to opharin precursor (opharin) and spot no. 7 and 8 were similar to long chain neurotoxin of king cobra venom.

Primers were designed for these two proteins. DNA of Opharin precursor, 720 bp, and long chain neurotoxin, 276 bp, were obtained from RT PCR of mRNA extracted from the venom gland of king cobra. These cDNA were inserted into PCR 2.1 TOPO vector and pGEX-2T expression vector. Inserted vectors were checked by restriction enzyme EcoRI. Sequencing of DNA showed that opharin precursor was inserted correctly in size and direction in the vector while insertion of long chain neurotoxin was incorrect. New primer was designed to have restriction site EcoRI and BamHI connected to the 5' primer of long chain neurotoxin for insertion into pGEX-2T. The process is ongoing. Opharin precursor in pGEX-2T was stimulated with IPTG at different concentration, temperature and time. The optimum conditions were 0.1mM IPTG at 37^oC for 3-4 h. Protein concentration of the obtained product was 0.35 mg/ml.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย ขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถาบันเสวภา สภาอากาศไทย และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความร่วมมือและสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

บทที่	หน้า
บทคัดย่อ ภาษาไทย	II
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	IV
สารบัญเรื่อง	V
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	VIII
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของ โครงการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของ โครงการวิจัย	1
ขอบเขตของโครงการ	1
ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	1
ทฤษฎี สมมุติฐานหรือกรอบแนวความคิดของ โครงการวิจัย	2
วิธีดำเนินการวิจัย	3
ผลการทดลอง	9
วิจารณ์ผลการทดลอง	30
สรุปและข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก ก	
- Mass Spectrometry	33
- Electropherogram	55
ภาคผนวก ข	
- สารเคมีและอุปกรณ์	63
ประวัติคณะผู้วิจัย	65

สารบัญตาราง (List of tables)

ตาราง	หน้า
ตารางแผนการดำเนินงานตลอดโครงการ	2

สารบัญภาพ (List of Illustration)

ภาพ	หน้า
1. จุดโปรตีนจาก 2-Dimensional gel electrophoresis	10
2. ผลผลิตของ RT-PCR โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis	11
3. pCR [®] 2.1 TOPO vector ขนาด 3.9 Kb	13
4. ผล Recombinant plasmid DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme EcoRI	14
5. Expression vector; pGEX-2T ขนาด 4.948 Kb	15
6. Recombinant Opharin precursor ที่ถูกตัดด้วย EcoRI	16
7. ผล Multiple sequence alignment ของ nucleotide จาก โคลนทั้ง 4 เปรียบเทียบกับ Opharin precursor และ Ophanin	18-20
8. ผล Multiple sequence alignment ของ โปรตีนจาก โคลนทั้ง 4 เปรียบเทียบกับ Opharin precursor และ Ophanin	21
9. ลำดับ nucleotide และ โปรตีนของ Opharin precursor ที่ได้รับการบันทึกลงใน NCBI GenBank database	22
10. ผล 12% SDS-PAGE จาก โคลนที่ 1 และ โคลนที่ 3 ที่อุณหภูมิ	24
11. ผล 12% SDS-PAGE จาก โคลนที่ 1 และ โคลนที่ 3 ที่อุณหภูมิ 29°C	25
12. ผลการแยกโปรตีนครั้งที่ 1	26
13. ผลการแยกโปรตีนครั้งที่ 2	27
14. ผลการแยกโปรตีนครั้งที่ 3	28
15. การทดสอบการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	29

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

<u>คำย่อ</u>	<u>คำเต็ม</u>
pH	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
bp	คู่เบส
ug/ul	ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
°C	องศาเซลเซียส
α	อัลฟา
μ l	ไมโครลิตร
pI	ไอโซอิเล็กทริกพอยท์
pmol	พิโคโมล
β	เบตา
ng	นาโนกรัม
rpm	รอบต่อนาที
mM	มิลลิโมลาร์
M	โมลาร์
%	เปอร์เซ็นต์
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
mA	มิลลิแอมแปร์
Tm	อุณหภูมิหลอมละลาย
Kb	กิโลเบส
KDa	กิโลดาลตัน
ชม.	ชั่วโมง
มล/นาที่	มิลลิลิตรต่อนาที

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

มีการพัฒนาจากองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลชีพ นำมาใช้ประโยชน์ในการฆ่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ยาเหล่านั้นเรียกยาด้านจุลชีพ (antibiotics) ใช้รักษาโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ ปัจจุบันพิษจากแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* (Botulinum toxin) ถูกนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ โดยอาศัยฤทธิ์ที่ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อและถูกนำมาใช้ด้านความงามโดยเพื่อชะลอความเหี่ยวย่น ทำให้ผิวหนังตึงเรียบ ให้ผลที่น่าพอใจจนมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการเสริมความงาม จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสารประกอบของพิษงูที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ Botulinum toxin คือมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อจากพิษงูเอง เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาใช้ในทางการแพทย์และเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

งูจงอางเป็นงูพิษขนาดใหญ่ มีพิษต่อระบบประสาท (ไพบูล์ จินดกุลและคณะ, 2538) พิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) ประกอบด้วย neurotoxin ชนิด long-chain postsynaptic และเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น L-amino acid oxidase, phospholipase A₂, phosphodiesterase และ 5'-nucleotidase พิษงูชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นทั้ง haematotoxic และ neurotoxic สามารถจับอย่างจำเพาะกับ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) บริเวณ skeletal muscle neuromuscular junction เพื่อยับยั้งการส่งสัญญาณปลายประสาทไปที่ postsynaptic membrane ทำให้เกิดอัมพาตและเสียชีวิต (Peng et al., 2003) ปัจจุบัน α -neurotoxin หรือ postsynaptic neurotoxin ในพิษงูชนิดนี้มีการศึกษาอย่างน้อย 8 long chain 1 short chain และ 1 weak toxin (He et al., 2004) โดยมีการศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาอยู่เพียงชนิดเดียวคือ Hannalgesin (Pu et al., 1995) จากคุณสมบัติที่เด่นชัดดังกล่าวของพิษงูจงอาง จึงเป็นที่มาของการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการศึกษาชิ้นของ α -neurotoxin ซึ่งข้อมูลและผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปสู่แนวทางการแพทย์และเภสัชวิทยาต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อจำลองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อจากต่อมพิษงูจงอางในเชื้อ *E. coli*

ขอบเขตของโครงการ

เป็นการศึกษาจำกัดขอบเขตในการทดลองในห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลองเท่านั้น

ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

มีการศึกษา α -neurotoxin ของงูทะเล (*Hydrophis cyanocinctus*) โดยทำการ cloning, expression และทดสอบ recombinant neurotoxin ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับ amino acid sequence ที่ได้กับ amino acid sequence ที่มีรายงานใน GenBank (Peng et al., 2003) การนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2 Dimensional Gel electrophoresis

นำส่วนประกอบย่อย F 1.2.2 ที่แยกได้จากโครงการที่ 2 (การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ) มาแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2 Dimensional gel electrophoresis

ขั้นตอนการวิจัย

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่าง F 1.2.2 ใน rehydration solution 135 μ l ให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 60 μ g/ μ l

1.2 การแยกโปรตีนโดย 2 Dimensional gel electrophoresis (Berkelman T. and Stenstedt T. 1998)

rehydrate immobiline dry strip 15 ซม. ด้วย 130 μ l ตัวอย่าง F 1.2.2 ที่เตรียมไว้ นำ IPG strip ที่ rehydrate แล้วมา run first dimension นำ IPG strip ที่ run first dimension แล้ว equilibrate ด้วย equilibration buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6M Urea, 30 %v/v Glycerol 87%v/v, 2 % w/v SDS, 0.002 %w/v Bromophenol blue, DDW) ที่เติม DTT 100 mg/10ml และ IAA 250 mg/10ml ขั้นตอนละ 15 นาที ตามลำดับ นำ IPG strip ที่ equilibrate แล้ววางบนผิวหน้า 12.5% SDS-PAGE gel (ไม่มีชั้น stacking) ที่เตรียมไว้ ปิดทับด้วย agarose sealing solution (SDS electrophoresis buffer, 0.5 % Agarose, 0.002 %w/v Bromophenol blue), run second dimension ย้อม SDS-PAGE gel ด้วย Coomassie blue ฉายสีส่วนเกินออก ข่อยจุดโปรตีนที่ต้องการนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย trypsin

1.3 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของจุดโปรตีนที่แยกได้จาก 2 Dimensional gel electrophoresis

ผสมโปรตีนที่ย่อยด้วย trypsin แล้ว (tryptic peptide) กับ HCCA ในปริมาณเท่ากันนำมาหยดบน Mass spectrometer probe ปริมาตร 1 μ l ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (Dried droplet method) วิเคราะห์มวลโมเลกุลของโปรตีนโดย Mass spectrometer นำมวลโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จาก Mass spectrometer ไปเทียบกับ peptide mass fingerprints ที่มีผู้รายงานไว้ใน ฐานข้อมูลโปรตีน (NCBI) ด้วย MASCOT (Matrix Science) criteria ที่ใช้คือ fix modification carboxamidomethylation of cysteine และ variable modification methionine oxidation เทียบ pI และ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์กับ โปรตีนเป้าหมาย p-value ของ Protein scores ต้องน้อยกว่า 0.05 จึงนับว่าเชื่อถือได้

2. การโคลนนิ่ง (Cloning steps)

ขั้นตอนการวิจัย

2.1 ออกแบบ primers

ออกแบบ primers ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน 2 ชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทต่อกล้ามเนื้อ

2.2 การสกัด mRNA จากต่อมพิษงูจงอาง

สกัด mRNA โดยบดต่อมพิษงูจงอาง ขนาด 10 mg ในโกร่งบดยา จากนั้นนำไปสกัด mRNA โดยใช้ น้ำยา Oligotex Direct mRNA Microkit (QIAGEN, USA)

2.3 การเตรียมลำดับ nucleotide โดยวิธี RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

ทำการเตรียมลำดับ nucleotide โดยใช้ น้ำยา QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, USA) ดังนี้ RNase free water, 5xQIAGEN OneStep RT-PCR buffer, dNTP mix (100mM each dNTP), Primer Forward และ Reverse (อย่างละ 50 pmol/μl), Q- OneStep RT-PCR enzyme mix และ 1 μg mRNA template โดยในขั้นตอนการทำ Reverse Transcription PCR ประกอบด้วย 50°C 30 นาที, 95°C 15 นาที ตามด้วย 40 รอบของ 94°C 1 นาที, 52°C 1 นาที และ 72°C 1 นาที และ 72°C 10 นาที นำผลผลิต RT-PCR ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย 2% Agarose gel eletrophoresis เทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp จากนั้นสกัดแถบผลผลิต RT-PCR จาก Agarose gel โดยใช้ น้ำยา QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, USA) เพื่อนำมาเชื่อมต่อเข้ากับ pCR® 2.1 TOPO vector และนำเข้าสู่ Host strain DH5α *E.coli*

2.4 Cloning

นำผลผลิต RT-PCR ที่สกัดจาก agarose gel ขนาด 720 bp (Opharin fragments) และขนาด 276 bp (Long-chain neurotoxin) เชื่อมต่อเข้ากับ pCR® 2.1 TOPO vector; TOPO TA Cloning® kit (INVITROGEN, USA) จากนั้นคัดเลือก recombinant DNA โดยอาศัยความแตกต่างของสีฟ้าหรือขาว ที่มาจากการทำงานของ β-galactosidase โดยเลือกโคโลนีสีขาวมาทำการสกัด Recombinant Plasmid DNA อาศัย น้ำยา QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN, USA) จากนั้นนำมาตัดด้วย restriction enzyme EcoRI และตรวจวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel eletrophoresis เทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp

2.5 Expression Vector

สกัด Recombinant vector จากเชื้อ *E.coli* แล้วตัดด้วย restriction enzyme EcoRI จากนั้นสกัด DNA fragment ขนาด 720 bp (Opharin fragment) และ ขนาด 276 bp (Long-chain neurotoxin) ออกจาก agarose gel electrophoresis แล้วนำมาเชื่อมต่อเข้ากับ Expression Vector; pGEX-2T vector (Amersham Biosciences, USA) ที่ถูกตัดด้วย restriction enzyme EcoRI เช่นกัน โดยอาศัยน้ำยา T4 DNA ligase จากนั้นนำเข้าสู่ *E.coli* DH5 α

3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ละโปรตีน

ขั้นตอนการวิจัย

3.1 DNA Sequencing

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการทำ DNA Sequencing จาก PCR product และ plasmid DNA อาศัยน้ำยา BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Gene System, USA) ในปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) ปริมาณ 20 μ l ประกอบด้วย BigDye terminator 4 μ l, 5xbuffer 4 μ l, 5 pmol ของ sequence primer และ 50-100 ng DNA template จาก PCR product หรือ 300-600 ng สำหรับ plasmid DNA ภายหลังจาก incubate 96 °c 10 วินาที ตามมาด้วย 25 รอบของ 95 °c 10 วินาที สำหรับการ denature, 50 °c 5 วินาที สำหรับการ annealing และ 60 °c 4 นาที สำหรับการ extension จากนั้นทำการกำจัด Unincorporated Dye Terminators ที่ปนเปื้อนออกโดยใช้ DyeEx 2.0 Spin kit (QIAGEN, USA) สารละลายที่ได้นำไปทำให้แห้งโดยใช้ Vacuum centrifuge เป็นเวลา 20-30 นาที จากนั้น DNA pellet ที่ได้จะถูกลำไปละลายด้วย 10 μ l Template Suppression Reagent (Perkin-Elmer) และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI PRISM Sequencer ที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 Alignment และ Computational Searching Sequences Analysis

ภายหลังจากการทำ DNA Sequencing ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ที่มีรายงานอยู่ใน NCBI database โดยใช้โปรแกรม BLAST N (Basic Local Alignment Search Tool) จากนั้นนำผลที่ได้ไปแปลงเป็นลำดับโปรตีน โดยอาศัย Expasy (Expert Protein Analysis System) Proteomics website ผลจากการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide และ โปรตีนจะถูกส่งไปที่ NCBI database เพื่อลงบันทึกต่อไป

การทำ Multiple Sequence Alignment เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนหรือแตกต่างของผลที่ได้ในทุกตัวอย่างกับตัวอย่างอื่น ๆ ที่สนใจ อาทิเช่น Opharin precursor และ Ophanin อาศัยโปรแกรม CLUSTAL W

4. การแสดงออกของโปรตีน

การแยกโปรตีนและการทดสอบการยับยั้งที่ปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

ขั้นตอนการวิจัย

4.1 Protein Expression

เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) ของ *E coli* ที่มี recombinant plasmid อยู่มาเลี้ยงใน 2 ml LB broth ที่มี ampicillin 50-100 $\mu\text{g/ml}$ นำไป incubate 37°C นาน 16-20 ชม. โดยเขย่าที่ 220-230 rpm จากนั้นปั่นที่ความเร็วสูงแล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ละลาย pellet ด้วย LB ที่มี ampicillin 50-100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตรเท่าเดิม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ให้ได้ค่าประมาณ 1-2 เดิม overnight culture 80 μl ลงใน flask ขนาด 250 มล. ที่มี LB และ ampicillin 50-100 $\mu\text{g/ml}$ อยู่ 8 มล. เลี้ยงเชื้อต่อไปที่สภาวะเดิมจนกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm จะได้ 0.5-0.7 จึงนำตัวอย่าง 1-2 มล. ปั่นที่ความเร็วสูงนาน 1 นาที เก็บ pellet ที่ -20°C เพื่อเป็น negative control ส่วนตัวอย่างที่เหลือเติมตัวกระตุ้นการสร้างโปรตีน 1 M IPTG (Isopropyl beta-D-thiogalactoside) ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆกันระหว่าง 0.05-2 mM IPTG จากนั้นเลี้ยงเชื้อต่อไปจนครบเวลา 3-4, 5-6, 24 ชม. เก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาเช่นเดียวกับ negative control (Not induce)

4.2 Sonication

ละลาย Pellet ด้วย 200 μl lysis buffer (1M Tris-HCl pH7.4, 0.5M EDTA pH8.0, 10% TritonX100) จากนั้นทำการสลายเซลล์ด้วยคลื่นความถี่สูงโดยใช้เครื่อง Sonicator (Ultrasonic Processor, Sonics, USA) 30 วินาที หยุด 30 วินาที จำนวน 3 ครั้ง ในน้ำแข็ง ปั่นที่ความเร็วสูง นาน 30 นาที ที่ 4°C ดูด supernatant และ pellet เก็บ -20°C เพื่อนำมาตรวจสอบต่อไป

4.3 SDS-PAGE

เตรียม 12% ของ Resolving gel และ 5% Stacking gel ดังนี้

12%Resolving gel

Distilled water	1.6 ml
30% Acrylamide mix	2.0 ml
1.5 M Tris (pH8.8)	1.3 ml
10% SDS	0.05 ml
10% ammonium persulfate	0.05 ml
TEMED	0.002 ml

5% Stacking gel

Distilled water	1.4 ml
30% Acrylamide mix	0.33 ml
1.0 M Tris (pH6.8)	0.25 ml
10% SDS	0.02 ml
10% ammonium persulfate	0.02 ml
TEMED	0.002 ml

การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยละลาย pellet ด้วย 100 μ l 1.5 M Tris (pH8.8) ครอบด้วยหัวเข็ม ขนาด 27 gauge 2-3 ครั้ง นำ 10 μ l ของตัวอย่างผสมกับน้ำตาล sucrose จำนวนเล็กน้อย รวมทั้ง 0.005% Bromophenol Blue, 1% SDS และ 2-mercaptoethanol อย่างละ 1 μ l ต้มเค็ลล 5 นาที จากนั้น load ตัวอย่างลงใน 12% SDS-PAGE ที่เตรียมไว้โดยใช้ 1X Running buffer (0.25M Tris-HCl, 1.92M glycine, 1% w/v SDS) เป็นตัวนำประจุ

4.4 Coomassie Brilliant Blue Staining

นำแผ่น polyacrylamide gel แช่ใน Coomassie Brilliant Blue (0.25% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid) ประมาณ 40 นาที บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างสีออกโดยใช้ destaining solution (30% methanol, 10% glacial acetic acid) ทิ้งไว้ข้ามคืนและล้างซ้ำอีก 2-3 ครั้งจนกว่าจะเห็น band ต่างๆชัดเจน

4.5 Western Blot

ภายหลังจากการทำ SDS-PAGE โปรตีนบน polyacrylamide gel จะถูกย้ายมาที่กระดาษ nitrocellulose ซึ่งวางประกอบอยู่บนกระดาษกรองและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Western blot ประกอบชุดอุปกรณ์ของเครื่อง Trans-Blot machine เข้าด้วยกัน อาศัย transfer buffer (0.025 M Tris, 0.2 M glycine, 20% w/v methanol) ในถังที่มีน้ำเย็นจาก ice pack โดยใช้กระแสไฟฟ้า 250 mA เวลา 2-3 ชม. จากนั้นตัดแผ่นกระดาษ nitrocellulose ส่วนแรกแช่ในสี amido black ส่วนที่เหลือแช่ใน blocking buffer (5% w/v BSA ใน TBST 30 ml) ที่ 37°C 1 ชม. ล้างด้วย TBST (0.05 M Tris, 0.05% w/v tween 20) 3 ครั้งๆละ 5 นาที แช่แผ่น nitrocellulose ที่ 4°C ข้ามคืนใน 3% BSA ผสมกับ 200 μ l เซรุ่มพิษงูจงอาง วันต่อมาล้างกระดาษด้วย TBST 4 ครั้งๆละ 7 นาที และเติม 1:1000 dilutions ใน TBST ของ Rabbit AntiHorse IgG Peroxidase Conjugate Antibody (Sigma, USA) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. ล้างด้วย TBST 4 ครั้งๆละ 6 นาที เติม substrate solution 4 มล. (1 เม็ด 4-chloro ใน 10 มล. methanol), 20 มล. PBS pH7.2 และ 10 μ l 35% H₂O₂ เก็บในที่มืดจนกว่าจะเห็น band ที่ต้องการ

4.6 Protein Purification

ทำการกระตุ้นการสร้างโปรตีนตามขั้นตอน แต่ใช้ LB ผสม ampicillin 50-100 $\mu\text{g/ml}$ ในการเลี้ยง เซลล์ปริมาณ 400 มล. ภายหลังปั่นที่ความเร็วสูง เติม lysis buffer 20 มล. เพื่อสลายเซลล์ด้วยคลื่นความถี่สูง จากนั้นปั่นเก็บตัวอย่าง และนำมาแยกโปรตีนที่ต้องการ โดยใช้ GSTrap FF affinity column (GE Healthcare, Sweden) ขนาด 1 มล. โดยล้าง column ด้วย PBS pH7.2 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 pH7.2) ปริมาตร 5-10 มล. จากนั้นเติมตัวอย่างประมาณ 2-3 ml โดยอาศัย Syringe ขนาด 5 มล. ให้มีอัตราการไหล 0.2-1 มล./นาที จากนั้นชะ column ด้วย PBS pH7.2 ประมาณ 5-10 มล. ให้มีอัตราการไหล 1-2 มล./นาที ทำการผสม Thrombin mix: 80 μl thrombin solution (1U/ μl) กับ 920 μl PBS pH 7.2 เติมลงใน column และ incubate 4 ชม. จากนั้นชะโปรตีนที่ต้องการออกมาจาก column ด้วย PBS pH 7.2 ประมาณ 5 มล. ตามด้วย elution buffer (50mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione pH8.0) และล้าง column ด้วย PBS pH 7.2 5-10 มล.

4.7 Concentration of Protein

ภายหลังการแยกโปรตีนที่ต้องการ ทำการกำจัดสารละลายที่ปนเปื้อนอยู่ออกพร้อมกับเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน โดยการใช้ Vivaspin 2 (Sartorius, USA) ปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm 10 นาที จากนั้นกำจัดเกลือออกโดยเติม 10 mM TBS pH 7.4 ปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ก่อนนำไปทดสอบต่อไป

4.8 Neuromuscular blocking Test

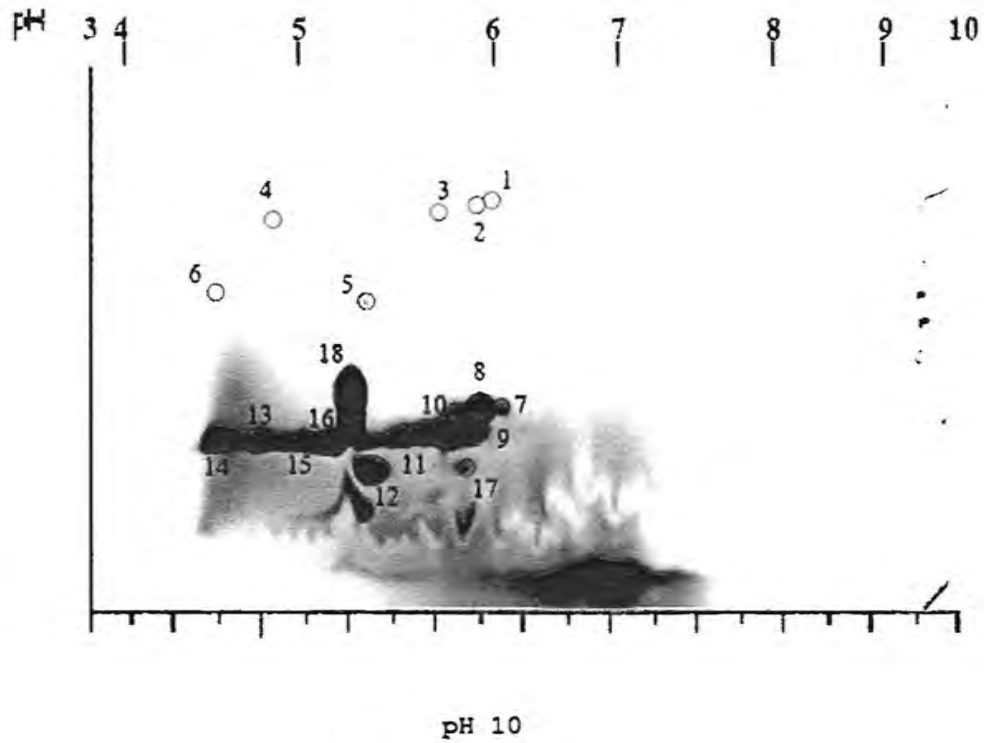
นำตัวอย่างที่ได้จากการแสดงออกของโปรตีน มาทดสอบการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (Neuromuscular blocking) ใน Mouse Phrenic Nerve - Hemi-diaphragm Preparation ตามวิธีในโครงการที่ 2

ผลการทดลอง

1. การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2 Dimensional Gel electrophoresis

ส่วนประกอบย่อย F 1.2.2 เมื่อนำไปแยกโดยเทคนิค 2-dimensional gel electrophoresis พบจุดโปรตีน 18 จุด กระจายอยู่ระหว่าง pH 4.5 - 6 (รูปที่ 1) เมื่อย่อยจุดโปรตีน และ วิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วย Mass spectrometer และ MASCOT แล้วนำไปเทียบกับมวลโมเลกุลในฐานข้อมูลโปรตีนที่มีผู้รายงานไว้ (NCBI) พบว่า ที่ค่าความเชื่อมั่น > 0.95 ($p < 0.05$) มีจุดโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับมวลโมเลกุลโปรตีนของงูจงอาง 2 ชนิด จุดโปรตีนที่ 1, 2, 3 และ 4 มวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับมวลโมเลกุลของโปรตีน ophanin precursor (opharin) จุดที่ 7 และ 8 มวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับมวลโมเลกุลของโปรตีน long chain neurotoxin จึงใช้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน 2 ชนิดนี้กำหนด primer และ vector สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป

ส่วนมวลโมเลกุลของจุดโปรตีนที่เหลือไม่สามารถเทียบได้กับมวลโมเลกุลใดของพิษงูจงอางที่มีผู้รายงานไว้ในฐานข้อมูลโปรตีน แต่เทียบได้กับมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนที่จำเพาะเฉพาะงูจงอาง



หมายเหตุ: วงสีแดง คือ ตำแหน่งจุด โปรตีนที่ย่อย และ วิเคราะห์

รูปที่ 1. จุดโปรตีนจาก 2-Dimensional gel electrophoresis

2. การโคลนนิ่ง

2.1 การออกแบบ primers

ทำการออกแบบ primers ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน 2 ชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทต่อกล้ามเนื้อ ได้ผลดังนี้

- Opharin precursor (Ophanin)

OPH - Forward: 5' ATGATTGCCTTCACCTTGCTAAGTC 3'

OPH - Reverse: 5' TTATATTATTTATTGTGGCAGAAGC 3'

ทั้ง Forward และ Reverse Primers มีค่า Tm = 56^oc

- *Ophiophagus hannah* isolate lntx3 long chain neurotoxin precursor

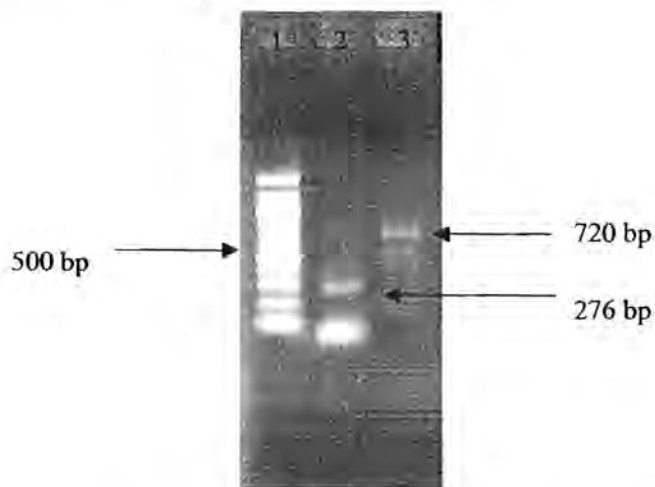
LNTX - Forward: 5' ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTT 3'

LNTX - Reverse: 5' TCAAGGTCTCAATTTCCGGATGTG 3'

Forward Primer มีค่า Tm = 61^oc และ Reverse Primer มีค่า Tm = 59^oc

2.2 การเตรียมลำดับ nucleotide โดยวิธี RT-PCR

การเตรียมลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี RT-PCR โดยใช้ primers จากข้อ 2.1 และใช้สารต้นแบบของ mRNA ที่สกัดจากต่อมพิษงูจงอาง ได้ผลผลิตของ Opharin ขนาด 720 bp และผลผลิตของ long chain neurotoxin precursor ขนาด 276 bp ตามที่ต้องการ (รูปที่ 2.)



รูปที่ 2. แสดงผลผลิตของ RT-PCR โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis แถวที่ 1. คือเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp แถวที่ 2 แถบผลผลิต long chain neurotoxin precursor ขนาด 276 bp แถวที่ 3. แถบผลผลิต Opharin ขนาด 720 bp

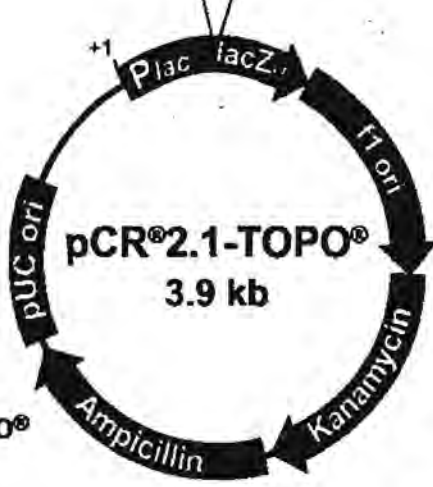
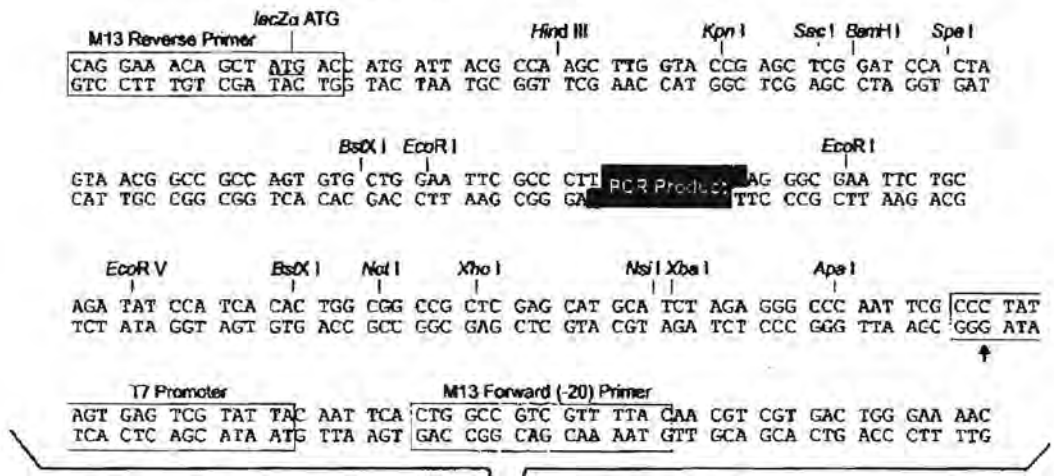
2.3 Cloning

จากนั้นเชื่อมต่อกับผลผลิต RT-PCR long chain neurotoxin precursor ขนาด 276 bp และ Opharin ขนาด 720 bp เข้ากับ pCR[®] 2.1 TOPO vector (รูปที่ 3.) โดยใช้ส่วนของ TOPO TA Cloning[®] kit แล้วนำเข้าสู่ Host strain DH5 α *E.coli* คัดเลือก recombinant DNA อาศัยความแตกต่างของสีฟ้าหรือขาวที่มาจากการทำงานของ β -galactosidase โดยเลือกโคโลนีสีขาวมาทำการสกัด Recombinant Plasmid DNA อาศัยน้ำยา QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN, USA) แล้วนำมาตัดด้วย restriction enzyme EcoRI และตรวจวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp พบว่ามีผลผลิต RT-PCR ของ long chain neurotoxin precursor ขนาด 276 bp ตรงตามที่ต้องการ แต่สำหรับ Opharin พบว่ามีแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 520 bp และ 200 bp แสดงว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Opharin มีตำแหน่งที่เอนไซม์ EcoRI สามารถตัดได้ ซึ่งไม่เหมือนลำดับดีเอ็นเอของ Opharin ที่มีรายงานอยู่ใน GENBANK ดังนั้นการตัดแถบดีเอ็นเอของ Opharin ที่จะนำมาสกัดออกจาก agarose gel เพื่อนำไปเชื่อมต่อเข้ากับ expression vector; pGEX-2T จึงต้องใช้วิธี partial restriction enzyme digestion เพื่อให้ได้ขนาด 720 bp ตามที่ต้องการ (รูปที่ 4.) โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ลดลง (1:10) และเวลาที่สั้นลง (15 หรือ 20 นาที)

Map of pCR[®]2.1-TOPO[®]

pCR[®]2.1-TOPO[®] Map

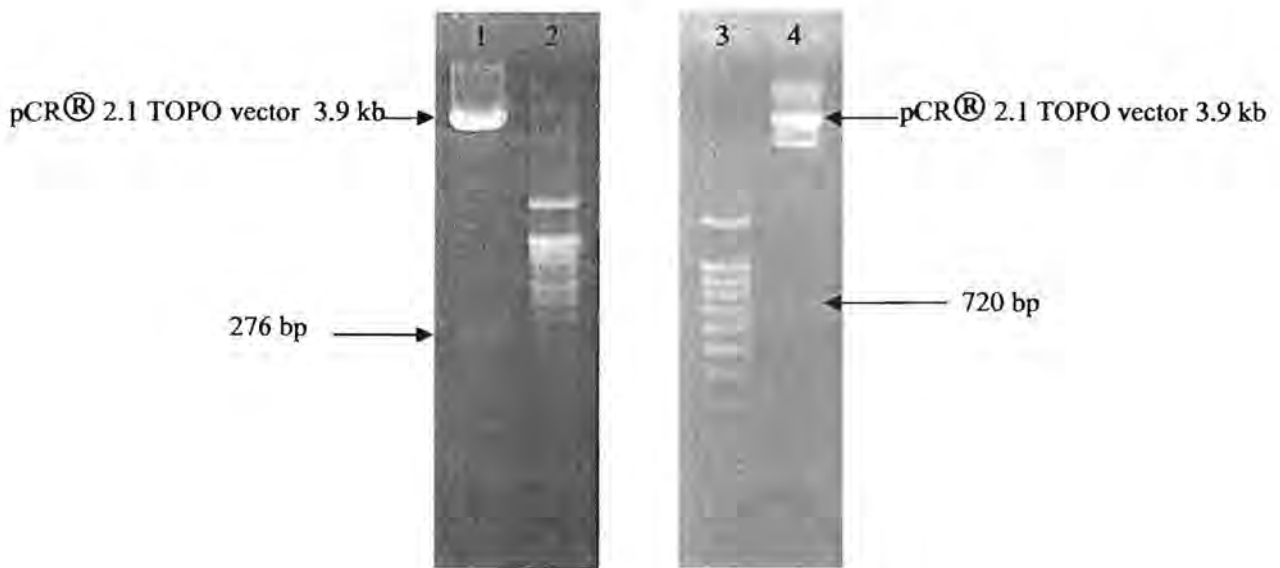
The map below shows the features of pCR[®]2.1-TOPO[®] and the sequence surrounding the TOPO[®] Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The arrow indicates the start of transcription for T7 polymerase. The complete sequence of pCR[®]2.1-TOPO[®] is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 24).



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-547
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- f1 origin: bases 548-985
- Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
- Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
- pUC origin: bases 3136-3809

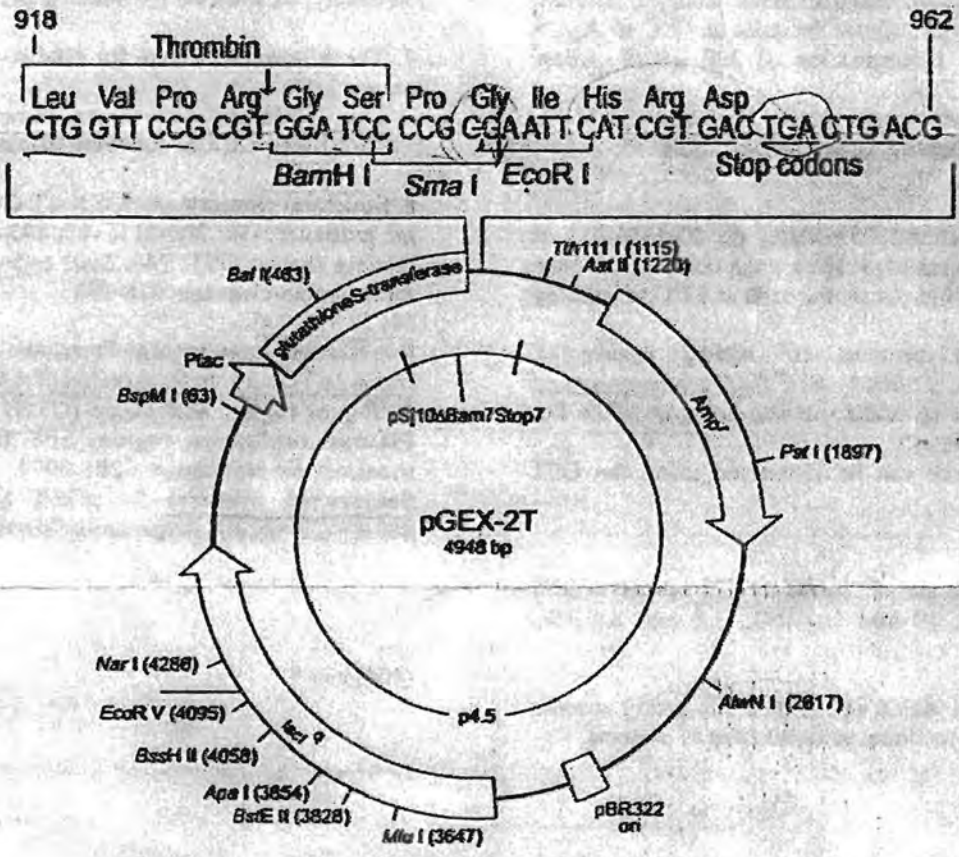
รูปที่ 3. แสดง pCR[®] 2.1 TOPO vector ขนาด 3.9 Kb



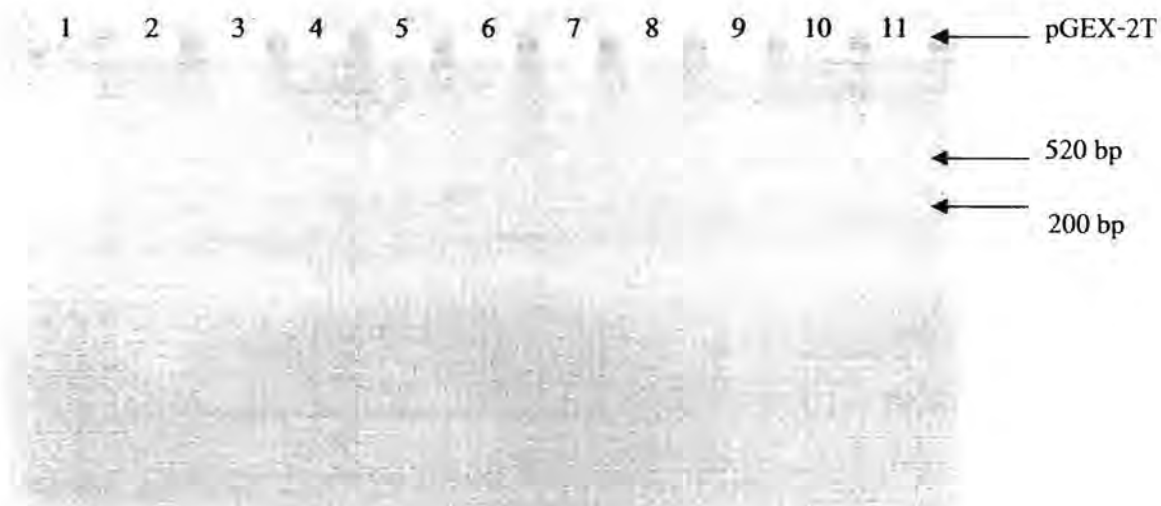
รูปที่ 4. แสดงผล Recombinant plasmid DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme EcoRI แถบที่ 1. pCR® 2.1 TOPO vector ขนาด 3.9 Kb และ long chain neurotoxin precursor fragment ขนาด 276 bp แถบที่ 2. คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp แถบที่ 3. คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp แถบที่ 4. pCR® 2.1 TOPO vector ขนาด 3.9 Kb และ Opharin precursor fragment ขนาด 720 bp

2.4 Expression Vector

สกัด Opharin precursor fragment ขนาด 720 bp และ long chain neurotoxin precursor fragment ขนาด 276 bp ที่ต้องการจาก agarose gel โดยใช้รีเอเจนต์ QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) นำมาเชื่อมต่อเข้ากับ pGEX-2T vector ซึ่งเป็น expression vector (รูปที่ 5.) ที่ถูกตัดด้วย restriction enzyme EcoRI โดยการเชื่อมต่ออาศัยรีเอเจนต์ T4 DNA ligase แล้วนำเข้าสู่ Host strain DH5 α *E.coli* ผลการเชื่อมต่อ Opharin precursor fragment ขนาด 720 bp สามารถเชื่อมต่อเข้ากับ pGEX-2T และนำเข้าสู่ Host strain DH5 α *E.coli* ได้ ในขณะที่ long chain neurotoxin precursor fragment ดำเนินการอยู่ในขั้นเชื่อมต่อเข้ากับ expression vector ยังไม่เรียบร้อย เนื่องจาก pGEX-2T vector ไม่มี selectable marker ดังนั้นการคัดเลือก Recombinant plasmid ของ Opharin precursor fragment จึงอาศัยการตัดด้วย restriction enzyme EcoRI เพื่อตรวจสอบว่า Recombinant plasmid มี Opharin precursor fragment ขนาด 720 bp ถูกต้อง (รูปที่ 6.) เมื่อได้ Recombinant plasmid ที่มีขนาดที่ถูกต้องแล้ว นำ Opharin recombinant ทั้งหมดส่งวิเคราะห์หาลำดับ nucleotide ของ Opharin precursor fragment เพื่อตรวจสอบว่า Recombinant plasmid ที่ได้มีลำดับ nucleotide และทิศทางที่ถูกต้อง จากนั้นนำ Recombinant plasmid ที่ได้ทำการศึกษการแสดงออกของโปรตีนต่อไป



รูปที่ 5. แสดง Expression vector; pGEX-2T ขนาด 4.948 Kb



รูปที่ 6. แสดง Recombinant Opharin precursor ที่ถูกตัดด้วย EcoRI แถบที่ 1. คือเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp แถบที่ 2-11. pGEX-2T expression vector ขนาด 4.948 Kb, Opharin precursor fragment ขนาด 520 bp และ Opharin precursor fragment ขนาด 200 bp

สำหรับ Long chain neurotoxin precursor fragment ยังไม่สามารถเชื่อมต่อเข้ากับ expression vector pGEX-2T ดำเนินการแก้ไข โดยออกแบบ primers ให้มี Restriction enzyme BamHI ต่อเข้ากับด้าน 5' ของ Forward primer และ Restriction enzyme EcoRI ต่อเข้ากับด้าน 5' ของ Reverse primer แล้วสร้าง cDNA จาก RT-PCR โดยใช้ mRNA เป็น template จากนั้นนำมาตัดด้วย Restriction enzyme EcoRI และ Restriction enzyme BamHI พร้อมทั้งตัด pGEX-2T expression vector ด้วย enzyme เดียวกัน นำ Long chain neurotoxin precursor fragment เชื่อมต่อเข้ากับ pGEX-2T expression vector ด้วย T4 DNA ligase แล้วนำเข้าสู่ DH5 α *E.coli* ต่อไป ขณะนี้ได้ดำเนินการสร้าง cDNA และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ DNA sequencing เรียบร้อยแล้วและกำลังดำเนินการอยู่ในขั้นตอนการเชื่อมต่อเข้า pGEX-2T expression vector

3. Alignment และ Computational Searching Sequences Analysis

การวิเคราะห์ผลของนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับยีนตัวอื่นที่มีรายงานใน NCBI GENBANK database อาศัยโปรแกรม BLAST N และ alignment โดยใช้ CLUSTAL W พบว่ามีเพียง 4 โคลนที่อยู่ใน pGEX-2T ในทิศทางที่ถูกต้องรวมทั้งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันและเมื่อเปรียบเทียบกับ Opharin precursor (GENBANK accession number AY299475) และ Ophanin (GENBANK accession number AY181984) พบว่าทั้ง 4 โคลนเหมือนกับ Opharin precursor และ Ophanin 82.4 % โดยมีนิวคลีโอไทด์ 6 ตัวหายไป (รูปที่. 7) เมื่อเปรียบเทียบลำดับโปรตีนของทั้ง 4 โคลนกับ Opharin precursor และ Ophanin พบว่าเหมือนกัน 68.5 % และมีโปรตีนหายไป 2 ตัว (รูปที่. 8) ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนที่ได้จากการ

ตรวจวิเคราะห์ได้ส่งไปบันทึกในฐานข้อมูลของ NCBI GENBANK database ภายได้ GENBANK accession number FJ767755 (รูปที่. 9)

Opharin_clone3 ATGATTGCCTTCACCTTGCTAAGTCTTGCTGCAGTGCTGCAACAGTCTTCTGGAAGTGT
Opharin_clone8 ATGATTGCCTTCACCTTGCTAAGTCTTGCTGCAGTGCTGCAACAGTCTTCTGGAAGTGT
Opharin_clone1 ATGATTGCCTTCACCTTGCTAAGTCTTGCTGCAGTGCTGCAACAGTCTTCTGGAAGTGT
Opharin_clone9 ATGATTGCCTTCACCTTGCTAAGTCTTGCTGCAGTGCTGCAACAGTCTTCTGGAAGTGT
Opharin_precursor ATGATTGCCTTCACCTTGCTAAGTCTTGCTGCAGTGCTTCAACAGTCTTTTGGAAATGTT
Ophanin ATGATTGCCTTCACCTTGCTAAGTCTTGCTGCAGTGCTTCAACAGTCTTTTGGAAATGTT

Opharin_clone3 GATTTTGCTTCTGAGTCAAGTAACAAAAGAGAAAACAAAAGCAGATTGTTGACAAGCAC
Opharin_clone8 GATTTTGCTTCTGAGTCAAGTAACAAAAGAGAAAACAAAAGCAGATTGTTGACAAGCAC
Opharin_clone1 GATTTTGCTTCTGAGTCAAGTAACAAAAGAGAAAACAAAAGCAGATTGTTGACAAGCAC
Opharin_clone9 GATTTTGCTTCTGAGTCAAGTAACAAAAGAGAAAACAAAAGCAGATTGTTGACAAGCAC
Opharin_precursor GATTTTAATTCCGAGTCAACCAGGAGACAAAAAACAAGGAGATTGTTGACTTGCAC
Ophanin GATTTTAATTCCGAGTCAACCAGGAGACAAAAAACAAGGAGATTGTTGACTTGCAC

Opharin_clone3 AATGCTTTAAGGAGATCAGTGAAACCAACTGCTAGGAACATGTTACGAATGGAATGGAAT
Opharin_clone8 AATGCTTTAAGGAGATCAGTGAAACCAACTGCTAGGAACATGTTACGAATGGAATGGAAT
Opharin_clone1 AATGCTTTAAGGAGATCAGTGAAACCAACTGCTAGGAACATGTTACGAATGGAATGGAAT
Opharin_clone9 AATGCTTTAAGGAGATCAGTGAAACCAACTGCTAGGAACATGTTACGAATGGAATGGAAT
Opharin_precursor AATCTTTAAGGAGATCAGTGAGTCCAAGTCTAGCAACATGCTAAAAATGCAATGGTAT
Ophanin AATCTTTAAGGAGATCAGTGAGTCCAAGTCTAGCAACATGCTAAAAATGCAATGGTAT

Opharin_clone3 TCTAATGCTGCTCAAAATGCAAAACGTTGGGCAGATAGATGTTCTTTTGCTCACAGTCCA
Opharin_clone8 TCTAATGCTGCTCAAAATGCAAAACGTTGGGCAGATAGATGTTCTTTTGCTCACAGTCCA
Opharin_clone1 TCTAATGCTGCTCAAAATGCAAAACGTTGGGCAGATAGATGTTCTTTTGCTCACAGTCCA
Opharin_clone9 TCTAATGCTGCTCAAAATGCAAAACGTTGGGCAGATAGATGTTCTTTTGCTCACAGTCCA
Opharin_precursor CCTGAAGCTGCTTCAAATGCAGAACGTTGGGCCAGTAAGTCTTGGTTCATAGTCCA
Ophanin CCTGAAGCTGCTTCAAATGCAGAACGTTGGGCCAGTAAGTCTTGGTTCATAGTCCA
**


```

Opharin_clone3      TATGTTTGTCAATACTGCCAGCAGGGAATATCAGAGGTTCAATTGCTACTCCATATAAA
Opharin_clone8      TATGTTTGTCAATACTGCCAGCAGGGAATATCAGAGGTTCAATTGCTACTCCATATAAA
Opharin_clone1      TATGTTTGTCAATACTGCCAGCAGGGAATATCAGAGGTTCAATTGCTACTCCATATAAA
Opharin_clone9      TATGTTTGTCAATACTGCCAGCAGGGAATATCAGAGGTTCAATTGCTACTCCATATAAA
Opharin_precursor   TATGTTTGTCAATACTGCCAGCAGGGAATATCAGAGGTTCAATTGCTACTCCATATAAA
Ophanin             TATGTTTGTCAATACTGCCAGCAGGGAATATCAGAGGTTCAATTGCTACTCCATATAAA
*****

```

```

Opharin_clone3      TCAGGGCCACCTTGTGGGGACTGTCCTTCGGCTTGTGACAACGGACTATGCACAAATCCT
Opharin_clone8      TCAGGGCCACCTTGTGGGGACTGTCCTTCGGCTTGTGACAACGGACTATGCACAAATCCT
Opharin_clone1      TCAGGGCCACCTTGTGGGGACTGTCCTTCGGCTTGTGACAACGGACTATGCACAAATCCT
Opharin_clone9      TCAGGGCCACCTTGTGGGGACTGTCCTTCGGCTTGTGACAACGGACTATGCACAAATCCT
Opharin_precursor   TCAGGGCCACCTTGTGGGGACTGTCCTTCGGCTTGTGACAACGGACTATGCACAAATCCT
Ophanin             TCAGGGCCACCTTGTGGGGACTGTCCTTCGGCTTGTGACAACGGACTATGCACAAATCCT
*****

```

```

Opharin_clone3      TGCAAATATAAAGATGACTTCTCGAACTGCCAATCTTTAGCGAAACAAACTAAATGCCAG
Opharin_clone8      TGCAAATATAAAGATGACTTCTCGAACTGCCAATCTTTAGCGAAACAAACTAAATGCCAG
Opharin_clone1      TGCAAATATAAAGATGACTTCTCGAACTGCCAATCTTTAGCGAAACAAACTAAATGCCAG
Opharin_clone9      TGCAAATATAAAGATGACTTCTCGAACTGCCAATCTTTAGCGAAACAAACTAAATGCCAG
Opharin_precursor   TGCACACTTTATAATGAGTACACTAACTGCGATAGTTTGGTGAACAAAGTAGCTGCCAG
Ophanin             TGCACACTTTATAATGAGTACACTAACTGCGATAGTTTGGTGAACAAAGTAGCTGCCAG
**** * * * * **** * * * * ***** * * * * * ***** * * * * *

```

```

Opharin_clone3      ACTGAATGGATCAAGTCAAATGCCCTGCTTCTTGCTTCTGCCACAATAAAATAATATAA
Opharin_clone8      ACTGAATGGATCAAGTCAAATGCCCTGCTTCTTGCTTCTGCCACAATAAAATAATATAA
Opharin_clone1      ACTGAATGGATCAAGTCAAATGCCCTGCTTCTTGCTTCTGCCACAATAAAATAATATAA
Opharin_clone9      ACTGAATGGATCAAGTCAAATGCCCTGCTTCTTGCTTCTGCCACAATAAAATAATATAA
Opharin_precursor   GATGAGTGGATCAAGTCAAATGCCCTGCTTCTTGCTTCTGCCACAATAAAATAATATAA
Ophanin             GATGAGTGGATCAAGTCAAATGCCCTGCTTCTTGCTTCTGCCACAATAAAATAATATAA
*** *****

```

รูปที่ 7. แสดงผล Multiple sequence alignment ของ nucleotide จากโคลนทั้ง 4 เปรียบเทียบกับ Opharin precursor และ Ophanin (* แสดงความเหมือนของนิวคลีโอไทด์)

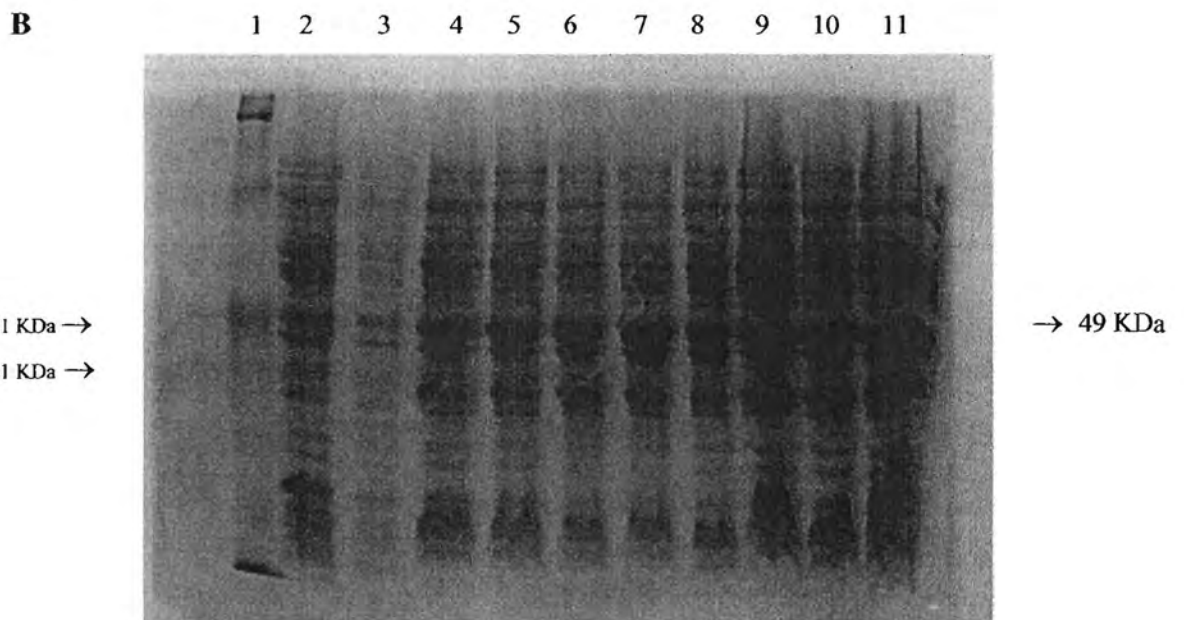
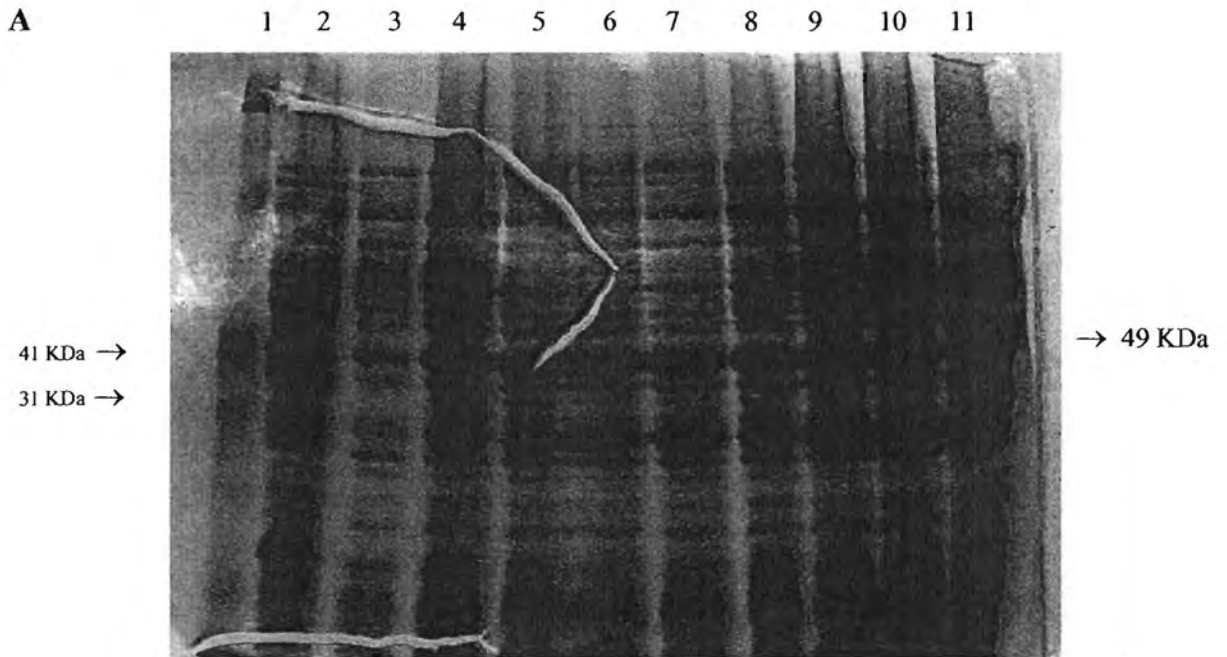
LOCUS FJ767755 714 bp mRNA linear VRT 11-MAR-2009
 DEFINITION *Ophiophagus hannah* opharin precursor, mRNA, complete cds.
 ACCESSION FJ767755
 VERSION FJ767755
 KEYWORDS .
 SOURCE *Ophiophagus hannah* (king cobra)
 ORGANISM *Ophiophagus hannah*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Lepidosauria; Squamata; Scleroglossa; Serpentes; Colubroidea;
 Elapidae; Elapinae; *Ophiophagus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 714)
 AUTHORS Suntrarachun,S., Khunsap,S., Tirawatnpong,T. and Thamaree,S.
 TITLE Cloning of the neuromuscular blocking compound from the venom of
 King Cobra (*Ophiophagus hannah*)
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 714)
 AUTHORS Suntrarachun,S., Khunsap,S., Tirawatnpong,T. and Thamaree,S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-FEB-2009) R&D, Queen Saovabha Memorial Institute,
 Thai Red Cross Society, Rama IV, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..714
 /organism="Ophiophagus hannah"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:8665"
 /tissue_type="venom gland"
 /country="Thailand"
 CDS 1..714
 /codon_start=1
 /product="opharin precursor"
 /protein_id="ACN93671"
 /translation="MIAFTLLSLAAVLQSSGTVDFASESSNKRENQKQIVDKH
 NALRRSVKPTARNMLQMEWNSNAAQNAKRWADRCFAHSPPHLRAVGKFCSCGE
 NLFMSSQPYAWSRVIQSWYDENKKFVYGVGANPPGVSIVGHYTIQVWYKSHLLGCA
 AARCSSKYLYVCQYCPAGNIRGSIATPYKSGPPCGDCPSACDNGLCTNPCKYKD
 DFSNCQSLAKQTKCQTEWIKSKCPASCFCHNKII"
 ORIGIN
 1 atgattgct icacctgct aagtctgct gcagtgctgc aacagctctc tggaaactgt
 61 gattttgct ctgagtcag taacaaaga gaaccacaa agcagatgt tgcagaacac
 121 aatgcttaa ggagatcagl gaaaccaact gctaggaaca tgttacaat ggaatggaat
 181 tctaattcg ctcaaaatgc aaaactgtgg gcagatagat gtcttttgc tcacagtcca
 241 ccacactaa gagctgtggg aaaattcagt tgtgtgaaa atctatcat gcaagtcaa
 301 cctatgcat ggagtagagt aattcagct tggatgatg aaaacaaaa attcgctat
 361 ggcgtggag caaacccacc aggtctgtt atggccatt ataccagat agtttggac
 421 aaaagcacc ttctgggtg tctgctgcc agatgctt catccaaata cctctatgt
 481 tgtcaatac gccagcagg gaatatcaga ggtcaattg clactcata taaatcaggg
 541 ccacctgtg gggactgtc ttcggctgt gacaacggac tatgcacaaa tcttgcaaa
 601 tataaagatg acttctcga ctcgaatc ttagcgaac aaactaaatg ccagactgaa
 661 tggatcaag caaaatgcc tctctctgc tctgccaca aaaaataat ataa
 //

รูปที่ 9. แสดงลำดับ nucleotide และโปรตีนของ Opharin precursor ที่ได้จากการโคลนและทำ DNA Sequencing ได้รับการบันทึกลงใน NCBI GenBank database ภายใต้ Accession number FJ767755.

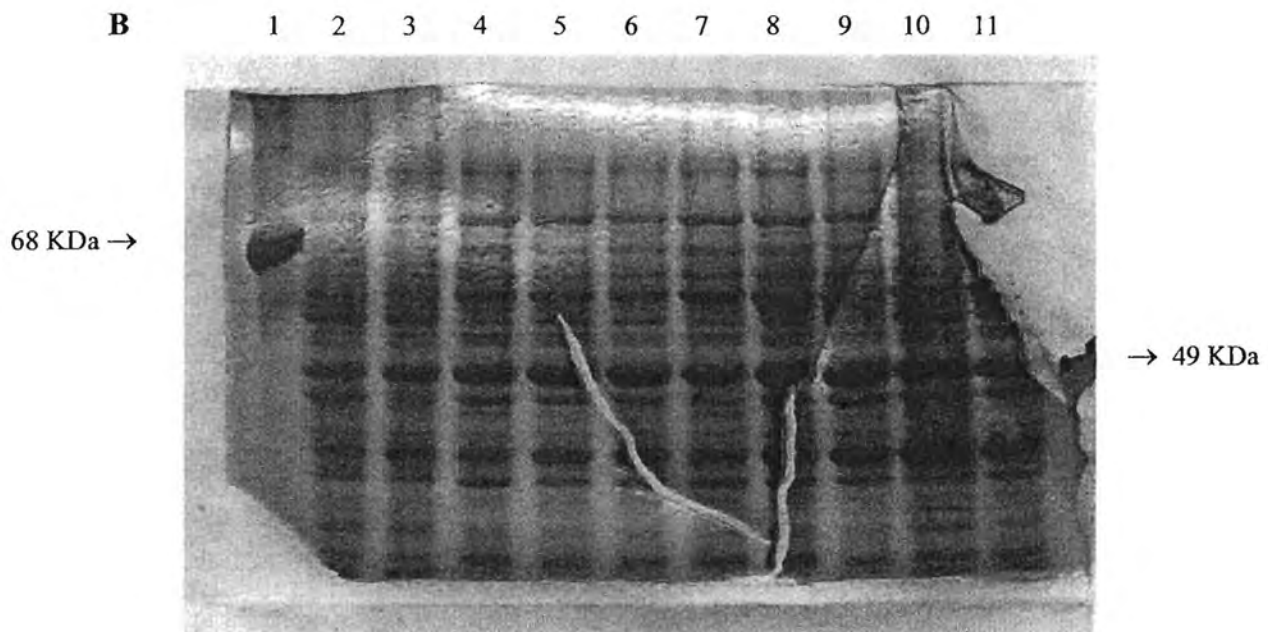
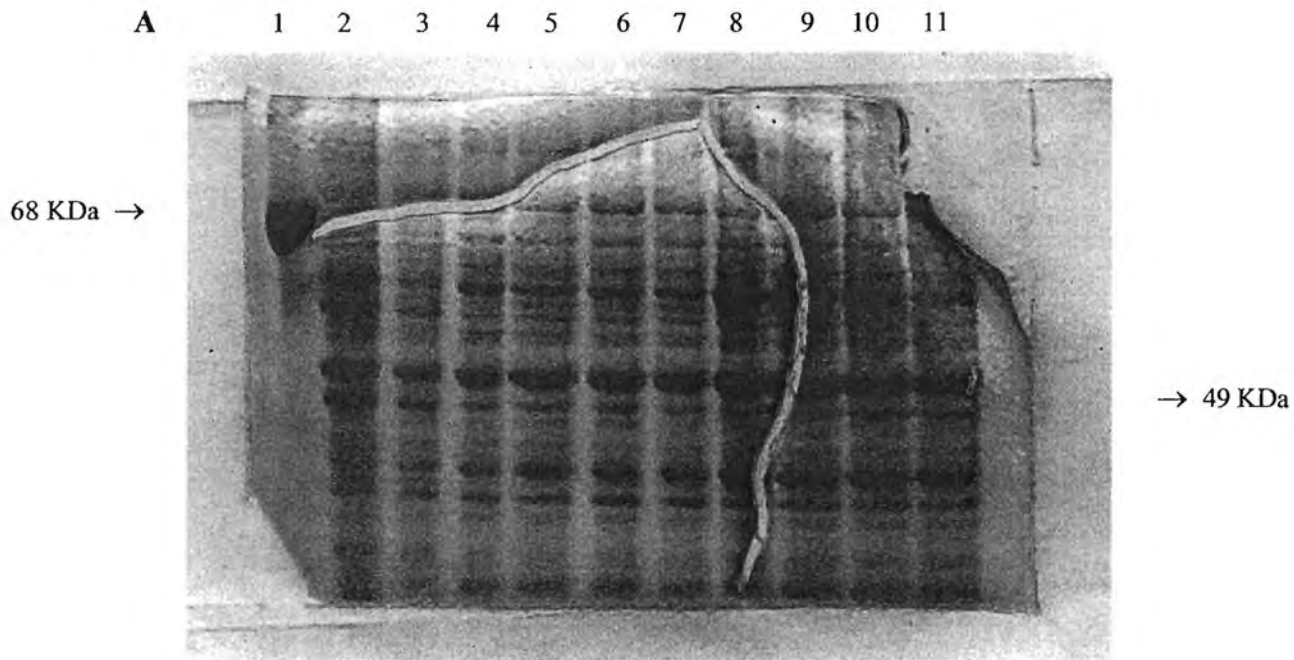
4. การแสดงออกของโปรตีน การแยกโปรตีนและการทดสอบการยับยั้งที่ปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

ภายหลังการคัดเลือกโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องทั้ง 4 โคลน มาทำการกระตุ้นเพื่อให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการ ที่อุณหภูมิ 37°C และ 29°C โดยใช้ 1M IPTG ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.05-1 mM เปรียบเทียบที่เวลาต่างๆกัน 3-4, 5-6, และ 24 ชม. นำมาตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE ปรากฏว่าพบ band หน้าที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 49 KDa ตามขนาดที่ต้องการเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้เติมตัวกระตุ้น IPTG (Not induce) และ ตัวอย่างที่เป็น *E. coli* อย่างเดียว (No insert) โดยภายหลังการหาสภาวะที่เหมาะสมของ IPTG ที่ใช้ในการกระตุ้นให้สร้างโปรตีนที่ต้องการที่อุณหภูมิ 37°C และ 29°C พบว่าที่ อุณหภูมิ 37°C ความเข้มข้นของ IPTG 0.05 และ 0.1 mM เวลา 3-4 ชม. จะปรากฏ band หนากว่าในตัวอย่างที่ความเข้มข้นของ IPTG เท่ากันแต่เป็นเวลา 5-6 ชม. และ 24 ชม. (รูปที่. 10) ขณะที่อุณหภูมิ 29°C ความเข้มข้นของ IPTG 0.05 และ 0.1 mM เวลา 5-6 ชม. เป็นช่วงเวลาที่ดีที่สุดที่โปรตีนที่ต้องการจะสามารถแสดงออก (รูปที่. 11) จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 37°C ความเข้มข้นของ IPTG 0.1 mM เวลา 3-4 ชม. มาใช้ในการกระตุ้นโคลนทั้ง 4 ให้สร้างโปรตีนที่ต้องการในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อนำมาแยกและใช้ทดสอบคุณสมบัติที่ต้องการ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนที่แสดงออกจะพบอยู่ใน pellet ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ inclusion body มากกว่าใน supernatant เมื่อทำ Western blot พบ band บาง ไม่ชัดเจนที่ขนาดเดียวกับที่พบใน SDS-PAGE

การแยกโปรตีนที่ต้องการออกมาโดยใช้ GSTrap FF affinity column ซึ่งเป็น column ขนาดเล็ก จึงต้องทำหลายครั้งเพื่อให้ได้โปรตีนในปริมาณที่มากพอที่จะใช้ในการทดสอบ โดยเติมตัวอย่างลงไปครั้งละ 2-3 ml นำ ทุกfraction ที่เก็บได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm พบว่าโปรตีนที่ต้องการจะถูกชะออกมาโดยใช้ elution buffer เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงประมาณ 0.7-1 คิดเป็น 0.35 mg/ml เลือกตัวอย่างดังกล่าวที่คาดว่าโปรตีนที่เราต้องการมาตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE จากนั้นทำให้เข้มข้นและกำจัดสิ่งเจือปนอื่นๆออก นำมาทดสอบการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อใน Mouse Phrenic Nerve - Hemidiaphragm Preparation ซึ่งภายหลังการเติมโปรตีน Opharin precursor ที่ได้จากการแสดงออกพบว่าไม่สามารถยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อได้ดีเท่ากับส่วนที่แยกได้จากพิษงูโดยตรง

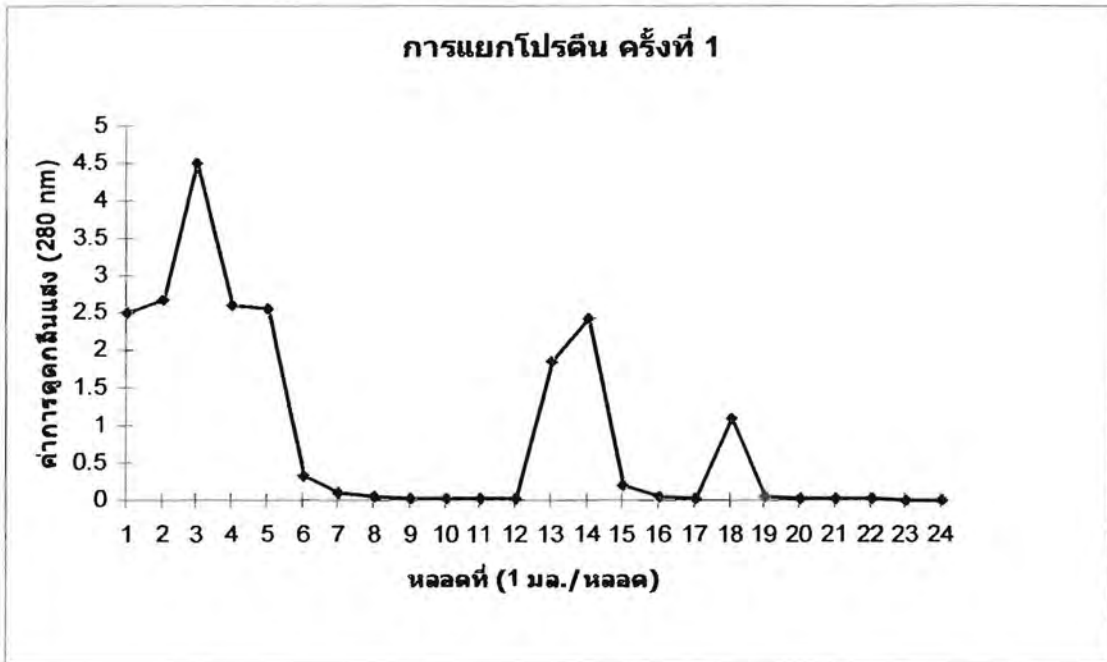


รูปที่ 10. แสดงผล 12% SDS-PAGE จากโคลนที่ 1 (A) และ โคลนที่ 3 (B) ที่อุณหภูมิ 37°C. Lane 1: Kalaidoscope; lane 2: No insert; lane 3: Not induce; lane 4-7: ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, และ 1 mM IPTG เวลา 3-4 ชม. และ lane 8-11: ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, และ 1 mM IPTG 5-6 ชม.

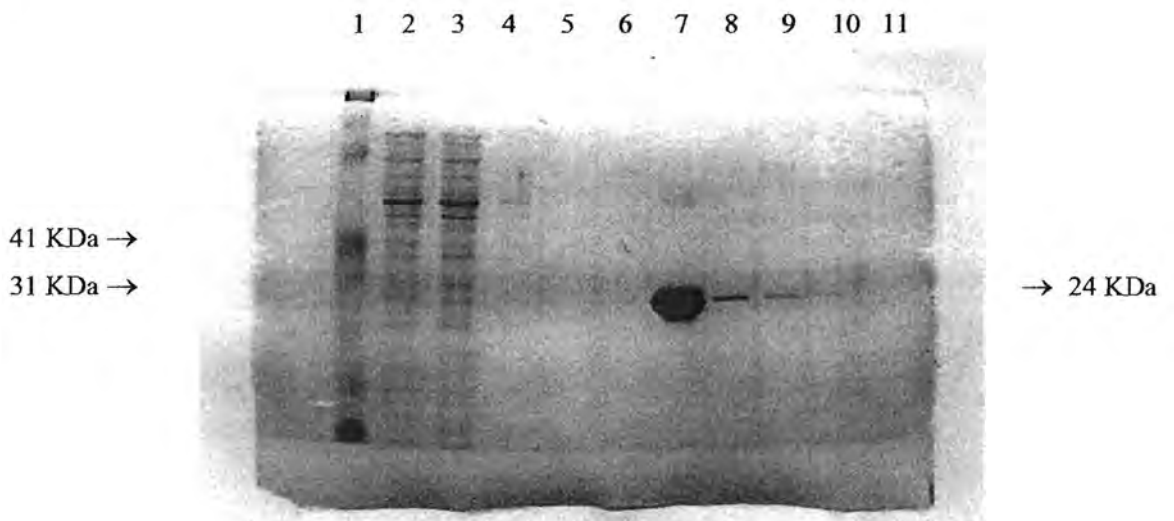


รูปที่ 11. แสดงผล 12% SDS-PAGE จากโคลนที่ 1 (A) และ โคลนที่ 3 (B) ที่อุณหภูมิ 29°C. Lane 1: BSA 68 KDa; lane 2: No insert; lane 3: Not induce; lane 4-7: ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, และ 1 mM IPTG เวลา 3-4 ชม. และ lane 8-11: ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, และ 1 mM IPTG 5-6 ชม.

A.

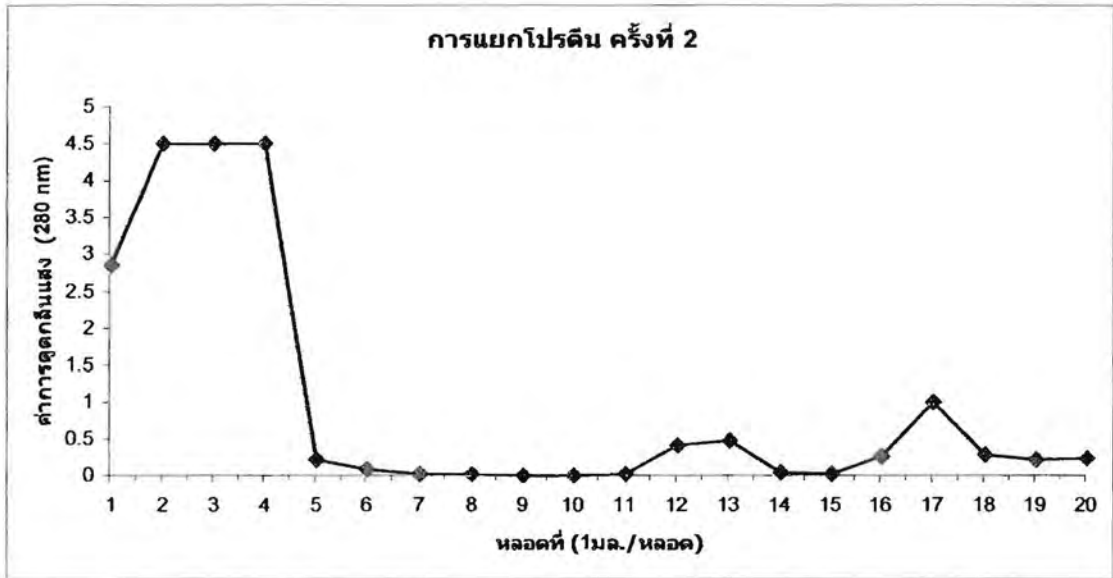


B.

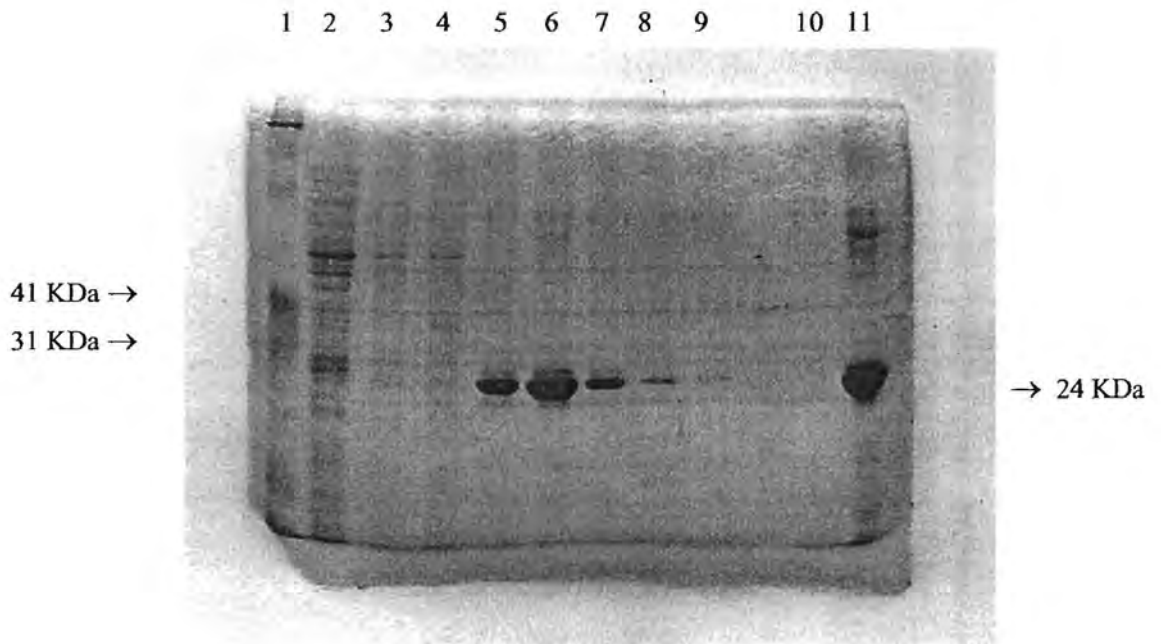


รูปที่ 12. แสดงผลการแยกโปรตีนครั้งที่ 1 วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm (A) ในแต่ละตัวอย่าง นำมาตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการ โดยการทำให้ 12% SDS-PAGE. Lane 1: Kalaidoscope; lane 2-11: fraction ที่ 12-22.

A.

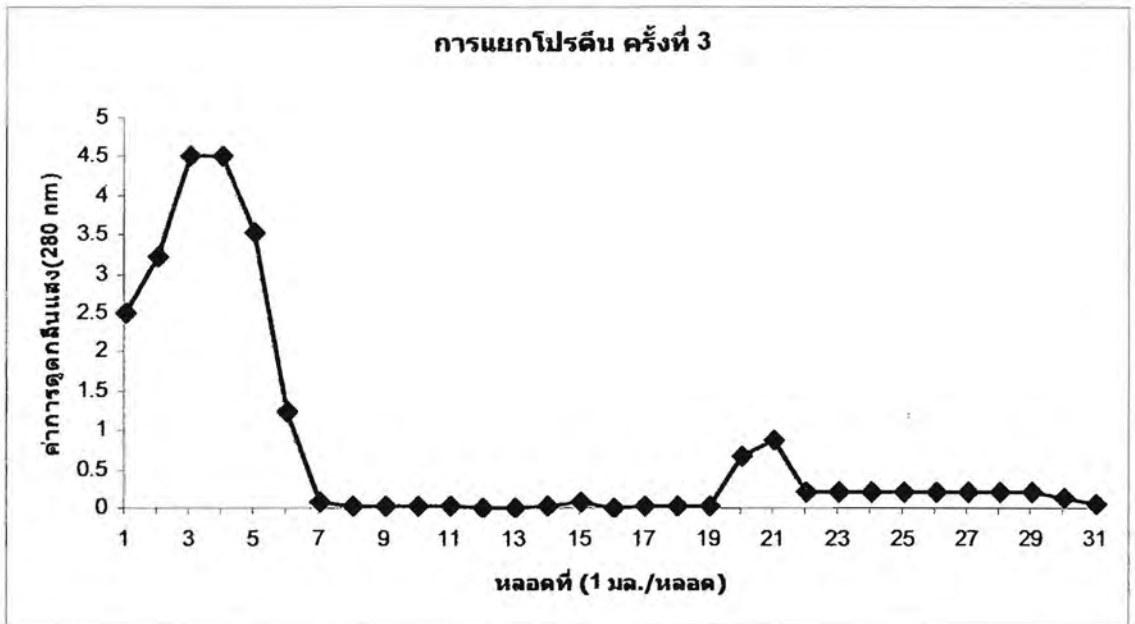


B.



รูปที่ 13. แสดงผลการแยกโปรตีนครั้งที่ 2 วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm (A) ในแต่ละตัวอย่าง นำมาตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการ โดยการทำให้โปรตีนที่แยกได้ในครั้งที่ 1 เข้มข้น.

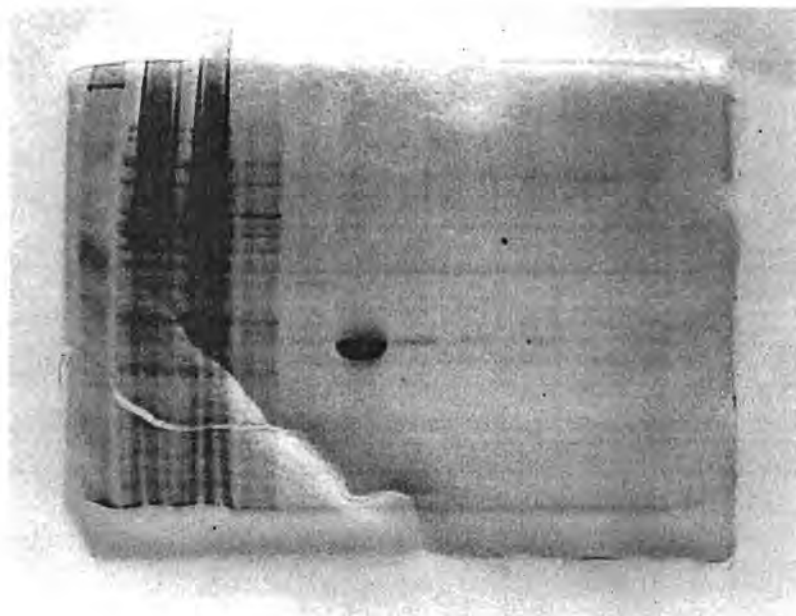
A.



B.

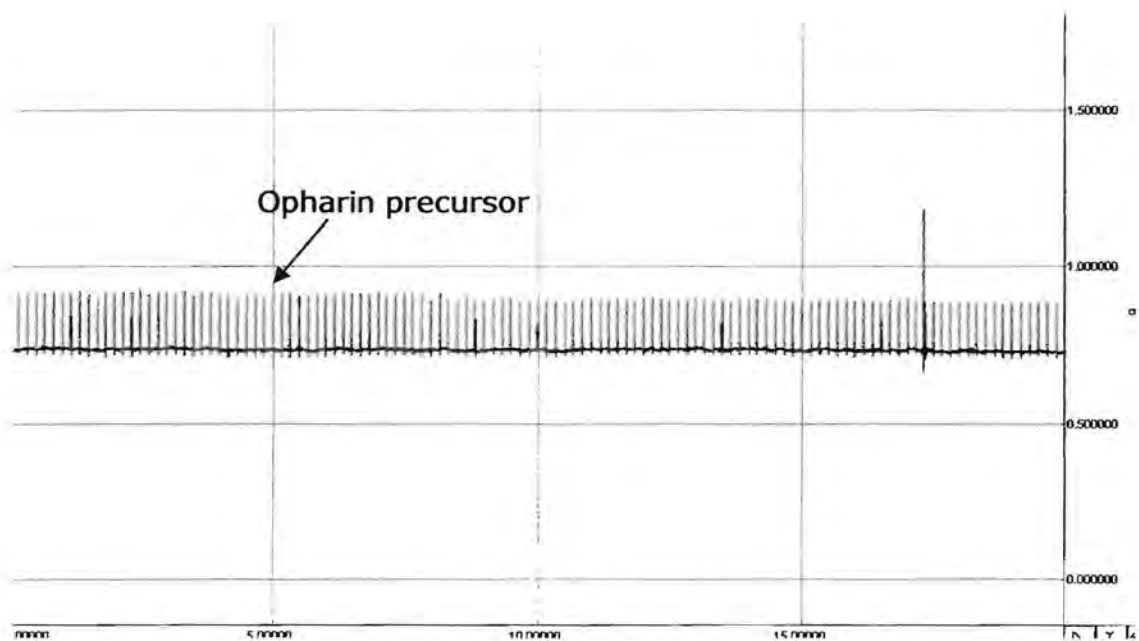
41 KDa →

31 KDa →



→ 24 KDa

รูปที่ 14. แสดงผลการแยกโปรตีนครั้งที่ 3 วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm (A) ในแต่ละตัวอย่าง นำมาตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการ โดยการทำให้ 12% SDS-PAGE. Lane 1: Kalaidoscope; lane 2-11: fraction ที่ 2, 4, 6, 15, 20, 22, 24, 26, 28, 30.



รูปที่ 15. แสดงภาพการทดสอบการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อใน Mouse Phrenic Nerve - Hemidiaphragm Preparation ภายหลังจากเติม โปรตีน Opharin precursor ที่ได้จากการแสดงออก

วิจารณ์ผลการทดลอง

หลังการโคลน การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับโปรตีนของ Opharin precursor ที่ได้พบว่ามี 4 โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์หายไป 6 เบสและโปรตีนหายไป 2 ตัวแสดงว่าโปรตีนจากยีนพิษงู Opharin precursor ของประเทศไทยที่โคลนได้ต่างจากตัวต้นแบบของ Opharin precursor หรือ Ophanin ที่มีรายงานใน NCBI GenBank จากประเทศอื่นๆ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อรูปร่างลักษณะของโปรตีนและการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ ทำให้คุณสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิมหรือไม่เหมือนเดิมเมื่อนำโปรตีน Opharin precursor ที่ได้จากการแสดงออก ความเข้มข้น 0.35mg/ml มาทดสอบการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อใน Mouse phrenic nerve - hemi-diaphragm preparation ตามวิธีในโครงการที่ 2 พบว่าไม่สามารถยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อได้ดีเท่ากับส่วนที่แยกได้จากพิษงูโดยตรง (โครงการที่ 2) อาจมีสาเหตุจากการเรียงลำดับของโปรตีนที่ได้ต่างจากโปรตีนต้นแบบที่เป็น Opharin precursor หรือ Ophanin อย่างที่สองการสร้างโปรตีนของสัตว์ที่มีนิวเคลียส (eukaryotic cell) โดยอาศัยระบบของเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส (prokaryotic expression system) เช่น *E.coli* มักมีปัญหาในเรื่องของการจัดเรียงตัว (protein folding) ที่ไม่เหมือนตัวต้นแบบซึ่งอาจส่งผลให้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ นอกจากนี้ การขาด post-translation modification ของ *E.coli* ทำให้การนำโปรตีนที่สร้างได้นำไปใช้จริงแล้วเกิดปัญหา จึงควรเปลี่ยนระบบการสร้างโปรตีนมาใช้ yeast หรือ mammalian cell ที่มี post-translation modification อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า การแสดงออกของโปรตีนใน yeast อยู่ในระดับสูง แต่กระบวนการ post-translation modification ใน yeast ก็ยังไม่เหมือนกับ mammalian cell ทำให้โปรตีนที่ผลิตได้ยังไม่มีประสิทธิภาพเหมือนกับโปรตีนที่ผลิตจาก mammalian cell เอง การใช้ baculovirus กับ mammalian cell expression system เป็นระบบที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อให้โปรตีนที่ผลิตได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโปรตีนจากธรรมชาติมากที่สุด อย่างไรก็ตามทั้งสองระบบนี้มีความยุ่งยากและซับซ้อนในการผลิตอีกทั้งต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูงจึงไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก อีกสาเหตุหนึ่งพบว่า Opharin precursor หรือ Ophanin มีคุณสมบัติยับยั้งการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle contraction) ที่กระตุ้นด้วยโปแตสเซียมปริมาณสูง ที่ทำให้เกิด depolarization แต่ไม่ยับยั้งการหดเกร็งตัวจากการกระตุ้นด้วยคาเฟอีน ผลที่เกิดขึ้นอาจเกิดที่ voltage-gated calcium ของกล้ามเนื้อเรียบ (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q7ZT98>) นอกจากนี้ Opharin precursor หรือ Ophanin ยังเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) กลุ่มเดียวกับที่พบในงูที่มีพิษต่อระบบประสาทชนิดอื่น เช่น Natriin ในงูเห่าได้หัวัน (*Naja atra*) หรือ งูที่มีพิษต่อระบบเลือด เช่น งู eastern cotton mouth (*Agkistrodon piscivorus*) และ western diamond back rattle snake (*Crotalus atrox*) โดยมีคุณสมบัติเด่นคือเป็นตัวยับยั้งการทำงานของกรหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle contraction) (Jin *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2003; Yamazaki and Morita, 2004)

สำหรับ Long chain neurotoxin precursor fragment ที่ยังไม่สามารถเชื่อมต่อกับ pGEX-2T expression vector คาดว่าเกิด ปัญหาในขั้นตอนการเชื่อมต่อกับ cloning vector; pCR® 2.1 TOPO vector เพราะเมื่อได้ Recombinant plasmid (pCR® 2.1 TOPO vector/ Long chain neurotoxin precursor

fragment) แล้วนำ Recombinant plasmid ที่ได้มาตัดด้วย restriction enzyme EcoRI พบว่าแม้จะใช้ Recombinant plasmid (pCR[®] 2.1 TOPO vector/ Long chain neurotoxin precursor fragment) ความเข้มข้นสูงจะได้ Long chain neurotoxin precursor fragment ปริมาณน้อยมากไม่เพียงพอการใช้งาน และเมื่อนำ Recombinant plasmid ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการทำให้ DNA sequencing พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ต่างไปจากที่คาดไว้ จึงแก้ไขโดยเริ่มทำ cDNA fragment ใหม่ และทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ขั้นแรก ขณะนี้ได้ดำเนินการสร้าง cDNA และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ DNA sequencing เรียบร้อยแล้วและกำลังดำเนินการอยู่ในขั้นตอนการเชื่อมต่อเข้า pGEX-2T expression vector

สรุปและข้อเสนอแนะ

Opharin precursor หรือ Ophanin ที่ได้จากการโคลนมีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับโปรตีนต่างจากต้นแบบ โดยโปรตีนหายไป 2 ตัว สาเหตุดังกล่าวอาจทำให้โปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติเปลี่ยนไป ไม่เหมือนเดิม เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อพบว่าไม่สามารถยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อได้ดีเท่ากับส่วนที่แยกได้จากพิษงูโดยตรง โดยที่ Opharin precursor หรือ Ophanin มีคุณสมบัติยับยั้ง Ion Channel และยับยั้งการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle contraction) จึงควรนำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติดังกล่าวเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของโปรตีน เช่น ทดสอบกับ Guinea pig ileum ตามวิธีของ Schweitz *et al.*, 1990 โดยมี KCl เป็นตัวกระตุ้นการหดตัวของ ileum ในส่วนของ Long chain neurotoxin ควรดำเนินการต่อเพื่อโคลนให้เข้า expression vector และอาจใช้สภาวะเดียวกับ Opharin precursor ในการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน เนื่องจาก Long chain neurotoxin มีคุณสมบัติเด่น คือ สามารถยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่า Long chain neurotoxin น่าจะสามารถยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อได้ดีกว่า Opharin precursor หรือ Ophanin และโปรตีนที่ได้อาจจะนำไปใช้ประโยชน์ในทางเภสัชวิทยาและทางการแพทย์ได้

เอกสารอ้างอิง

1. ไพบูลย์ จินตกุล และ ลาวินัย จันทร์โฮม. ฐพิษในประเทศไทย. กรุงเทพฯ. บริษัทประชาชนจำกัด. 2538. หน้า 117-137.
2. Berkelman T. and Stenstedt T. 1998. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Amersham Biosciences.
3. He, Y. Y. Wei, H. L., and Zhang, Y. 2004. Cloning and purification of α -neurotoxins from King cobra (*Ophiophagus nannah*). *Toxicon* 44; 295-303.
4. Jin. Y., Lu, Q., Zhou, X., Zhu, S., Li, R., Wang, W., and Xiong, Y. 2003. Purification and cloning of cystein-rich protens from *Trimeresurus jerdonii* and *Naja atra* venoms. *Toxicon* 42; 539-547.
5. Li, J., Zhang, H., Liu, J., and Xu, K. 2006. Novel genes encoding six kinds of three-finger toxins in *Ophiophagus nannah* (King cobra) and function characterization of two recombinant long-chain neurotoxins. *Biochem J.* 398; 233-242.
6. Mujacic, M., Cooper, K. W., and Baneyx, F. 1999. Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene* 238; 325-332.
7. Peng, L. S., Zhong, X. F., Huang, Y. S. Zhang, Y., Zheng, S. L. Wei, J. W. Wu, W. Y., and Xu, A. L. 2003. Molecular cloning, expression and characterization of three short chain α -neurotoxins from the venom of sea snake-Hydrophiinae *Hydrophis cyanocinctus* Daudin. *Toxicon* 42, 753-761.
8. Phui, Y. JS., Nanling, G., Afifyan, F., Donghui, M., Lay, P. S., Armugam, A., and Jeyaseelan, K 2004. Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. *Biochimie*, 86; 137-149.
9. Pu, X. C., Wong, P. T. H., Gopalakrishnakone, P. 1995. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of King cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon* 33; 1425-1431.
10. Schweitz, H., Bidard, J. N., Lazdunski, M. 1990. Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom. *Toxicon* 28; 847-856.
11. Yamazaki, Y., Hyodo, F., and Morita, T. 2003. Wide distribution of cysteine-rich proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Arch Biochem Biophys* 412; 133-141.
12. Yamazaki, Y., and Morita, T. 2004. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* 44; 227-231.
12. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q7ZT98>.

ภาคผนวก ก

Search title : 1
 Database : NCBI nr 20080103 (5824077 sequences; 2008696216 residues)
 Top Score : 76 for gi|48428838, Ophanin precursor (Ophanin)

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 74 are significant ($p < 0.05$).

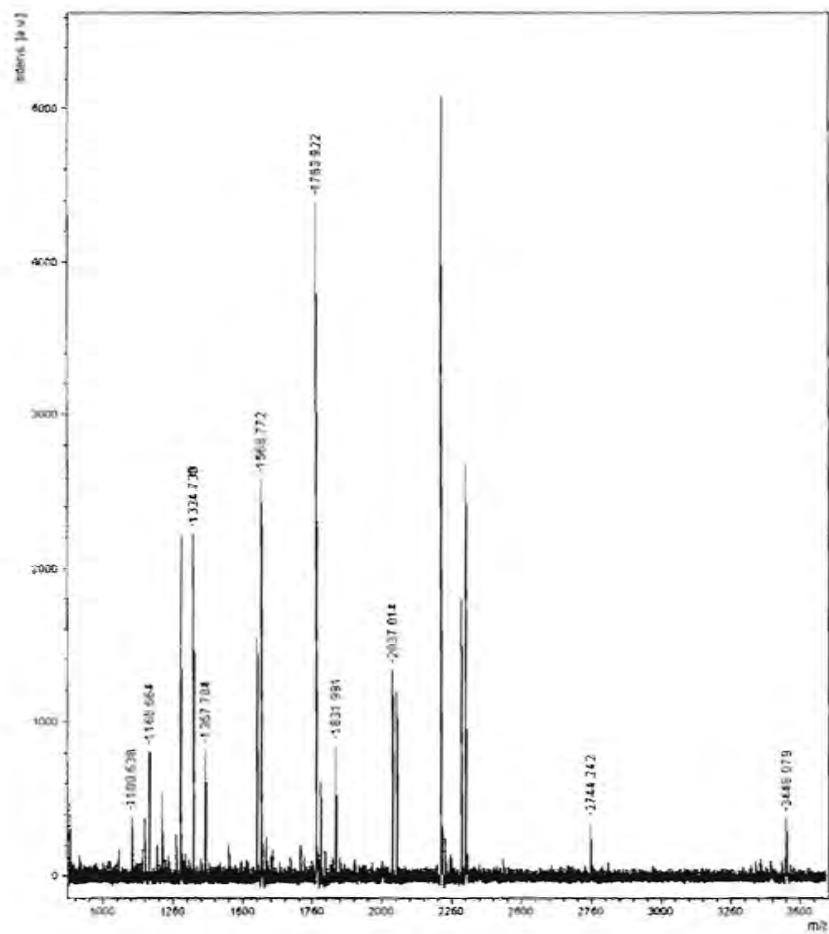
Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 48428838	27764	76	Ophanin precursor (Ophanin)
2.	gi 32423812	27790	76	opharin precursor [Ophiophagus hannah]

Results List

1.	gi 48428838	Mass: 27764	Score: 76	Expect: 0.033	Queries matched: 7			
Ophanin precursor (Ophanin)								
	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
	1150.6575	1149.6502	1149.5700	0.0803	46 -	56	0	R.SVSPTASNMLK.M + Oxidation (M)
	1195.6294	1194.6222	1194.6357	-0.0135	35 -	44	0	K.EIVDLHNSLR.R
	1280.6409	1279.6336	1279.5503	0.0833	216 -	225	0	K.QSSCQDEWIK.S
	1552.7998	1551.7925	1551.6776	0.1149	57 -	69	0	K.MQWYPEAASNAER.W
	1568.7721	1567.7648	1567.6725	0.0923	57 -	69	0	K.MQWYPEAASNAER.W + Oxidation (M)
	1763.9220	1762.9147	1762.7482	0.1666	70 -	84	0	R.WASNCNLGHSPDYSR.V
	1831.9913	1830.9840	1830.8941	0.0899	103 -	116	0	R.AWTEIIQLWHDEYK.N
No match to: 1168.6643, 1211.7189, 1324.7302, 1367.7842, 1779.9487, 2037.0140, 2052.9917, 2744.2419, 3448.0790								
2.	gi 32423812	Mass: 27790	Score: 76	Expect: 0.033	Queries matched: 7			
opharin precursor [Ophiophagus hannah]								
	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
	1150.6575	1149.6502	1149.5700	0.0803	46 -	56	0	R.SVSPTASNMLK.M + Oxidation (M)
	1195.6294	1194.6222	1194.6357	-0.0135	35 -	44	0	K.EIVDLHNSLR.R
	1280.6409	1279.6336	1279.5503	0.0833	216 -	225	0	K.QSSCQDEWIK.S
	1552.7998	1551.7925	1551.6776	0.1149	57 -	69	0	K.MQWYPEAASNAER.W
	1568.7721	1567.7648	1567.6725	0.0923	57 -	69	0	K.MQWYPEAASNAER.W + Oxidation (M)
	1763.9220	1762.9147	1762.7482	0.1666	70 -	84	0	R.WASNCNLGHSPDYSR.V
	1831.9913	1830.9840	1830.8941	0.0899	103 -	116	0	R.AWTEIIQLWHDEYK.N
No match to: 1168.6643, 1211.7189, 1324.7302, 1367.7842, 1779.9487, 2037.0140, 2052.9917, 2744.2419, 3448.0790								

Mass Spectrometry result spot 1



Mass Spectrometry result spot 1

m/z	SN	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
1100.638	4.3	7475	3404	180.52	62
1150.657	6.2	659	1328	248.45	391
1168.664	20	4181	2480	798.69	757
1195.629	4.9	3091	9675	205.81	32
1211.719	13.4	2903	2746	528.86	490
1280.641	48.1	7310	2848	2080.84	2060
1324.73	48.1	21064	3167	2090.61	2095
1367.784	19.9	3423	3523	783	717
1552.8	38.7	8867	3553	1515.52	1690
1568.772	63.3	24381	3864	2553.04	2701
1763.922	112.2	17159	4255	4628.81	5661
1779.949	10.6	1536	6466	448.21	420
1831.991	19.2	3224	4007	751.53	1059
2037.014	29.7	12093	4841	1122.06	1508
2052.992	30.6	10750	4907	1115.4	1475
2744.242	9	718	5745	211.02	345
3448.079	10.3	932	5948	170.5	474

Search title : 2
Database : NCBIInr 20080103 (5824077 sequences; 2008696216 residues)
Top Score : 79 for gi|48428838, Ophanin precursor (Ophanin)

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 74 are significant ($p < 0.05$).

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 48428838	27764	79	Ophanin precursor (Ophanin)
2.	gi 32423812	27790	79	opharin precursor [Ophiophagus hannah]

Results List

1. [gi|48428838](#) Mass: 27764 Score: 79 Expect: 0.017 Queries matched: 8

Ophanin precursor (Ophanin)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1150.6541	1149.6469	1149.5700	0.0769	46 -	56	0	R.SVSPTASNMLK.M + Oxidation (M)
1195.7453	1194.7380	1194.6357	0.1024	35 -	44	0	K.EIVDLHNSLR.R
1280.6267	1279.6195	1279.5503	0.0692	216 -	225	0	K.QSSCQDEWIK.S
1451.8973	1450.8900	1450.7892	0.1008	33 -	44	1	K.QKEIVDLHNSLR.R
1552.7721	1551.7649	1551.6776	0.0873	57 -	69	0	K.MQWYPEAASNAER.W
1568.7638	1567.7566	1567.6725	0.0841	57 -	69	0	K.MQWYPEAASNAER.W + Oxidation (M)
1763.8465	1762.8392	1762.7482	0.0911	70 -	84	0	R.WASNCNLGHSPDYSR.V
1831.9950	1830.9877	1830.8941	0.0936	103 -	116	0	R.AWTEIIQLWHDEYK.N

No match to: 940.5460, 1100.6667, 1168.6222, 1211.6474, 1223.6334, 1263.5961, 1296.6221, 1324.7179, 1584.7570, 1779.8590, 2037.0124, 2053.0005, 2744.1517, 3447.8983

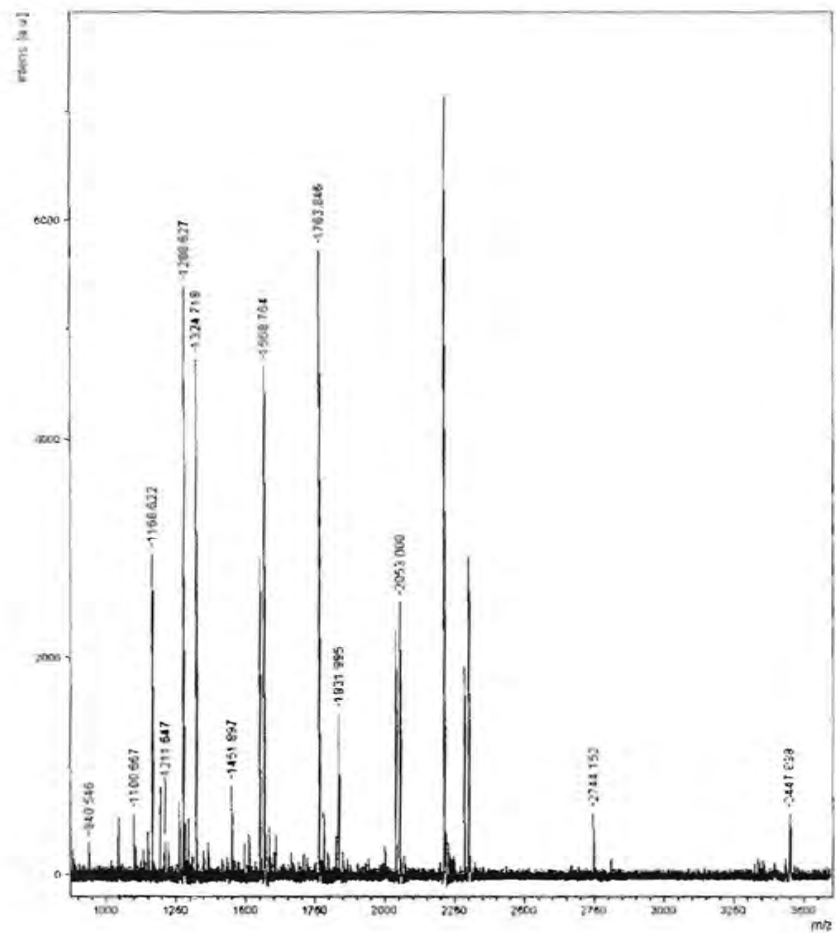
2. [gi|32423812](#) Mass: 27790 Score: 79 Expect: 0.017 Queries matched: 8

opharin precursor [Ophiophagus hannah]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1150.6541	1149.6469	1149.5700	0.0769	46 -	56	0	R.SVSPTASNMLK.M + Oxidation (M)
1195.7453	1194.7380	1194.6357	0.1024	35 -	44	0	K.EIVDLHNSLR.R
1280.6267	1279.6195	1279.5503	0.0692	216 -	225	0	K.QSSCQDEWIK.S
1451.8973	1450.8900	1450.7892	0.1008	33 -	44	1	K.QKEIVDLHNSLR.R
1552.7721	1551.7649	1551.6776	0.0873	57 -	69	0	K.MQWYPEAASNAER.W
1568.7638	1567.7566	1567.6725	0.0841	57 -	69	0	K.MQWYPEAASNAER.W + Oxidation (M)
1763.8465	1762.8392	1762.7482	0.0911	70 -	84	0	R.WASNCNLGHSPDYSR.V
1831.9950	1830.9877	1830.8941	0.0936	103 -	116	0	R.AWTEIIQLWHDEYK.N

No match to: 940.5460, 1100.6667, 1168.6222, 1211.6474, 1223.6334, 1263.5961, 1296.6221, 1324.7179, 1584.7570, 1779.8590, 2037.0124, 2053.0005, 2744.1517, 3447.8983

Mass Spectrometry result spot 2



Mass Spectrometry result spot 2

m/z	SN	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
940.546	6.2	15408	3205	287.95	89
1100.667	11.5	2535	2694	495.88	405
1150.654	6.4	459	1904	288.89	349
1168.622	58.9	25902	2617	2656.12	2528
1195.745	15.6	2689	2880	708.58	640
1211.647	6.5	19647	4456	303.46	116
1223.633	6.4	11398	3478	299.11	106
1263.596	13	477	2952	641.04	649
1280.627	102.6	9180	2829	5454.14	5279
1296.622	6.8	705	3965	385.46	308
1324.718	87.6	12391	2915	4646.08	4795
1451.897	16.8	4042	3651	729.26	718
1552.772	57.1	27906	3600	2770.72	3128
1568.764	94.7	7900	3671	4702.97	5070
1584.757	7.4	798	4899	374.85	347
1763.846	118.2	32135	4254	5694.27	7014
1779.859	10	1994	4620	486.84	547
1831.995	31.4	2810	4288	1384.77	1788
2037.012	48.8	18827	4972	1996.9	2646
2053	55.8	28225	4989	2200.21	2906
2744.152	14	2123	5939	380.77	629
3447.898	14.8	2038	6108	273.86	737

Search title : 3
 Database : NCBIInr 20080103 (5824077 sequences; 2008696216 residues)
 Top Score : 90 for gi|48428838, Ophanin precursor (Ophanin)

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 74 are significant ($p < 0.05$).

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 48428838	27764	90	Ophanin precursor (Ophanin)
2.	gi 32423812	27790	90	opharin precursor [Ophiophagus hannah]

Results List

1. [gi|48428838](#) Mass: 27764 Score: 90 Expect: 0.0012 Queries matched: 10

Ophanin precursor (Ophanin)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1134.5155	1133.5082	1133.5750	-0.0669	46	- 56	0	R.SVSPTASNMLK.M
1150.6125	1149.6053	1149.5700	0.0353	46	- 56	0	R.SVSPTASNMLK.M + Oxidation (M)
1195.5876	1194.5803	1194.6357	-0.0554	35	- 44	0	K.EIVDLHNSLR.R
1280.4839	1279.4767	1279.4896	-0.0130	228	- 237	0	K.CPASCFCCHK.I
1351.6461	1350.6388	1350.7368	-0.0980	35	- 45	1	K.EIVDLHNSLRR.S
1451.7035	1450.6962	1450.7892	-0.0930	33	- 44	1	K.QKEIVDLHNSLR.R
1552.7158	1551.7086	1551.6776	0.0310	57	- 69	0	K.MQWYPEAASNAER.W
1568.6926	1567.6853	1567.6725	0.0128	57	- 69	0	K.MQWYPEAASNAER.W + Oxidation (M)
1763.7763	1762.7691	1762.7482	0.0209	70	- 84	0	R.WASNCNLGHSPDYSR.V
1831.9443	1830.9370	1830.8941	0.0429	103	- 116	0	R.AWTEIIQLWHDEYK.N

No match to: 1100.6430, 1168.5351, 1223.4858, 1263.4807, 1324.5946, 1607.8030, 2036.9726, 2052.9024

2. [gi|32423812](#) Mass: 27790 Score: 90 Expect: 0.0012 Queries matched: 10

opharin precursor [Ophiophagus hannah]

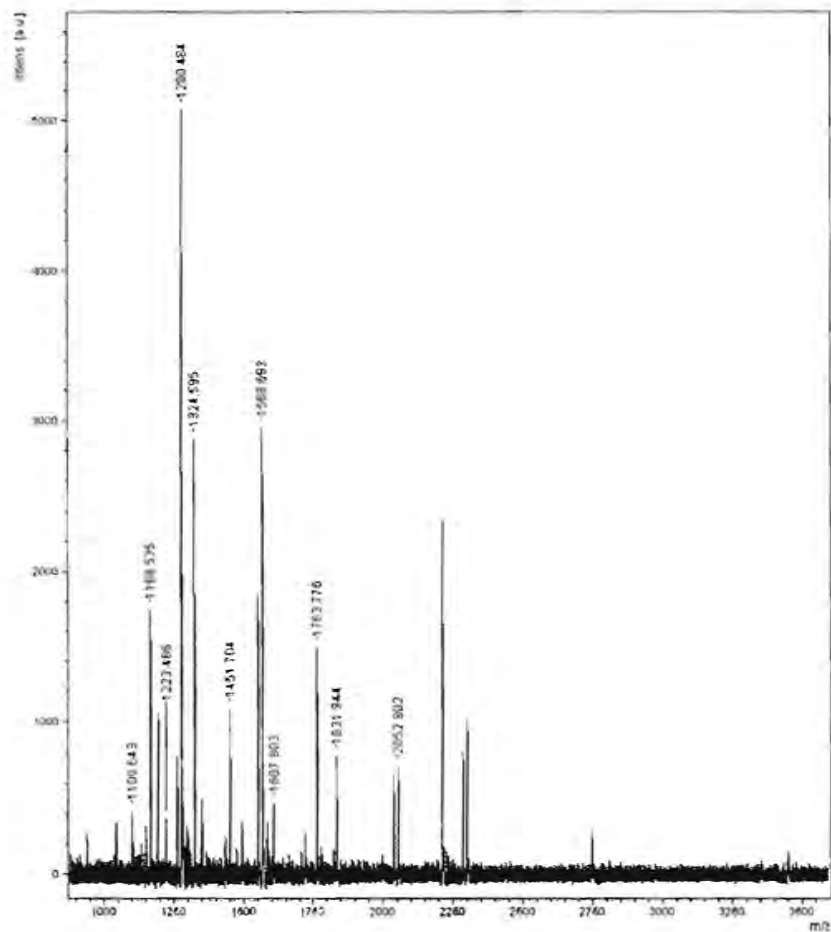
Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1134.5155	1133.5082	1133.5750	-0.0669	46	- 56	0	R.SVSPTASNMLK.M
1150.6125	1149.6053	1149.5700	0.0353	46	- 56	0	R.SVSPTASNMLK.M + Oxidation (M)
1195.5876	1194.5803	1194.6357	-0.0554	35	- 44	0	K.EIVDLHNSLR.R
1280.4839	1279.4767	1279.4896	-0.0130	228	- 237	0	K.CPASCFCCHK.I
1351.6461	1350.6388	1350.7368	-0.0980	35	- 45	1	K.EIVDLHNSLRR.S
1451.7035	1450.6962	1450.7892	-0.0930	33	- 44	1	K.QKEIVDLHNSLR.R
1552.7158	1551.7086	1551.6776	0.0310	57	- 69	0	K.MQWYPEAASNAER.W
1568.6926	1567.6853	1567.6725	0.0128	57	- 69	0	K.MQWYPEAASNAER.W + Oxidation (M)

1763.7763 1762.7691 1762.7482 0.0209 70 - 84 0 R.WASNCNLGHSPDYSR.V

1831.9443 1830.9370 1830.8941 0.0429 103 - 116 0 R.AWTEIIQLWHDEYK.N

No match to: 1100.6430, 1168.5351, 1223.4858, 1263.4807, 1324.5946, 1607.8030, 2036.9726, 2052.9024

Mass Spectrometry result spot 3



Mass Spectrometry result spot 3

m/z	SN	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
1100.643	6.5	971	2066	384.56	407
1134.515	4.1	3719	3307	193.41	53
1150.613	6.6	15908	2361	313.67	185
1168.535	27.7	6317	2108	1687.16	1943
1195.588	16.4	5872	2463	1001.23	1081
1223.486	7.8	17677	2548	369.69	189
1263.481	10.7	758	2482	684.33	804
1280.484	77.5	26121	2331	5167.37	6437
1324.595	40.3	52292	2349	2666.79	3518
1351.646	7.2	1270	3110	440.38	455
1451.704	18.1	10621	3031	1086.32	1331
1552.716	30.5	14968	2521	1823.68	2906
1568.693	45.6	27100	2828	2755.88	4195
1607.803	8.7	15997	4558	416.12	161
1763.776	26.3	24929	3000	1502.33	2806
1831.944	12.8	4949	2940	703.32	1508
2036.973	10.9	4653	3271	552.88	1101
2052.902	13.1	4698	3456	630.85	1282

Search title : 4
 Database : NCBI nr 20080103 (5824077 sequences; 2008696216 residues)
 Top Score : 113 for gi|48428838, Ophanin precursor (Ophanin)

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 74 are significant ($p < 0.05$).

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 48428838	27764	113	Ophanin precursor (Ophanin)
2.	gi 32423812	27790	113	opharin precursor [Ophiophagus hannah]

Results List

1. [gi|48428838](#) Mass: 27764 Score: 113 Expect: 6.4e-06 Queries matched: 10

Ophanin precursor (Ophanin)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1150.6702	1149.6630	1149.5700	0.0930	46 - 56	0	0	R.SVSPTASNMLK.M + Oxidation (M)
1195.7581	1194.7508	1194.6357	0.1151	35 - 44	0	0	K.EIVDLHNSLR.R
1280.6331	1279.6258	1279.5503	0.0755	216 - 225	0	0	K.QSSCQDEWIK.S
1351.8602	1350.8529	1350.7368	0.1162	35 - 45	1	1	K.EIVDLHNSLRR.S
1451.8944	1450.8871	1450.7892	0.0979	33 - 44	1	1	K.QKEIVDLHNSLR.R
1495.7394	1494.7321	1494.6773	0.0548	216 - 227	1	1	K.QSSCQDEWIKSK.C
1552.7785	1551.7712	1551.6776	0.0936	57 - 69	0	0	K.MQWYPEAASNAER.W
1568.7674	1567.7601	1567.6725	0.0876	57 - 69	0	0	K.MQWYPEAASNAER.W + Oxidation (M)
1763.8390	1762.8317	1762.7482	0.0836	70 - 84	0	0	R.WASNCNLGHSPDYSR.V
1831.9880	1830.9807	1830.8941	0.0867	103 - 116	0	0	R.AWTEIIQLWHDEYK.N

No match to: 940.5850, 1100.7197, 1168.6309, 1211.6338, 1263.6057, 1296.6453, 1324.7209, 1367.7239, 1584.7785, 1607.984
 1662.8485, 1706.8333, 1720.8189, 1779.8474, 2037.0214, 2052.9985, 2744.1305

2. [gi|32423812](#) Mass: 27790 Score: 113 Expect: 6.4e-06 Queries matched: 10

opharin precursor [Ophiophagus hannah]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1150.6702	1149.6630	1149.5700	0.0930	46 - 56	0	0	R.SVSPTASNMLK.M + Oxidation (M)
1195.7581	1194.7508	1194.6357	0.1151	35 - 44	0	0	K.EIVDLHNSLR.R
1280.6331	1279.6258	1279.5503	0.0755	216 - 225	0	0	K.QSSCQDEWIK.S
1351.8602	1350.8529	1350.7368	0.1162	35 - 45	1	1	K.EIVDLHNSLRR.S
1451.8944	1450.8871	1450.7892	0.0979	33 - 44	1	1	K.QKEIVDLHNSLR.R
1495.7394	1494.7321	1494.6773	0.0548	216 - 227	1	1	K.QSSCQDEWIKSK.C
1552.7785	1551.7712	1551.6776	0.0936	57 - 69	0	0	K.MQWYPEAASNAER.W

1568.7674 1567.7601 1567.6725 0.0876 57 - 69 0 K.MQWYPEAASNAER.W + Oxidation (M)

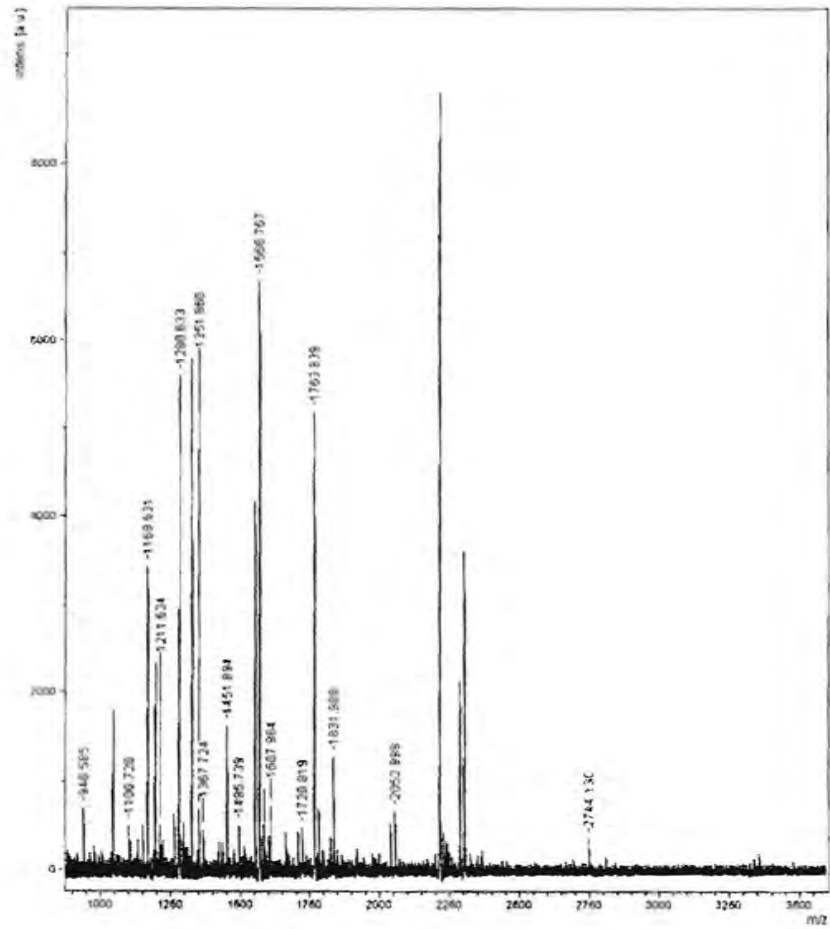
1763.8390 1762.8317 1762.7482 0.0836 70 - 84 0 R.WASNCNLGHSPDYSR.V

1831.9880 1830.9807 1830.8941 0.0867 103 - 116 0 R.AWTEIQLWHDEYK.N

No match to: 940.5850, 1100.7197, 1168.6309, 1211.6338, 1263.6057, 1296.6453, 1324.7209, 1367.7239, 1584.7785, 1607.984

1662.8485, 1706.8333, 1720.8189, 1779.8474, 2037.0214, 2052.9985, 2744.1305

Mass Spectrometry result spot 4



Mass Spectrometry result spot 4

m/z	SN	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
940.585	11.1	1756	3112	661.99	364
1100.72	9.5	789	3442	555.55	372
1150.67	7	437	2805	430.64	435
1168.631	51.8	109342	3065	3237.16	2731
1195.758	35.3	31851	3096	2264.26	1964
1211.634	6.5	738	3668	405.26	303
1263.606	9.4	551	3399	593.57	493
1280.633	84.4	28784	3461	5736.25	4736
1296.645	6.5	453	4870	469.18	300
1324.721	82.7	110554	3549	5675.68	4972
1351.86	9.8	1771	3403	609.3	573
1367.724	6.8	588	2973	407.75	412
1451.894	27.2	16281	3991	1551.53	1478
1495.739	8.5	1425	4365	501.31	437
1552.778	64.9	39598	4089	4268.23	4245
1568.767	93.8	59036	4365	6452.3	6152
1584.778	12.2	3217	5146	872.2	738
1607.984	9.9	2937	4104	670.02	701
1662.849	7	1391	4552	395.47	426
1706.833	7.3	1342	5324	425.66	409
1720.819	7.5	1196	4165	435.86	546
1763.839	84.7	68572	4835	5081.6	5809
1779.847	11	4144	5156	663.69	694
1831.988	19.8	3764	4876	1158.48	1357
2037.021	9.3	3433	4831	447.82	593
2052.998	12	4042	5173	571.38	737
2744.13	7.2	773	6644	226.18	370

Search title : 7
Database : NCBI nr 20080103 (5824077 sequences; 2008696216 residues)
Top Score : 95 for gi|26397290, Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 74 are significant ($p < 0.05$).

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 26397290	8099	95	Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)
2.	gi 51105369	10477	66	long chain neurotoxin precursor [Ophiophagus hannah]
3.	gi 51105371	10473	66	long chain neurotoxin precursor [Ophiophagus hannah]

Results List

1. [gi|26397290](#) Mass: 8099 Score: 95 Expect: 0.00042 Queries matched: 5

Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide	
1211.5175	1210.5102	1210.5475	-0.0372	37	-	47	0	K.LSFGCAATCPK.V
1284.4989	1283.4916	1283.4812	0.0104	24	-	33	0	K.SWCDAWCGSR.G
1339.6080	1338.6008	1338.6424	-0.0417	36	-	47	1	K.KLSFGCAATCPK.V
2326.9682	2325.9609	2325.9777	-0.0168	48	-	67	0	K.VNPGIDIECCSTDNCNPHPK.L
2654.1321	2653.1249	2653.2339	-0.1090	1	-	23	0	-.LICFISSHDSVTCAPGENVCFLK.S

No match to: 979.3710, 1154.5242, 1193.4648, 1213.4432, 1225.4302, 1227.4575, 1241.4556, 1282.4842, 1286.5437, 1287.476
1298.5041, 1300.4902, 1316.4923, 1493.5258, 1911.9457, 1927.9043, 2120.9173, 2340.9343, 2440.0348, 2597.1034, 2668.1467
2671.1191, 2697.1121

2. [gi|51105369](#) Mass: 10477 Score: 66 Expect: 0.36 Queries matched: 4

long chain neurotoxin precursor [Ophiophagus hannah]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide	
1211.5175	1210.5102	1210.5475	-0.0372	58	-	68	0	K.LSFGCAATCPK.V
1284.4989	1283.4916	1283.4812	0.0104	45	-	54	0	K.SWCDAWCGSR.G
1339.6080	1338.6008	1338.6424	-0.0417	57	-	68	1	K.KLSFGCAATCPK.V
2326.9682	2325.9609	2325.9777	-0.0168	69	-	88	0	K.VNPGIDIECCSTDNCNPHPK.L

No match to: 979.3710, 1154.5242, 1193.4648, 1213.4432, 1225.4302, 1227.4575, 1241.4556, 1282.4842, 1286.5437, 1287.476
1298.5041, 1300.4902, 1316.4923, 1493.5258, 1911.9457, 1927.9043, 2120.9173, 2340.9343, 2440.0348, 2597.1034, 2654.1321
2668.1467, 2671.1191, 2697.1121

3. [gi|51105371](#) Mass: 10473 Score: 66 Expect: 0.36 Queries matched: 4

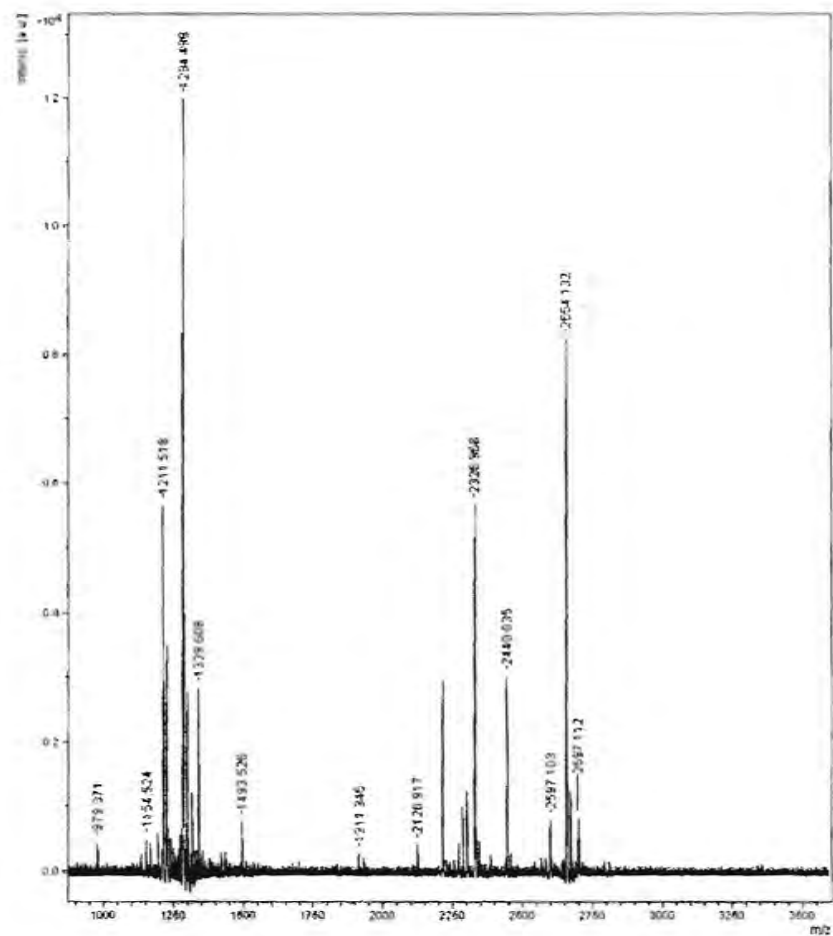
long chain neurotoxin precursor [Ophiophagus hannah]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
----------	----------	----------	-------	-------	-----	------	---------

1211.5175	1210.5102	1210.5475	-0.0372	58	-	68	0	K.LSFGCAATCPK.V
1284.4989	1283.4916	1283.4812	0.0104	45	-	54	0	K.SWCDAWCGSR.G
1339.6080	1338.6008	1338.6424	-0.0417	57	-	68	1	K.KLSFGCAATCPK.V
2326.9682	2325.9609	2325.9777	-0.0168	69	-	88	0	K.VNPGIDIECCSTDNCNPHPK.L

No match to: 979.3710, 1154.5242, 1193.4648, 1213.4432, 1225.4302, 1227.4575, 1241.4556, 1282.4842, 1286.5437, 1287.476,
1298.5041, 1300.4902, 1316.4923, 1493.5258, 1911.9457, 1927.9043, 2120.9173, 2340.9343, 2440.0348, 2597.1034, 2654.1321,
2668.1467, 2671.1191, 2697.1121

Mass Spectrometry result spot 7



Mass Spectrometry result spot 7

m/z	SN	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
979.371	7.3	681	2004	343.47	295
1154.524	8	1447	2556	441.8	450
1193.465	8.7	237	2541	539.42	672
1211.518	84.4	72469	2345	5596.1	6497
1213.443	13.2	1150	3170	880.23	717
1225.43	39.1	1558	2496	2734.69	3633
1227.457	38.1	1499	2890	2678.52	2808
1241.456	7.6	185	3187	562.16	517
1282.484	44.1	1806	2717	4493.82	4994
1284.499	107.3	6162	2547	11122.92	14560
1286.544	23	172	2963	2442.85	1141
1287.476	37.6	3317	2931	3977.89	4089
1298.504	14.7	529	3187	1680.07	2057
1300.49	19.5	3840	3042	2264.8	2107
1316.492	11.7	803	3406	1224.34	1072
1339.608	31.2	27698	2624	2624.29	3134
1493.526	14.2	2775	2924	719.88	924
1911.946	4	6430	3307	208.85	103
1927.904	3.9	5912	4570	206.18	86
2120.917	8.2	2022	4277	326.25	514
2326.968	98.9	23138	4777	4540.1	7066
2340.934	8.3	211	6008	348.45	635
2440.035	64.9	18061	5116	2455.11	3816
2597.103	14.5	8391	5674	576.6	891
2654.132	157.8	41577	5738	6324.65	10367
2668.147	17.6	293	7998	699.3	902
2671.119	8.5	220	6507	337.54	457
2697.112	13.9	3638	6495	526.79	786

Search title : 8
 Database : NCBI nr 20080103 (5824077 sequences; 2008696216 residues)
 Top Score : 100 for gi|26397290, Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 74 are significant ($p < 0.05$).

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 26397290	8099	100	Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)
2.	gi 47228358	59075	70	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]
3.	gi 51105369	10477	69	long chain neurotoxin precursor [Ophiophagus hannah]
4.	gi 51105371	10473	69	long chain neurotoxin precursor [Ophiophagus hannah]

Results List

1. [gi|26397290](#) Mass: 8099 Score: 100 Expect: 0.00014 Queries matched: 5

Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1211.7019	1210.6946	1210.5475	0.1472	37	- 47	0	K.LSFGCAATCPK.V
1284.6442	1283.6369	1283.4812	0.1557	24	- 33	0	K.SWCDAWCGSR.G
1339.8256	1338.8183	1338.6424	0.1759	36	- 47	1	K.KLSFGCAATCPK.V
2327.0832	2326.0759	2325.9777	0.0982	48	- 67	0	K.VNPGIDIECCSTDNCNPHPK.L
2654.2840	2653.2768	2653.2339	0.0429	1	- 23	0	-.LICFISSHDSVTCAPGENVCFLK.S

No match to: 1154.6631, 1227.6357, 1252.6131, 1298.6481, 1300.6807, 1317.7136, 1658.6913, 1673.8504, 1911.9865, 2440.142597.2661, 2658.3047, 2668.3445

2. [gi|47228358](#) Mass: 59075 Score: 70 Expect: 0.11 Queries matched: 6

unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1211.7019	1210.6946	1210.6241	0.0706	194	- 204	1	K.ARVECPVPGAR.L
1227.6357	1226.6284	1226.6077	0.0207	92	- 101	1	R.ILHKMDDNNK.M
1317.7136	1316.7064	1316.5159	0.1905	295	- 305	0	R.SSSCMDCVLSR.D + Oxidation (M)
1339.8256	1338.8183	1338.6276	0.1907	478	- 488	0	K.EQTEEHGRPTR.H
2327.0832	2326.0759	2326.1375	-0.0617	36	- 55	1	K.DNANLFREGVANYTTMLLR.E
2440.1448	2439.1376	2439.1529	-0.0153	242	- 261	0	K.AVNYDGENFIIEVQVFQHR.E + Oxidation (M)

No match to: 1154.6631, 1252.6131, 1284.6442, 1298.6481, 1300.6807, 1658.6913, 1673.8504, 1911.9865, 2597.2661, 2654.282658.3047, 2668.3445

3. [gi|51105369](#) Mass: 10477 Score: 69 Expect: 0.15 Queries matched: 4

long chain neurotoxin precursor [Ophiophagus hannah]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide	
1211.7019	1210.6946	1210.5475	0.1472	58	-	68	0	K.LSFGCAATCPK.V
1284.6442	1283.6369	1283.4812	0.1557	45	-	54	0	K.SWCDAWCGSR.G
1339.8256	1338.8183	1338.6424	0.1759	57	-	68	1	K.KLSFGCAATCPK.V
2327.0832	2326.0759	2325.9777	0.0982	69	-	88	0	K.VNPGIDIECCSTDNCNPHPK.L

No match to: 1154.6631, 1227.6357, 1252.6131, 1298.6481, 1300.6807, 1317.7136, 1658.6913, 1673.8504, 1911.9865, 2440.12597.2661, 2654.2840, 2658.3047, 2668.3445

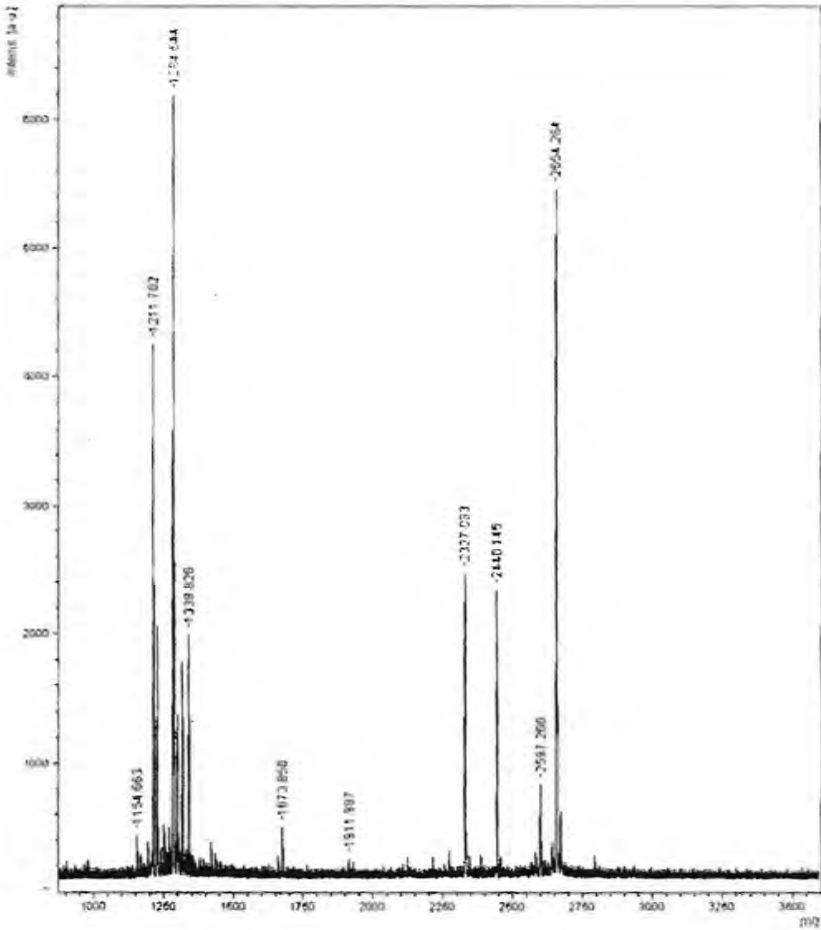
4. gi|51105371 Mass: 10473 Score: 69 Expect: 0.15 Queries matched: 4

long chain neurotoxin precursor [Ophiophagus hannah]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide	
1211.7019	1210.6946	1210.5475	0.1472	58	-	68	0	K.LSFGCAATCPK.V
1284.6442	1283.6369	1283.4812	0.1557	45	-	54	0	K.SWCDAWCGSR.G
1339.8256	1338.8183	1338.6424	0.1759	57	-	68	1	K.KLSFGCAATCPK.V
2327.0832	2326.0759	2325.9777	0.0982	69	-	88	0	K.VNPGIDIECCSTDNCNPHPK.L

No match to: 1154.6631, 1227.6357, 1252.6131, 1298.6481, 1300.6807, 1317.7136, 1658.6913, 1673.8504, 1911.9865, 2440.12597.2661, 2654.2840, 2658.3047, 2668.3445

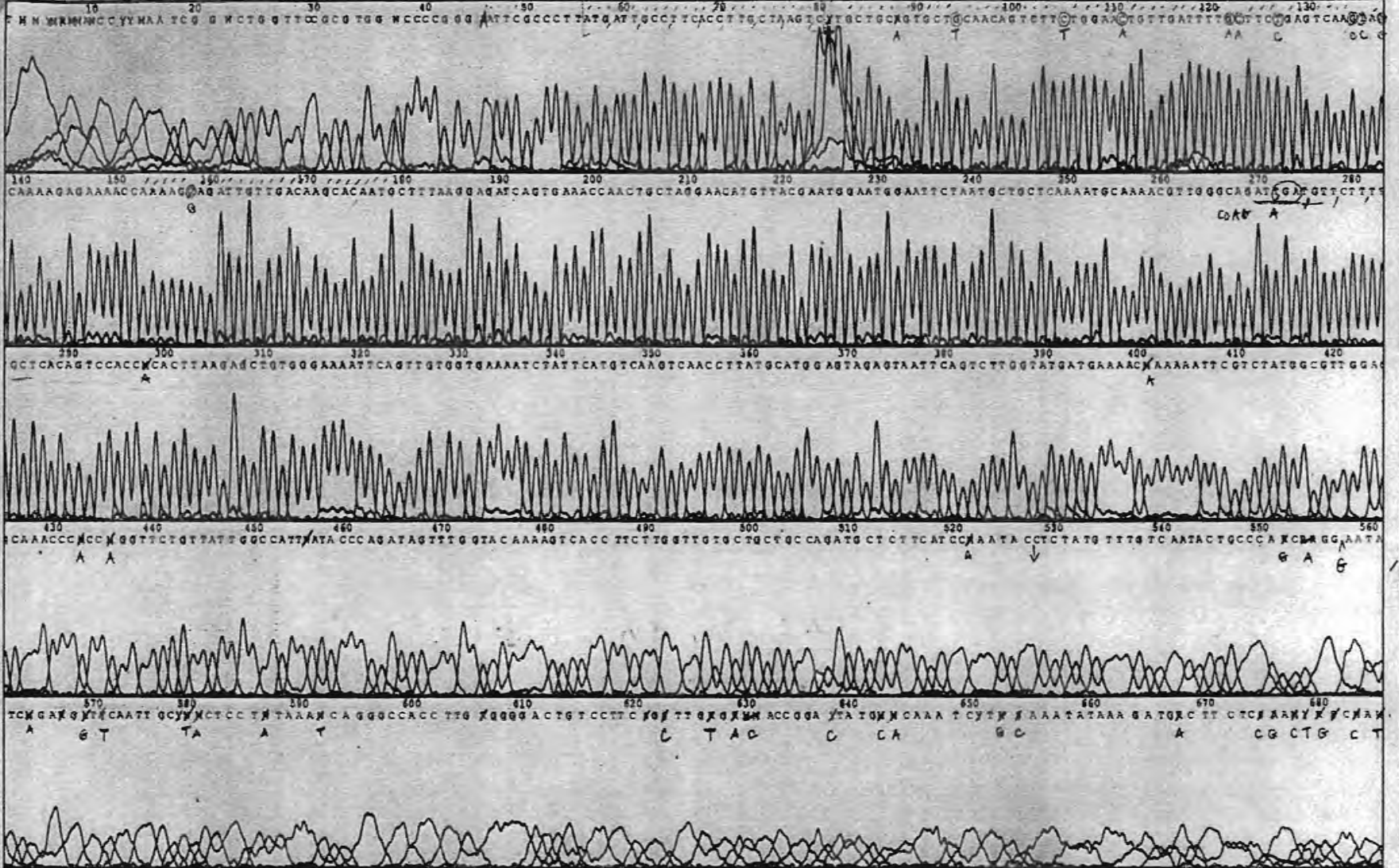
Mass Spectrometry result spot 8



Mass Spectrometry result spot 8

m/z	SN	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
1154.663	8.9	1348	2385	265.85	218
1211.702	117.3	43116	3051	4306.15	3628
1227.636	47.4	15495	2875	1808.77	1683
1252.613	7.3	1177	4028	303.66	203
1284.644	119	4079	2109	6222.54	9847
1298.648	14.4	1098	2926	823.38	971
1300.681	14.8	942	3875	850.22	635
1317.714	29	5000	3025	1491.15	1403
1339.826	43.1	13715	3972	1821.92	1425
1658.691	9.4	1505	397	277	197
1673.85	11.3	1977	4925	297.36	276
1911.987	8.7	937	605	254	129
2327.083	77.8	19034	6339	1778.11	2210
2440.145	71.1	20453	6065	1546.53	2101
2597.266	18.6	4052	4952	445.08	723
2654.284	167.9	3144	4111	3485.71	9608
2658.305	17.5	305	3852	394.78	731
2668.345	13.7	635	4450	276.96	695

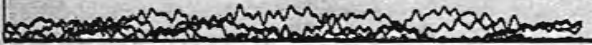
O1 in pBEX

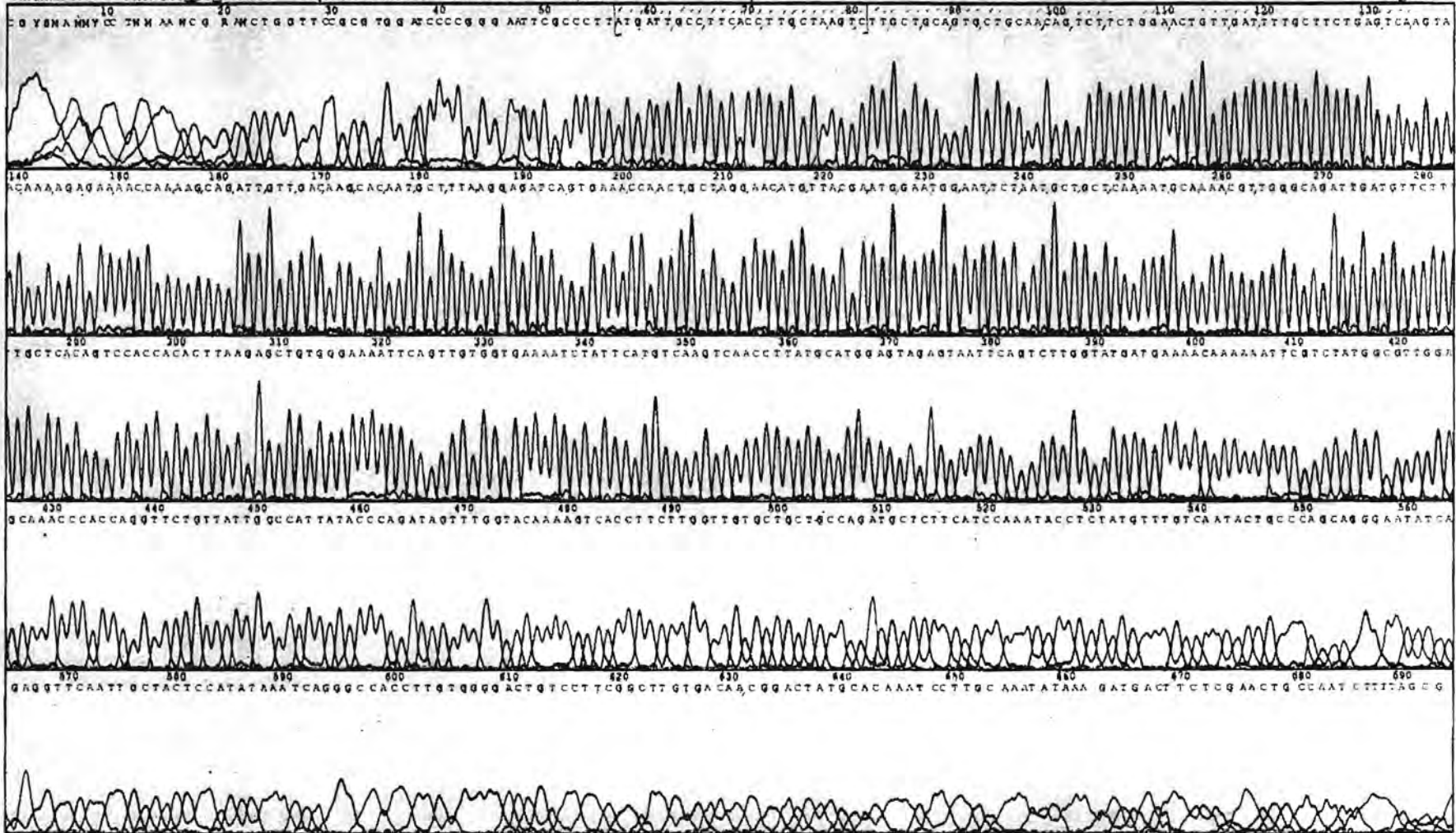


690 700 710 720 730 740 750 760 770 780
Y Y T T A G G / / / A A C A A C T / A A T T C C X G A C T G A A T G G A T C A G T C A A A A T G C C C T G Y T C T X X C T C T G C C A C A T T T A X T A T X T X A A G G G C C X A T T X X T C T
A C C B T A G G A T T G T T A A A A A A T T



790 800 810
K G A N T X A N K T G A C C A W Y Y T G C T Y T G G G G





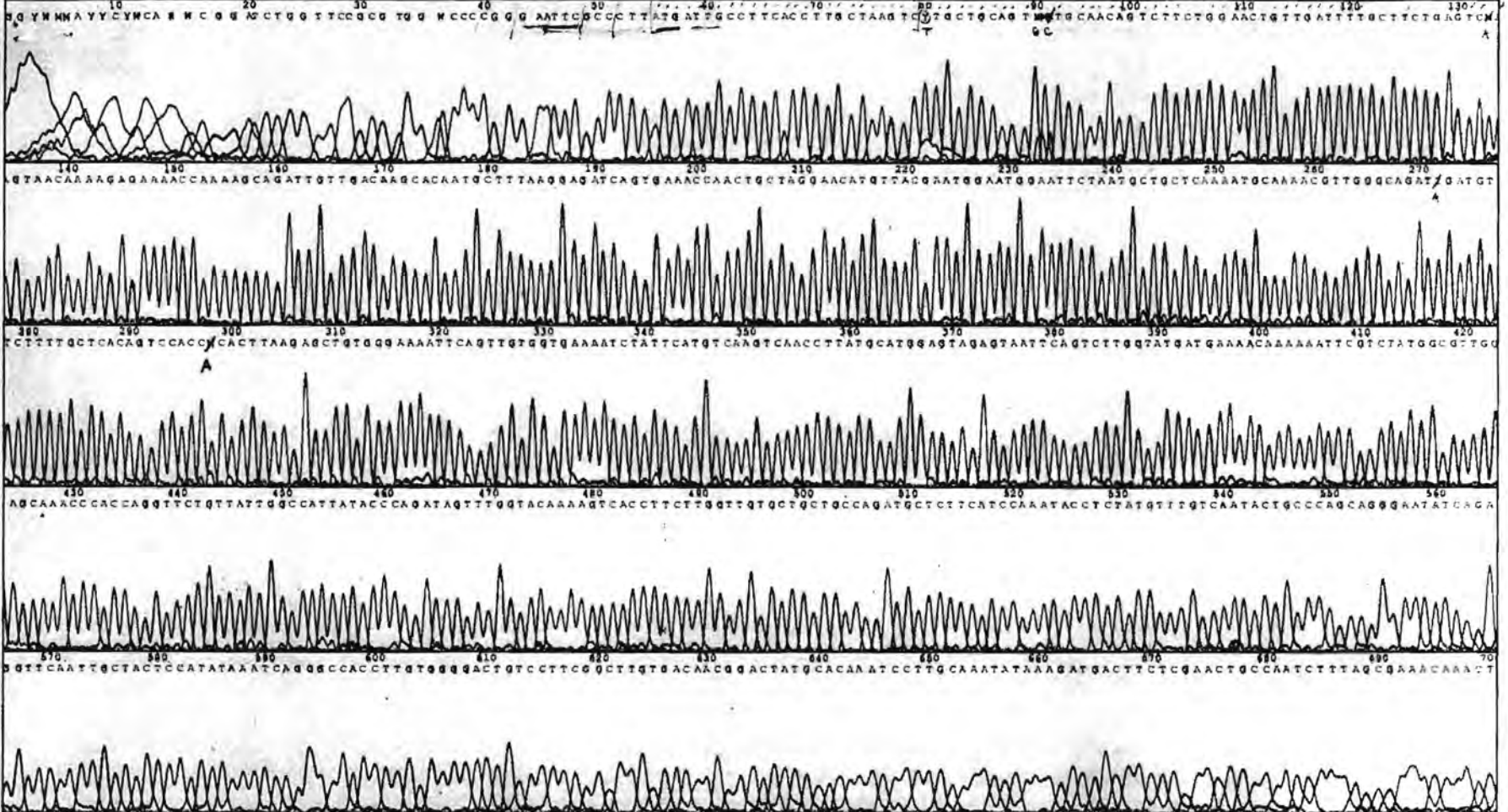
700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
KACAAAGTAAATG CCA GACTGAA T GG ATCAA GTCAAAA TG CCC TGC TT C T GC TTCTG CC CCA TA AAA T AA TA TAAA GGGCG AA TTC SCC C TT TGA TT G CCTT CMCCT
.....A.....
T



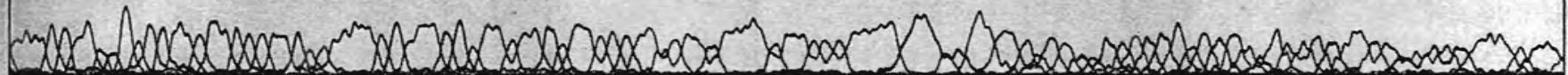
810
T GGCTAAG



Og in pOR



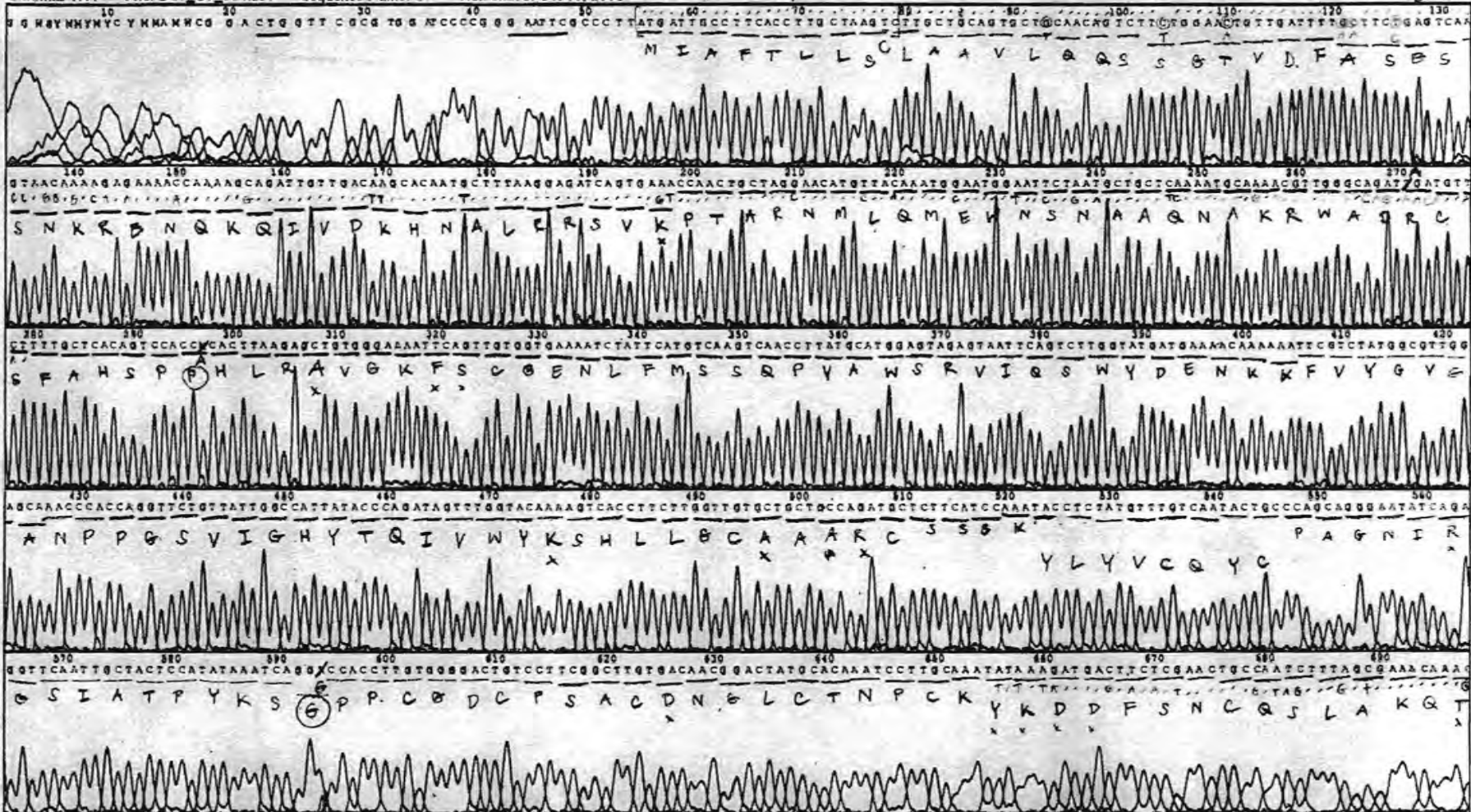
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810
AAATGCCAGACTGAATGGATCAAATCAAATGCCCTGCTTCTT [GCTTCTGCCACAATAAAA TAATATAAAA GGG CGAATTCATCGTGACTGACTGACGATCTG CCTGG CGCGTTTC GG
-----]



820 830 840
TG ATG ACG G TG AAAAA CCTTCTTG AC



Oa in pBEX





ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมี

1. PS 500 XT DC Power Supply, Hoefer Scientific Instruments (For second dimension)
2. IPG buffer (Lot no. 10009759, GE Healthcare Bio-Sciences)
3. Dithiothretonate (DTT, Lot no. 118373, GE Healthcare Bio-Sciences)
4. Iodoacetamide (IAA, Lot no. 5, GE Healthcare Bio-Sciences)
5. Acetonitrile LC/MS grade (ACN, JT Baker)
6. α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA, Bruker Daltonik GmbH)
7. Trifluoro acetic acid peptide sequencing grade (TFA, Applied Biosystems)
8. Agarose (Vivantis, USA)
9. Acrylamide, (Sigma, USA)
10. Ampicillin, Sodium Salt (Bio 101, USA)
11. N-N-Methylenbisacrylamide (Merck, Germany)
12. Brilliant Blue R (Usb, USA)
13. Glycine (Usb, USA)
14. LB Broth, Miller (Difco, France)
15. Agar, Granulated ((Difco, France)
16. 2-Mercaptoethanol (Sigma, USA)
17. Sodium Dodecyl Sulfate (Usb, USA)
18. Tween 20, for electrophoresis (Sigma, USA)
19. Triton X-100 (Sigma, USA)
20. Trisma base (Sigma, USA)
21. King Cobra Antivenom (Thai Red Cross, Thailand)
22. BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Gene System, USA)
23. DyeEx 2.0 Spin kit (QIAGEN, USA)

อุปกรณ์

1. Mass spectrometer (MALDI-TOF MS model reflex V, Bruker Daltonik GmbH, , Bio Service Unit, Biotec)
2. Linear Immobiline™ Drystrip pH 3-10 ความยาว 7 ซม. (no. 22909, GE Healthcare Bio Sciences)

3. Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, Amersham Biosciences (For first dimension)
4. GStrap FF affinity column (GE Healthcare, Sweden)
5. Thermal Cycle (MWG-Biotech, Germany)
6. Shaking Incubator (Daihan Labtech, Korea)
7. Heat Block (Labnet, USA)
8. Microcentrifuge (Hettich, Germany)
9. General Incubator (Daihan Labtech, Korea)
10. Waterbath (Julabo, USA)
11. Image Master VDS, Amersham Biosciences, USA)
12. Mini Horizontal Gel Electrophoresis & Mini Power Supply & Transformer (Q. Biogene, USA)
13. Vertical Gel Electrophoresis (Consort, UK)
14. Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA)
15. Mini-Rocker Shaker (Biosan, USA)
16. Minicentrifuge (Labnet, USA)
17. ABI PRISM Sequencer (Perkin Elmer, USA)
18. Ultrasonicator (Ultrasonic Processor, Sonics, USA)

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์
(ภาษาอังกฤษ) Dr. Thaweesak Tirawatnpong
2. เลขที่บัตรประชาชน
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10330
โทรศัพท์ 022520161-4 ต่อ 182 โทรสาร 022540212
E-mail Address โทรศัพท์มือถือ
5. ประวัติการศึกษา
 - 8.1 ปริญญาตรีสาขาวิทยาศาสตร์ (เทคนิคการแพทย์) สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล
 - 8.2 ปริญญาเอกสาขา Biochemistry and Molecular Biology
สถาบัน Kansas University, Medical Center, Kansas, USA.
6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ อิมมูโนวิทยา, จุลชีววิทยา, ชีวโมเลกุล
7. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค. ศ. 2000 ถึงปัจจุบัน
 - 7.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ
 1. Tirawatnpong T, Temchareon P, Na Nagara B, and Anukarahanonta T. Alteration of vascular permeability due to cytochalasin E. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1980; 52: 209-213.
 2. Zhao LJ, Irie K, Tirawatnpong T, Nakano R, Nakashima A, Morimatsu M, and Padmanabhan R. Synthesis of biologically active adenovirus preterminal protein in insect cells using baculovirus vector. *Gene.* 1991; 100: 147-154.
 3. Tirawatnpong T, Chandran B, Putnak R, and Padmanabhan R. Mapping of a region of dengue virus type-2 glycoprotein required for binding by a neutralizing monoclonal antibody. *Gene.* 1992; 116: 139-150.
 4. Kamolvarin N, Tirawatnpong T, Rattanasiwamoke R, Tirawatnpong S, Panpanich T, and Hemachudha T. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J Infect Dis.* 1993; 167(1): 207-210.
 5. Tirawatnpong T. Semiquantitative analysis of DNA using one-step nested polymerase chain reaction. *Science Innovation '93. The Conference on New Research Techniques, AAAS Publication #93-21S, 1993; 49.*

6. Tangchaisin P, Pruksananonda K, Tirawatnpong T, and Virutamasen P. Reliable sex determination of mouse preimplantation embryos by PCR amplification of male-specific genes in single blastomeres. *J Med Assoc Thai*. 1996; 79 suppl 1: S78-S87.
7. ทศนีย์ สกุดคำรพพานิช, ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ และ ศรีวิไล ต้นประเสริฐ. Detection of HCV RNA in Thai blood donors : correlation to alanine aminotransferase level. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต* 1997; 7(1): 19-26.
8. Tirawatnpong T. Detection of hepatitis C virus by PCR technic. Editorial article. *Thai Journal of Hematology and Transfusion Medicine*. 1997; 7(1): 41-43.
9. Kasempimolporn S, Tirawatnpong T, and Saengseesom W. Study on involvement of Fas receptor in the cell-mediated cytotoxicity of rabies-infected cells. Queen Saovabha Memorial Institute 75th Anniversary Research Conference Current Studies of Rabies in Thailand. 1997; 21.
10. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์, สนิมมาญ ถนอมชาติ, อรพรรณ วงศ์ศรีขลาภัย และ อรุณ ชูศรีขันธ์ " Prevalence of Hepatitis G virus in Thai blood donors " งานประชุมวิชาการใหญ่ ประจำปี 2540 เรื่อง Transfusion Medicine Towards the Millenium 2540 : 249-253.
11. Tirawatnpong T. Evaluation of the modified AMPLICOR HIV-1 assay with Thai clinical samples. In : HIV Disease Management Symposium Highlights. Pattaya, Thailand. July 1997; 4-5.
12. Tangchaisin P, Pruksananonda K, Tirawatnpong T, Yodyingyud V, Virutamasen P. Effects of different biopsy methods on the development of preimplantation mouse embryos, in vitro and in vivo: implication for preimplantation genetic diagnosis. *J Med Assoc Thai*. 1999 Nov; 82(11): 1142-8.
13. Kasempimolporn S, Tirawatnpong T, Saengseesom W, Nookhai S, Sitprijia V. Immunosuppression in rabies virus infection mediated by lymphocyte apoptosis. *Jpn J Infect Dis*. 2001 Aug; 54(4): 144-7.
14. Suntrarachun S, Pakmanee N, Tirawatnpong T, Chanhome L, Sitprijia V. Development of a polymerase chain reaction to distinguish monocellate cobra (*Naja khouthia*) bites from other common Thai snake species, using both venom extracts and bite-site swabs. *Toxicon*. 2001 Jul; 39(7): 1087-90.
15. Sirivichayakul S, Tirawatnpong T, Ruxrungtham K, Lorenzen S, Oelrichs R and Phanuphak P. PCR-Based methods as an alternative tool for generating humanized oligonucleotide. *AIDS Vaccine*, 2001.
16. Sirivichayakul S, Tirawatnpong T, Ruxrungtham K, Oelrichs R, Lorenzen S, Xin K-Q, Okuda K and phanuphak P. Construction and Immunogenicity Study of 297-bp Humanized HIV V3 DNA of an Approximated Last Common Ancestor in Mice. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2004; 22: 49-60
17. Kasempimolporn S, Saengseesom W, Tirawatnpong T, Puempumpanich S and Sitprijia V. Genetic Typing Feline Rabies Virus Isolated in Greater Bangkok Thailand. *Microbiol. Immunol*. 2004; 48(4): 307-311.

18. Suntrarachun S, Amphanwong S, Tirawatnpong T, Seepongviraiikul R. Safety test for an absence of Mycobacteria in BCG vaccine by multiplex PCR. J. Med. Tech. Assoc. Thailand. 2007; 35(1): 1793-1803.
19. Seujange Y, Eiam-Ong S, Tirawatnpong T and Eiam-Ong S. Role of Angiotensin II on Dihydrofolate Reductase, GTP- Cyclohydrolase I and Nitric Oxide Synthase Expressions in Renal Ischemia- Reperfusion. Am J Nephrol 2008; 28: 692-700.

7.2 Text books

1. วิทยานิพนธ์กัมกัน ฤทัย สกุลแรมรุ่ง บรรณาธิการ 2536.
2. วิทยานิพนธ์กัมกันเบื้องต้น 2539.
3. อัญชีวิทยาทางการแพทย์ รศ. นพ. นเรศ สุขเจริญ บรรณาธิการ 2541.
4. วิทยานิพนธ์กัมกันพื้นฐานและคลินิก ไหม รัตนวรารักษ์ บรรณาธิการ 2543.
5. ภาวะติดเชื้อ Molecular/Cellular and Clinical Basis สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล บรรณาธิการ 2547

7.3 Honor

รางวัลงานวิจัยดีเด่น สภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2535

รางวัล วิจัยมหิดลปีบราวน ปี พ.ศ. 2535

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) (นาย, นาง, นางสาว) _นางสาวสุนุชชา สุนทรารชุน_
(ภาษาอังกฤษ) (Mr., Mrs., Miss) _Miss Sunutcha Suntrarachun_

2. เลขที่บัตรประชาชน 3509900258398

3. ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.) __ผู้ชำนาญการนักวิทยาศาสตร์การแพทย์_

4. ที่อยู่(ที่ทำงาน) ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย_
จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330_

โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 161 โทรศัพท์ 02-2540212_

E-mail Address_sunutcha@yahoo.com โทรศัพท์มือถือ 085-5141596_

5. ประวัติการศึกษา

8.1 ปริญญาตรีสาขา วิทยาศาสตร์ (เทคนิคการแพทย์) สถาบัน มหาวิทยาลัยรังสิต_
ปีที่สำเร็จ 2535_

8.2 ปริญญาโทสาขา Applied Science (Applied Microbiology and Biotechnology) สถาบัน
RMIT University, Melbourne, Australia_
ปีที่สำเร็จ 2541_

หัวข้อวิทยานิพนธ์ Development of A Multiplex PCR for Detection of Methicillin Resistant
Staphylococci Directly from Blood Cultures

6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (ตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

Molecular Biology, Medical Microbiology_

7. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 ถึงปัจจุบัน

1: Suntrarachun S, Amphanwong S, Tirawatnpong T, Seepongviraiikul R. Safety test for an absence of Mycobacteria in BCG vaccine by multiplex PCR. J. Med. Tech. Assoc. Thailand. 2007; 35(1): 1793-1803.

2: สุรศักดิ์ เอกโสวรรณ, สุนุชชา สุนทรารชุน. โรคโลหิตจางติดต่อในม้า. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการ บำบัดโรคสัตว์ฯ 2550 เม.ย-มิ.ย 19(2): 25-36.

3: Raimundo O, Heussler H, Bruhn JB, Suntrarachun S, Kelly N, Deighton MA, Garland SM. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. J Hosp Infect. 2002 May; 51(1):33-42. PMID: 12009818 [PubMed - indexed for MEDLINE]

4: Nuchprayoon I, Sai-Ngam A, Suntrarachun S, Noiphrom J, Pakmanee N, Chanhome L, Nuchprayoon S, Sitprijia V. Molecular cloning of phospholipase A2 from a Thai Russell's viper venom gland cDNA library. J Med Assoc Thai. 2001 Jun; 84 Suppl 1:S99-105. PMID: 11529387 [PubMed - indexed for MEDLINE]

5: **Suntrarachun S**, Roselieb M, Wilde H, Sitprija V. A fatal jellyfish encounter in the Gulf of Siam. J Travel Med. 2001 May-Jun;8(3):150-1. No abstract available. PMID: 11468120 [PubMed - indexed for MEDLINE]

6: **Suntrarachun S**, Pakmanee N, Tirawatnpong T, Chanhome L, Sitprija V. Development of a polymerase chain reaction to distinguish monocellate cobra (*Naja khouthia*) bites from other common Thai snake species, using both venom extracts and bite-site swabs. Toxicon. 2001 Jul; 39(7):1087-90. PMID: 11223099 [PubMed - indexed for MEDLINE]

8. ผลงานวิจัยอื่น ๆ (เช่น proceeding หนังสือ ฯลฯ)

1. **Suntrarachun, S.** Tirawatnpong, T., Pakmanee, N., Noiphrom, J., Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 425950.
2. **Suntrarachun, S.** Tirawatnpong, T., Pakmanee, N., Noiphrom, J., Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 425949.
3. **Suntrarachun, S.** Tirawatnpong, T., Pakmanee, N., Noiphrom, J., Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 425948.
4. Tirawatnpong, T., **Suntrarachun, S.**, Pakmanee, N., Noiphrom, J., Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 388996.
5. **Suntrarachun S**, Khunsap, S., Tirawatnpong T, and Thamaree, S. 2009. *Ophiophagus hannah* opharin precursor, mRNA, complete cds. NCBI Accession number FJ 767755.
6. **Suntrarachun S**, Akesowan, S., Tirawatnpong T., Khow, O. 2009. Equine Infectious Anemia Virus isolate Tha1 gag protein gene, partial cds. NCBI Accession number FJ 713789.
7. **Suntrarachun S**, Akesowan, S., Tirawatnpong T., Khow, O. 2009. Equine Infectious Anemia Virus isolate Tha2 gag protein gene, partial cds. NCBI Accession number FJ 713790.
8. **Suntrarachun S**, Akesowan, S., Tirawatnpong T., Khow, O. 2009. Equine Infectious Anemia Virus isolate Tha3 gag protein gene, partial cds. NCBI Accession number FJ 713791.

9. งานวิจัยที่กำลังทำ :

1. การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (Cloning of the Neuromuscular blocking compound from the venom of the king cobra) แหล่งทุนจากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ
ดำเนินการได้ประมาณ 60%

2. การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อ Equine Infectious Anemia Virus โดยวิธี Nested PCR โดยทุนของสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ดำเนินการได้กว่า 80%

10. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

1. การทำโคลนนิ่ง neurotoxin จากพิษต่อมพิษงูทับสมิงคลา (Molecular cloning of neurotoxin from *Bungarus candidus*) แหล่งทุนของสถานเสาวภา สภากาชาดไทย (อยู่ระหว่างการส่งตีพิมพ์)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง สุจิตตรา ขุนทรัพย์ (ไทยทำนัส)

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Suchitra Khunsap (Thaithumnas)

2. เพศ หญิง สถานะทางการสมรส สมรส

3. วัน เดือน ปีเกิด 21 กุมภาพันธ์ 2516 อายุ 35 ปี

4. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5

5. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330

โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 161 โทรสาร 02-2540212

6. ที่อยู่ (ที่บ้าน) 24/4 หมู่ 1 สำนักเครื่องกลและสื่อสาร กรมทางหลวง ถ.แจ้งวัฒนะ ต. คลองเกลือ

อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี 11120

7. E-mail Address: sthaitumnas@yahoo.com โทรศัพท์มือถือ 089-1207760

8. ประวัติการศึกษา

8.1 ปริญญาตรีสาขา วิทยาศาสตร์ (ชีววิทยา) สถาบัน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

8.2 ปริญญาโทสาขา จุลชีววิทยาประยุกต์ สถาบัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

9. สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Molecular Biology และ Cell Biology

10. ผลงานวิจัยที่นำเสนอในการประชุมทางวิชาการ

1. Oral presentation เรื่อง Development of Dot-Elisa for Detection of Hematotoxic snake venoms.

ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 8th IST Asia-Pacific Meeting On Animal, Plant and Microbial Toxins ที่เมือง Hanoi ประเทศเวียดนาม ระหว่าง วันที่ 2-6 ธันวาคม 2551

2. Poster presentation เรื่อง Effect of *Cryptelytrops albolabris*, *Calloselasma rhodostoma* and *Daboia Russelli siamensis* venoms on five human cancer cell lines. ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 8th IST Asia-Pacific Meeting On Animal, Plant and Microbial Toxins ที่เมือง Hanoi ประเทศเวียดนาม ระหว่างวันที่ 2-6 ธันวาคม 2551

11. งานวิจัยที่กำลังทำอยู่

1. การศึกษาผลขององค์ประกอบของพิษงู *Cryptelytrops albolabris*, *Calloselasma rhodostoma* and *Daboia Russelli siamensis* ต่อเซลล์มะเร็ง แหล่งทุนของสถานเสาวภา สภากาชาดไทย

2. ผลของพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาและจลนศาสตร์ในกระต่าย แหล่งทุนของ สกว.

3. การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ (Cloning of the Neuromuscular blocking compound from the venom of the king cobra) แหล่งทุนจากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ ดำเนินการได้ประมาณ 60%

4. การทำโคลนนิ่ง neurotoxin จากพิษต่อมพิษงูทับสมิงคลา (Molecular cloning of neurotoxin from *Bungarus candidus*) แหล่งทุนของสถานเสาวภา สภากาชาดไทย (อยู่ระหว่างการส่งตีพิมพ์)

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว อรวรรณ แซ่ไคว่

(ภาษาอังกฤษ) Miss Orawan Khow

2. เลขที่บัตรประชาชน 3101300185884

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ชำนาญการพิเศษ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 7

4. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) 1871 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10330
โทรศัพท์ 022520161-4 ต่อ 182 โทรสาร 022540212

E-mail Address qsmikhow@yahoo.com โทรศัพท์มือถือ 099654243

5. ประวัติการศึกษา

8.1 ปริญญาตรีสาขา ชีววิทยา สถาบัน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
ปีที่สำเร็จ 2533 คะแนนเฉลี่ยสะสม 2.68

8.2 ปริญญาโทสาขา เคมชีวภาพ สถาบัน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
ปีที่สำเร็จ 2537 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.43

หัวข้อวิทยานิพนธ์ Characterization and properties of Endo-1-4-b-glucanases
from *Clostridium josui*

6. สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง ภูมิโนวิทยา, ชีวเคมี

7. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค. ศ. 2000 ถึงปัจจุบัน

1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Yanoshita R, Ogawa Y, Murayama N, Omori-Satoh T, Saguchi K, Higuchi S, **Khow** O, Chanhom L, samejima Y, Sitprija V. (2006) Molecular cloning of the major lethal toxins from two kraits (*Bungarus flaviceps* and *Bungarus candidus*). *Toxicon* 47: 416-424. (impact factor =)

2. **Khow O**, Chanhom L, Omori-Satoh T, Ogawa Y, Yanoshita R, Samejima Y, Kuch U, Mebs D, Sitprija V. (2003) Isolation, toxicity and amino terminal sequences of three major neurotoxins in the venom of Malayan krait (*Bungarus candidus*) from Thailand. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 134(6): 799-804. (impact factor = 2.148)

3. Chanhom L, **Khow O**, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2003) Antihemorrhagin in the blood serum of king cobra (*Ophiophagus hannah*): purification and characterization. *Toxicon* 41(8): 1013-1019. (impact factor = 2.020)

4. Sriprapat S, Aeksowan S, Sapsutthipas S, Chotwivatthanakun C, Suttijitpaisal P, Pratanaphon R, **Khow O**, Sitprija V, Ratanabanangkoon K. (2003) The impact of a low dose, low

volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand. *Toxicon* 41(1): 57-64. (impact factor = 2.020)

5. Chanhome L, **Khow O**, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2002) Capacity of Thai green pit viper antivenom to neutralize the venoms of Thai *Trimeresurus* snakes and comparison of biological activities of these venoms. *Journal of Natural Toxins* 11(3):251-259.(impact factor = 0.894)

6. **Khow O**, Chanhome L, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2002) Isolation of the major lethal toxin in the venom of *Bungarus flaviceps*. *Toxicon* 40(4): 463-469. (impact factor = 1.575)

7. **Khow O**, Chanhome L, Omori-Satoh T, Puempunpanich S, Sitprija V. (2002) A hemorrhagin as a metalloprotease in the venom of *Trimeresurus purpureomaculatus*: purification and characterization. *Toxicon* 40(4): 455-461. (impact factor = 1.575)

8. Win-Aung, Pakmanee N, **Khow O**, Nambut C, Sitprija V. (2001) Cross neutralization of the lethal activities of Myanmar and Thai Russell's viper venoms by Thai and Myanmar antivenoms. *Journal of Natural Toxins* 10(4):335-342. (impact factor = 0.894)

9. **Khow O**, Chanhome L, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2001) Effectiveness of Thai cobra (*Naja kaouthia*) antivenom against sea snake (*Lapemis hardwickii*) venom: verification by affinity purified F(ab')₂ fragments. *Journal of Natural Toxins* 10(3):249-253. (impact factor = 0.894)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) (นาง) พรรณิภา จุลสุคนธ์
(ภาษาอังกฤษ) (Mrs.) Pannipa Chulasugandha

2. เลขที่บัตรประชาชน 3100904993268

3. ตำแหน่งปัจจุบัน เภสัชกร 8

4. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) ฝ่ายวิจัย และ พัฒนา สถานเสาวภา 1871 พระราม 4 ปทุมวัน
จังหวัด กทม รหัสไปรษณีย์ 10330

โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 162 โทรสาร 02-2540212

E-mail Address pannipa_c@yahoo.com โทรศัพท์มือถือ 089-6964266

5. ประวัติการศึกษา

8.1 ปริญญาตรีสาขา เภสัชศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่สำเร็จ 2518 คะแนนเฉลี่ยสะสม

8.2 ปริญญาโทสาขา เภสัชศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่สำเร็จ 2525 คะแนนเฉลี่ยสะสม

หัวข้อวิทยานิพนธ์

8.3 ปริญญาโทสาขา Pharmaceutical Technology สถาบัน State University of

Ghent,Belgium

ปีที่สำเร็จ 2534 คะแนนเฉลี่ยสะสม

หัวข้อวิทยานิพนธ์

8.4 อื่น ๆ (ระบุ) _____

6. สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง (ตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

เภสัชกรรมการผลิต

7. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 ถึงปัจจุบัน

9.1 Pakmanee N., Khow O., Chanhome L., Aeksowan S., Chulasugandha P. and Sitprija V.

(2003) Cross-Reactivity of Antivenom. Journal of Toxicology Toxin Reviews 22 (1): 91-113 (impact factor = 01.000) ที่มา :Journal Citation Reports,

9.2 Chulasugandha P., Khawplod P., Havanond P. and Wilde H. (2006) Cost comparison of

rabies pre-exposure vaccination with post-exposure treatment in Thai children. Vaccine 24: 1478-1482 (impact factor =) ที่มา:Journal Citation Reports, 2003

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) (นาย, นาง, นางสาว) นางสาวจूरีพร น้อยพรหม
(ภาษาอังกฤษ) (Mr., Mrs., Miss) Miss Jureeporn Noiphrom

2. เลขที่บัตรประชาชน 3101600400276

3. ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.) นักวิทยาศาสตร์การแพทย์

4. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330

โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 161 โทรสาร 02-2540212

E-mail Address tu-juree-n@hotmail.com โทรศัพท์มือถือ 086-4074705

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรีสาขา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา
ปีที่สำเร็จ 2540

5.2 ปริญญาโทสาขา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา) สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จ 2550

หัวข้อวิทยานิพนธ์ Neuromuscular Effect of King Cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom

6. สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง (ตอบได้มากกว่า 1 สาขา)

Biology, Pharmacology, Immunology

7. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 ถึงปัจจุบัน

1. Rojnuckarin P, Chanthawibun W, **Noiphrom J**, Pakmanee N, Intragumtornchai T. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antivenom for local effects of green pit viper bites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Sep; 100(9):879-84. Epub 2006 Feb 8.

2. Chiobamroongkiat M, Pakmanee N, **Noiphrom J**, Jaijarernsub W, Sutthisri R. King cobra venom antibody in serum of king cobra handlers in Koksnga village. *Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin*, 2003 Apr; 2(1): 9-19.

3. Nuchprayoon I, Sai-Ngam A, Suntrarachun S, **Noiphrom J**, Pakmanee N, Chanhome L, Nuchprayoon S, Sitprija V. Molecular cloning of phospholipase A2 from a Thai Russell's viper venom gland cDNA library. *J Med Assoc Thai.* 2001 Jun; 84 Suppl 1:S99-105.

8. ผลงานวิจัยอื่น ๆ (เช่น proceeding หนังสือ ฯลฯ)

1. Suntrarachun, S. Tirawatnapong, T., Pakmanee, N., **Noiphrom, J.**, Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 425950.

2. Suntrarachun, S. Tirawatnapong, T., Pakmanee, N., **Noiphrom, J.**, Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 425949.

3. Suntrarachun, S. Tirawatnpong, T., Pakmanee, N., **Noiphrom, J.**, Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 425948.

4. Tirawatnpong, T., Suntrarachun, S., Pakmanee, N., **Noiphrom, J.**, Sitprija, V. 2003. NCBI accession no. AY 388996.

5. Pakmanee N, Aung W, Khaw O, **Noiphrom J**, Sitprija V. Neutralization of lethal and enzyme activities of *Daboia russelli siamensis* from Thailand and Myanmar by Thai and Myanmar Russell's viper antivenom. 13th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. Paris. 200; Abstr. No. 223.

โครงการที่ 6

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่
แยกส่วนเพื่อหาส่วนที่มีศักยภาพ
เป็นประโยชน์ทางการรักษา

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

รายงานการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่แยกส่วน
เพื่อหาส่วนที่มีศักยภาพเป็นประโยชน์ทางการรักษา

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

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

นาง พรรณิภา จุลสุคนธ์

นางสาว อรวรรณ แซ่ไคว่

นาง สุจิตรตรา ขุนทรัพย์

รศ. โสภิต ธรรมอารี

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ

๒๕๔๕

บทคัดย่อ

การศึกษาหาปริมาณโปรตีน คุณสมบัติทางชีวเคมี และ ผลต่อเซลล์มะเร็งของส่วนที่แยกได้ 7 ส่วน (fraction) จากการแยกพิษงูจงอางขั้นต้น (จากโครงการย่อยที่ 2) พบว่าเอ็นไซม์บางชนิด เช่น proteolytic, phosphomonoesterase และ phospholipase พบในทั้ง 7 ส่วนที่แยกได้ แต่เอ็นไซม์บางชนิดพบในเฉพาะบางส่วนที่แยกได้ เช่น phosphodiesterase พบในส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 4, proteolytic activity พบในส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 5, phosphomonoesterase and L-amino acid oxidase activity พบในส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 6 และ phospholipase A activity พบในส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 7

การศึกษาผลต่อเซลล์มะเร็งกับเซลล์มะเร็งของคน 5 ชนิด พบว่า ส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 5 มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งบางชนิดได้ดีกว่ายารักษามะเร็ง Doxorubicin ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก และ ควรศึกษาคือในรายละเอียดต่อไป

Abstract

Seven fractions obtained from the first fractionation step (Project II) were studied for protein content, biological activity and cytotoxicity. Some enzyme activities such as proteolytic, phosphomonoesterase and phospholipase activity were found in all fractions but some enzyme activities were prominent in specific fraction like phosphodiesterase activity in fraction no. 4, proteolytic activity in fraction no.5, phosphomonoesterase and L-amino acid oxidase activity in fraction no.6 and phospholipase A activity in fraction no.7.

The cytotoxicity study of the fractionated fractions in five human cancer cell lines showed that fraction no. 5 possessed high cytotoxicity to some cancer cell lines as compared to cytotoxic drug, Doxorubicin, used as positive control. Further study in cytotoxic activity of this fraction is interesting.

KEY WORD ACTIVITIES, FRACTIONATED VENOM, KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
สารบัญเรื่อง	IV
สารบัญตาราง	V
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	VI
บทนำ	I
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	I
วัตถุประสงค์	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
วิธีการดำเนินการวิจัย	4
การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมี	4
การศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง	12
ผลการวิจัย	13
คุณลักษณะทางชีวเคมี	13
ฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง	19
อภิปราย/วิจารณ์	20
สรุป และ เสนอแนะ	20
บรรณานุกรม	21
ภาคผนวก	23
ประวัตินักวิจัย และ คณะ	31

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1. ปริมาณ โปรตีนที่คำนวณได้ของ fraction เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน	13
ตารางที่ 2. Proteolytic activity ของ fraction ตามวิธีของ Kunitz	14
ตารางที่ 3. Phosphodiesterase activity ของ fraction ตามวิธีของ Tan และ Tan	15
ตารางที่ 4. Phosphomonoesterase activity ของ fraction ตามวิธีของ Tan และ Tan	15
ตารางที่ 5. Phospholipase A activity ของ fraction ตามวิธีของ Tan และ Tan	16
ตารางที่ 6. L-Amino acid oxidase activity ของ fraction ตามวิธีของ Tan และ Tan	16
ตารางที่ 7. Acetylcholinesterase activity ของ fraction ตามวิธีของ Ellman และ คณะ	17
ตารางที่ 8. สรุปผลการศึกษาปริมาณ โปรตีน และ enzyme activity ของ fraction	18
ตารางที่ 9. สรุปผลการศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง	19

คำอธิบายสัญลักษณ์ และ คำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

PDE	Phosphodiesterase
PME	Phosphomonoesterase
PLA	Phospholipase A
LAAO	L-Amino acid oxidase
AChE	Acetylcholinesterase

บทนำ (Introduction)

งูจงอางเป็นงูพิษที่มีขนาดใหญ่ที่สุด พบในป่ากระจายตั้งแต่ อินเดีย จีนตอนใต้ ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และ อินโดจีน แม้จะเป็นงูพิษชนิดที่ให้พิษปริมาณมากจากขนาดตัวที่ใหญ่ แต่การศึกษาเกี่ยวกับพิษงูจงอางเทียบกับงูพิษอื่นแล้วน้อยกว่ามาก องค์ประกอบหลักในพิษงูจงอางคือ neurotoxin ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับ post synaptic α - neurotoxin ที่พบในพิษงูชนิดต่างๆกว่า 100 ชนิด เป็นชนิดที่พบในงูจงอางเพียง 8 long chain neurotoxin, 1 short chain neurotoxin และ 1 weak toxin⁽¹⁾ และ การศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยามีเพียงชนิดเดียว คือ hannalgesin ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารระงับปวด (analgesic)⁽²⁾ จึงน่าสนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางยา หรือ diagnostic reagent จากพิษงูจงอาง

Joubert และคณะ (1973)⁽¹⁾ ได้ทำการแยก toxin 2 ชนิดจากพิษงูจงอางด้วยเทคนิค ion-exchange chromatography โดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ CM-cellulose ได้ส่วนประกอบย่อย 4 ส่วน ส่วนประกอบย่อยที่ 2 และ 3 ซึ่งมีความเป็นพิษสูงถูกนำไปแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการใช้เทคนิค gel filtration โดยใช้ Sephadex G-50 เป็นตัวกลางในการแยก ส่วนประกอบย่อยที่ 2 แยกได้ 4 ส่วนย่อย มี 1 ส่วนย่อยที่เป็น major toxin (toxin a) ส่วนประกอบย่อยที่ 3 แยกได้ 3 ส่วนย่อย และมี 1 ส่วนย่อยที่เป็น major toxin (toxin b) Toxin a และ b ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 7,800 ดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE มีค่าความเป็นพิษ (LD_{50}) เท่ากับ 0.3 และ 0.35 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ

Tan และคณะ (1989)⁽²⁾ ได้ทำการแยกพิษงูจงอางด้วยเทคนิค ion-exchange chromatography โดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel ได้ส่วนประกอบย่อย 6 ส่วน ทำการหา enzyme activity ในส่วนประกอบย่อยที่แยกได้ พบว่า ส่วนที่เป็น major lethal toxin อยู่ใน ส่วนประกอบย่อยที่ 1 ซึ่งมี activity ของ เอนไซม์ 5'-Nucleotidase, Phosphodiesterase

ในปี 1993 Chang และคณะ (1993)⁽³⁾ ได้ทำการแยก postsynaptic neurotoxin (α -neurotoxin) พิษงูจงอางโดย SP-Sephadex C-25, Sephadex G-50, CM-52 และ RP-HPLC neurotoxin ที่แยกได้เป็น basic polypeptide ที่มี pI 9.05 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 ตัว และ cysteine 10 ตัว toxin ที่แยกได้มีความคล้ายคลึงกับ α -bungarotoxin ที่แยกได้จากพิษงูสามเหลี่ยมได้วันถึง 60% และมีคุณสมบัติในการจับอย่างจำเพาะกับ nicotinic acetylcholine receptor ของปลาไหลไฟฟ้า (*Torpedo californica*)

ในปี 1999 Lin และคณะ⁽⁴⁾ ได้ทำการแยก neurotoxin 2 ชนิด (Oh-6A และ Oh-6B) จากพิษงูจงอางโดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ SP-Sephadex C-25, CM-52 และ SynChropakRP-P neurotoxin ที่แยกได้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 70 ตัว และ cysteine 10 ตัว 46-53% ของลำดับกรดอะมิโนใน neurotoxin นี้มีความคล้ายคลึงกับ Oh-4, Oh-5, Toxin a และ Toxin b จากพิษงูเดียวกัน

Chang และคณะ(2001)⁽⁵⁾ แยกได้ neurotoxin ชนิดใหม่ ซึ่งมีโครงสร้างต่างจาก α -neurotoxin 6 ชนิดที่แยกมาได้ก่อนหน้านี้ neurotoxin ชนิดใหม่ (Oh9-1) แยกได้จากพิษงูจงอางโดยผ่านพิษลงในคอลัมน์ SP-Sephadex C-25 ได้ส่วนประกอบย่อย 9 ส่วน จากนั้นส่วนที่มีแอกติวิตีของ neurotoxin นำไปแยกต่อด้วยวิธี RP-HPLC โดยใช้ SynChropak RP-P ได้ส่วนประกอบย่อย 3 ส่วน ส่วนที่ I เป็นส่วนที่เป็น neurotoxin เมื่อนำไปหาลำดับกรดอะมิโน พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 ตัว และ cysteine 8 ตัว Oh9-1 สามารถยับยั้งการหดตัวของ carbacol-induced muscle แบบชนิดย้อนกลับไม่ได้ ความสามารถในการยับยั้งการหดตัวของ 50% นี้คิดเป็น 4 เท่าของ α -bungarotoxin

De P และคณะ (2002)⁽⁶⁾ ได้ทำการแยก neurotoxin (CM36) จากพิษงูจงอาง โดยใช้ CM-Sephadex และ HPLC toxin ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 15 กิโลดาลตัน มีค่าความเป็นพิษ 3.5 ไมโครกรัมต่อหนู 20 กรัม เมื่อฉีดพิษเข้าทางเส้นเลือดดำที่หางหนู กลไกความเป็นพิษคือองอาศัย Ca^{2+} แต่ไม่พบว่ามีแอกติวิตีของ PLA_2 Toxin CM36 ไม่มีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจของหนูตะเภา ไม่มีผลต่อความดันเลือดของแมว และ หนู rat แต่มีผลต่อระบบหายใจในหนู rat และ หนูตะเภา

Ying และคณะ (2004)⁽⁷⁾ ได้ทำการแยกส่วนพิษงูจงอางในรูปผงแห้ง ด้วยวิธี gel filtration โดยใช้ Sephadex G-50 ได้ส่วนประกอบย่อย 4 ส่วน ในส่วนที่ 4 มีแอกติวิตีของ neurotoxin จากนั้นนำส่วนที่ได้ไปแยกต่อโดยผ่านใน AKTA Source 15 S ได้ส่วนประกอบย่อย 9 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ถึง 6 ได้ทำหับบริสุทธิ์ต่อด้วย RP-HPLC สุดท้ายได้ α -neurotoxin 7 ชนิด นำไปหาลำดับกรดอะมิโนเพื่อเปรียบเทียบกับ neurotoxin ที่ได้จากการ clone จากต่อมพิษงู

ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ พัฒนาจากองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลชีพ เพื่อใช้ประโยชน์ในการฆ่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น นอกจากนี้ ปัจจุบันพิษจากแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* (Botulinum toxin) ถูกนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ โดยอาศัยฤทธิ์ที่ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และถูกนำมาใช้ด้านความงามโดยใช้ลดรอยเหี่ยวย่น ทำให้ผิวหนังตึงเรียบ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ จนมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการเสริมความงาม นอกจากความสนใจในการศึกษาสารประกอบของพิษงูที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ botulinum toxin ก็ยังมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อจากพิษงูจงอางแล้ว ยังมีสารอื่นๆ อีกเป็นจำนวนมากที่อาจพัฒนาเป็นยา การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของส่วนต่างๆ จะได้ข้อมูลเป็นแนวทางในการนำมาพัฒนาใช้ในทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

พิษงูเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ มีทั้ง enzymatic protein และ non-enzymatic protein โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พวกสารพิษ (toxins) เช่น neurotoxins, cardiotoxin, myotoxin เป็นต้น โปรตีนต่างๆ ในพิษงูมีบทบาทด้านชีวเคมี และเภสัชวิทยาต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการหาอาหารของงู ซึ่งเป้าหมายที่เด่นๆ ของพิษงูได้แก่ cell membranes ; vascular wall, connective tissue component และ plasma proteins เป้าหมายของส่วนที่เป็นสารพิษส่วนใหญ่ได้แก่

receptor ที่จำเพาะ หรือ ion channels เช่น neurotoxin ของพิษงูห้าไทย มี acetylcholine receptor ที่ fold ของเซลล์กล้ามเนื้อรอบๆ ปลายประสาท เป็นต้น⁽⁸⁾ นักวิจัยหลายกลุ่มสนใจนำคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพิษงูมาศึกษาเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาตัวใหม่ๆ ยาที่พัฒนาสำเร็จตัวแรกพัฒนาจาก bradykinin potentiating peptides ซึ่งแยกได้จากพิษงู *Bothrops jararaca* คือ ACE inhibitor : captopril⁽⁹⁾ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาจากพิษงูที่มีในประเทศไทย พิษงูที่น่าสนใจจะนำมาศึกษาคือ พิษงูจงอาง ด้วยเหตุผลที่ งูจงอางเป็นงูพิษขนาดใหญ่ที่สุด ปริมาณพิษมาก และทางสถานเสาวภา สามารถทำการเพาะเลี้ยงงูจงอางได้ และการศึกษาเกี่ยวกับพิษงูจงอางในประเทศไทยมีไม่มาก องค์ประกอบที่สำคัญในพิษงูจงอางคือ neurotoxin แบบ post synaptic neurotoxin ซึ่ง target receptor คือ acetylcholine receptor นอกจากนี้พิษงูจงอางยังมีบทบาทออกฤทธิ์ต่อผนังหลอดเลือดแดงด้วย^(10,11) คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเหล่านี้ ทำให้น่าสนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางยาจากพิษงูจงอาง โดยศึกษาประสิทธิผลอื่นๆ ของส่วนต่างๆที่แยกได้จากพิษงูจงอาง นอกเหนือจากฤทธิ์ที่ยังที่ปลายประสาทต่อกับกล้ามเนื้อ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเภสัชวิทยาของส่วนที่แยกได้จากพิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) ที่มี activities จากโครงการที่ 1 ต่อระบบสำคัญของร่างกาย 5 ระบบ
2. เพื่อให้ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของส่วนต่างๆที่แยกได้จากพิษงูจงอางที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

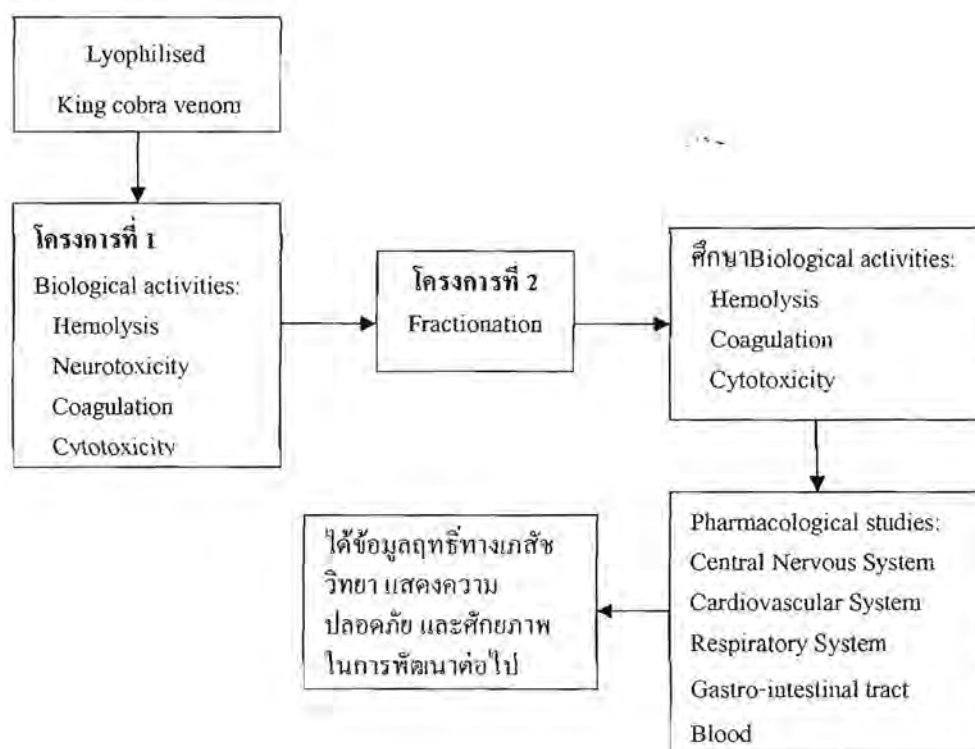
เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของส่วนต่างๆ ที่แยกได้จากพิษงูจงอาง ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาในโครงการที่ 1 เมื่อหา activities ของส่วนต่างๆ ที่แยกจากพิษงูจงอางได้แล้ว ส่วนต่างๆ เหล่านี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อระบบสำคัญของร่างกายเป็นอย่างไร และอาจค้นพบสรรพคุณอื่นๆ ที่น่าสนใจซึ่งนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางยาได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารเพื่อพัฒนาตำรับยาชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง neuromuscular junction ได้ข้อมูลด้านความปลอดภัยทั้งความเป็นพิษ ฤทธิ์ต่อระบบต่างๆ ของร่างกายสัตว์ทดลอง ซึ่งจะบ่งถึงอาการไม่พึงประสงค์ของสารที่นำมาศึกษา ที่อาจเกิดในคน และอาจได้ฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ทางการรักษาใหม่ที่จะพัฒนาเป็นยาต่อไปได้ ข้อมูลที่ได้จะสนับสนุนการเรียนในมนุษย์ต่อไป หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ ได้แก่ หน่วยงานของรัฐ และเอกชน สถานเสาวภา ที่มีบุคลากรสาขาแพทย์ เภสัชกร

บุคลากรทางการแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ (ชีวเคมี เภสัชวิทยา และพิษวิทยา) ที่สนใจการนำพิษงูองอาจไปพัฒนาเป็นยา

ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

นำพิษงูที่แยกได้จากโครงการย่อยที่ 2 ในการแยกครั้งที่ 1 จำนวน 7 ส่วนย่อย (F1 – F7) มาศึกษา

1. คุณลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่

- 1.1 ปริมาณ โปรตีน (Protein content) โดยวิธีของ Bradford ⁽¹²⁾
- 1.2 การศึกษา Enzyme activities
 - 1.2.1 Proteolytic activity ตามวิธีของ Kunitz ⁽¹³⁾
 - 1.2.2 Phosphodiesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan ⁽¹⁴⁾
 - 1.2.3 Phosphomonoesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan ⁽¹⁴⁾
 - 1.2.4 Phospholipase A activity ตามวิธีของ Tan และ Tan ⁽¹⁴⁾
 - 1.2.5 L-Amino acid oxidase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan ⁽¹⁴⁾

1.2.6 Acetylcholinesterase activity ตามวิธีของ Ellman และ คณะ⁽¹⁵⁾

นำค่า Enzyme activity ที่ได้จากการทดสอบไปคำนวณหาค่า enzyme activity ต่อ 1 มก. โปรตีน ของพิษงู

2. ฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง

1. การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมี

เตรียมสารละลายพิษงูที่แยกส่วนแล้วให้มีความเข้มข้น 0.4 มก/มล โดยประมาณ โดยใช้ค่า Optical density ของแต่ละส่วนเป็นเกณฑ์ จากนั้นนำไปศึกษาปริมาณ โปรตีน และ enzyme activities

1.1 การวัดปริมาณ โปรตีน โดยวิธีของ Bradford⁽¹²⁾

สารเคมีที่ใช้

1. Quick StartTM 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 น้ำกลี้อ 0.9 %

วิธีทดสอบ

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

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

1.2 การศึกษา Enzyme activities

1.2.1 การศึกษา Proteolytic activity ตามวิธีของ Kunitz⁽¹³⁾

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. เติมสารละลายเพียง 0.1 มล ใน 2 มล ของ 1% casein ใน 0.25 M sodium phosphate buffer pH 7.75 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37^oซ นาน 30 นาที
2. เติม 5% trichloroacetic acid 2 มล
3. ปั่นที่ 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

1.2.2 การศึกษา Phosphodiesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan⁽¹¹⁾

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 MgSO₄
3. 0.17 M veronal buffer, pH 9.0

วิธีทดสอบ

1. เติมสารละลายพิษู 0.05 มล ในสารละลายผสมของ 0.25 มล 2.5 mM bis-*p*-nitrophenylphosphate Na salt, 0.15 มล 0.01 M MgSO₄ 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

1 U Phosphodiesterase activity = อัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยต่อนาที
ดังนั้น

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

1.2.3 การศึกษา Phosphomonoesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan⁽¹⁴⁾

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 MgSO₄
3. 0.5 M glycine buffer, pH 8.5

วิธีทดสอบ

1. เติม สารละลายพืษง 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 MgSO₄
2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37^oซ นาน 30 นาที
3. เติม 0.2 N Na OH 1 มล ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที
4. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง หากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
5. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมาหา phosphomonoesterase activity จากนิยามว่า

$$1 \text{ U phosphomonoesterase} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น } 0.001 \text{ หน่วยต่อนาที}$$

(ที่ความยาวคลื่น 440 nm)

เนื่องจากการทดสอบบ่มตัวอย่างไว้ 30 นาที ดังนั้น

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

1.2.4 การศึกษา Phospholipase A activity ตามวิธีของ Tan และ Tan⁽¹⁴⁾

สารเคมีที่ใช้

1. CaCl₂ (Sigma® Lot. 86F-0677)
2. Deoxycholic acid, Sodium salt (Sigma® Lot. 74H0267, MW. 414.6)
3. NaOH (Merck Lot.8586818)
4. Phospholipase A₂ 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

สารละลายที่ใช้

1. Substrate ไข่แดง 1 ส่วน 18 mM CaCl₂ 1 ส่วน และ 8.1 mM deoxycholic acid 1 ส่วน ปั่นแยกตะกอนที่ 4°C ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที 20 นาที ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 1 N NaOH
2. Titrant 0.02 N NaOH
3. Standard เติมน้ำ standard enzyme ให้มี enzyme activity 116.34 หน่วย Lecitase/มล(1:100)

วิธีทดสอบ

1. ปิปลด์ substrate 15 มล ใส่ในบีกเกอร์ วางบน magnetic stirrer
2. จุ่ม pH probe ลงในตัวอย่าง ปิดฝาบีกเกอร์ ปรับ pH ก่อน titrate ให้ได้ 8.0 ± 0.01 ด้วย 0.02 N NaOH
3. เปิดก๊าซไนโตรเจน เติมน้ำ standard enzyme หรือ สารละลายพิษ 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 A₂ activity ของตัวอย่างจากปริมาตรเฉลี่ย 0.02 N NaOH ที่ใช้ ไตเตรทตัวอย่างเทียบกับปริมาตรเฉลี่ย 0.02 N NaOH ที่ใช้ไตเตรท standard enzyme ที่มี enzyme activity 116.34 หน่วย/มล

จากสูตร

phospholipase A₂ activity ของตัวอย่าง

$$= \frac{\text{ปริมาตร } 0.02 \text{ N NaOH ที่ใช้โคเตรท ตัวอย่าง} \times \text{enzyme activity ของ standard enzyme}}{\text{ปริมาตร } 0.02 \text{ N NaOH ที่ใช้โคเตรท standard enzyme}}$$

1.2.5 การศึกษา L-Amino acid oxidase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan⁽¹⁴⁾

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 สารละลายพิษณุ 0.05 มล
3. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 426 nm 3 นาทีแต่ละตัวอย่างซ้ำ 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

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

1.2.6 การศึกษา Acetylcholinesterase activity Ellman และ คณะ⁽¹⁵⁾

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.
แ้วเติม 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 มคต (μl) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm เมื่อค่าการดูดกลืนแสงคงที่ เปิดฝา photocell เพื่อให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ถูกตัดเป็นศูนย์
3. เติม substrate (acetylthiocholine iodide, 0.075 M) 10 มคต (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/นาฬิกา/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)

2. การศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง

การเตรียมเซลล์

เลี้ยงเซลล์ Human Gastric carcinoma (KATO-III), Human Ductal carcinoma (BT 474), Human Colon adenocarcinoma (SW620), Human Liver hepatoblastoma (Hep-G₂), Human Lung undifferentiated (Chago) ในอาหาร RPMI 1640 ที่ผสม fetal bovin serum 5 % บ่มที่ 37 °C 5% CO₂ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นดูด media เดิม 0.05 % Trysin ที่มี 0.01% EDTA ปริมาตร 2 ml ตั้งทิ้งไว้จนเซลล์หลุด จึงดูด trypsin ที่งัดแล้วเติม media ใหม่ เคาะให้เซลล์หลุดเป็นเซลล์เดี่ยว

การศึกษาความเป็นพิษของพิษงูต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxicity)^(16,17,18,19)

1 เตรียมเซลล์ข้างต้นให้เจือจางด้วย RPMI 1640 ได้ความเข้มข้น 2.5×10^4 เซลล์/ml ปริมาตร 200 μ l ใส่ใน plate 96 well แต่ละหลุม บ่มที่ 37 °C 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2 เติมพิษงูที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 2 μ l ต่อหลุม ทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

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

4 เติม 100 % DMSO (dimethylsulfoxide) ปริมาตร 150 μ l ต่อหลุม เขย่าบน plate mixer 5 นาที

5 เติม 0.1 M glycine pH 10.5 ปริมาตร 25 μ l ต่อหลุม เขย่านาน 5 นาที

6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

การคำนวณผล

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

Inhibitory concentration 50 % (IC50) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งใน ระดับห้องทดลองที่ 50% คำนวณจากกราฟที่พล็อตจาก % cell survival ของสารทดสอบที่ความเข้มข้น ต่างๆ

ผลการวิจัย (Results)

1. คุณลักษณะทางชีวเคมี

1.1 การวัดปริมาณ โปรตีน โดยวิธีของ Bradford⁽¹²⁾

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้ของ fraction เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

Fraction	Protein Conc.(mg/ml) (BSA equi.)
1	0.77
2	0.54
3	0.67
4	0.75
5	0.71
6	0.65
7	0.67
Crude	1.01

1.2 การศึกษา Enzyme activities

1.2.1 Proteolytic activity ของ fraction ตามวิธีของ Kunitz⁽¹⁵⁾ (ตารางที่ 2)

Fraction No.	Protein mg/ml (BSA equ.)	Enzyme Activity (unit/mg protein)
1	0.77	0.3628
2	0.54	0.6432
3	0.67	0.3234
4	0.75	1.6231
5	0.71	0.3014
6	0.65	0.6831
7	0.67	0.3204
Crude	1.01	1.4449

1.2.2 Phosphodiesterase activity ของ fraction ตามวิธีของ Tan และ Tan⁽¹⁴⁾ (ตารางที่ 3)

Fraction No.	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity (unit/mg protein)
1	-	-
2	0.54	29.63
3	0.67	183.58
4	0.75	38.67
5	0.71	53.52
6	0.65	27.69
7	-	-
Crude	1.01	234.65

1.2.3 Phosphomonoesterase activity ของ fraction ตามวิธีของ Tan และ Tan⁽¹⁴⁾ (ตารางที่ 4)

Fraction No.	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity (unit/mg protein)
1	0.77	15.53
2	0.54	22.47
3	0.67	17.41
4	0.75	148.24
5	0.71	305.07
6	0.65	68.00
7	0.67	23.52
Crude	1.01	184.51

1.2.4. Phospholipase A activity ของ fraction ตามวิธีของ Tan และ Tan⁽¹⁴⁾ (ตารางที่ 5)

Fraction No.	Protein mg/ml (BSA equ.)	Enzyme Activity (L.unit/mg protein)
1	0.77	43.64
2	0.54	34.85
3	0.67	139.52
4	0.75	179.88
5	0.71	61.56
6	0.65	76.96
7	0.67	1702.48
Crude	1.01	294.79

1.2.5 L-Amino acid oxidase activity ของ fraction ตามวิธีของ Tan และ Tan⁽¹⁴⁾ (ตารางที่ 6)

Fraction No.	Protein mg/ml (BSA equ.)	Enzyme Activity (unit/mg protein)
1	0.77	77.92
2	-	-
3	-	-
4	0.75	546.67
5	0.71	13926.76
6	-	-
7	-	-

1.2.6 Acetylcholinesterase activity ของ fraction ตามวิธีของ Ellman และ คณะ⁽¹⁵⁾ (ตารางที่ 7)

Fraction No.	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity <i>mmol/min/g</i>
1		-
2	-	-
3	-	-
4	0.75	0.0125
5	0.71	0.1449
6	0.65	0.3312
7	0.67	0.0539
Crude	1.01	0.2230

ตารางที่ 8 สรุปผลการศึกษาปริมาณ โปรตีน และ enzyme activity ของ fraction

Fraction No.	Protein mg/ml (BSA equi.)	Proteolytic Activity (unit)*	PDE Activity (unit)*	PME Activity (unit)*	PLA Activity (L. unit)**	LAAO Activity (unit)*	AChE Activity (unit)*
1	0.77	0.3628	-	15.53	43.64	77.92	-
2	0.54	0.6432	29.63	22.47	34.85	-	-
3	0.67	0.3234	183.58	17.41	139.52	-	-
4	0.75	1.6231	38.67	148.24	179.88	546.67	0.0125
5	0.71	0.3014	53.52	305.07	61.56	13926.76	0.1449
6	0.65	0.6831	27.69	68.00	76.96	-	0.3312
7	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

LAAO L-Amino acid oxidase

AChE Acetylcholinesterase

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

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

2. การศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง

ผลของพืชงองอาจทั้ง 7 fractions ต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ Human Gastric carcinoma (KATA III), Human Duetol carcinoma (BT 474), Human Colon adenocacinoma (SW620), Human Liver hepatoblastoma (HEP-G₂), Human Lung undifferentiated (Chago) พบว่า fraction ที่ 5 มีผลต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด รวมทั้ง CH-liver ซึ่งเป็นเซลล์ตับปกติของคน fraction ที่ 6 มีผลต่อเซลล์ HEP-G2 และ SW620 ที่ความเข้มข้น 1.5I และ 0.78 ตามลำดับ แต่มีผลต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นที่ความเข้มข้นสูงกว่า ส่วน fraction ที่ 3 และ 4 มีผลต่อเซลล์มะเร็งเพียงเล็กน้อย และ fraction ที่ 1, 2 และ 7 ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ไม่มีผลต่อเซลล์ใดๆ

เมื่อเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของพืชงองอาจกับการออกฤทธิ์ของยา Doxorubicin ในแต่ละเซลล์มะเร็ง พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

สรุปผลการศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง (ตารางที่ 9)

Cells	IC ₅₀ (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	0.4
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	1.5
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	1.0

อภิปราย/วิจารณ์

การศึกษา enzyme activity พบว่าบาง enzyme activity พบในทั้ง 7 ส่วนของพิษงูจงอางที่แยกได้ 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

การศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งพบว่า fraction ที่น่าสนใจต่อการนำไปศึกษา Cytotoxicity ต่อไป คือ fraction ที่ 5

สรุป และ เสนอแนะ

จากความแตกต่างของ enzyme activity ที่พบในแต่ละส่วนของพิษงูที่แยกได้ การที่จะนำพิษงูส่วนที่แยกได้ส่วนใดไปศึกษาต่อขึ้นอยู่กับ enzyme activity ที่สนใจ ส่วนฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง ควรศึกษาต่อใน fraction ที่ 5 แต่หากต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง enzyme activity กับฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง ควรทำการแยก fraction ที่ 5 ซึ่งมี phosphomonoesterase และ L-amino acid oxidase activity เด่นต่อ เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นสำหรับการทดสอบ

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Joubert F.J. Snake venom toxins: The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom. *Biochim Biophys Acta* 1973;317:85-98.
2. Tan NH, Saifuddin MN. Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom and venom fractions. *Toxicon* 1989;27(6):689-695
3. Chang C, Huang T, Kuo K, Chen S, Huang K, Chiou S. Sequence characterization of a novel α -neurotoxin from the king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 191(1):214-223.
4. Lin S, Chang L, Chang C. Disulfide isomers of α -neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254:104-108.
5. Chang L, Liou J, Lin S, Huang H. Purification and characterization of a neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hanna* (king cobra) venom. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 294:574-578.
6. De P, Dasgupta SC, Gomes A. A lethal neurotoxic protein from Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Indian J Exp Biol.* 2002; 40(12):1359-64.
7. He YY, Lee WH, Zhang Y. Cloning and purification of alpha-neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon.* 2004; 44(3):295-303.
8. Stocker KF. Research, Diagnostic and Medicinal uses of snake venom enzymes. In: *Enzymes from snake venom.* Bailey GS (ed.). Colorado: Fort Collins. Alaken Inc., 1998: 705-36
9. Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, Jerusalinsky DA. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 1998; 36(11): 1635-40
10. Tan NH, Saifuddin MN. Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus Hannah* (king cobra) venom and venom fractions. *Toxicon* 1989; 27(6): 689-95.
11. Tan NH, Saifuddin MN. Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Ophiophagus Hannah* (king cobra). *Toxicon* 1990; 28(4): 385-92.
12. 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
13. Kunitz M. (1946) Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. II. General Properties.

J.Gen. Physiol.; 30: 291-310

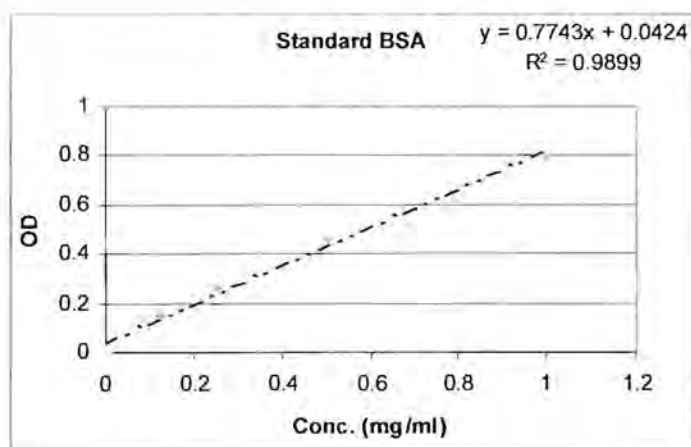
14. Tan NH. and Tan CS. (1988) A Comparative Study of Cobra (*Naja*) Venom Enzymes. Comp. Biochem. Physiol.; 90B,4: 745-50
15. Ellman GL., Courtney KD., Andres V.Jr. and Featherstone RM. (1961) A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochem. Pharmacol., 7: 88-95
16. Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Mitchell, B. (1987) Evaluation of tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Research, 47 (4): 933-942.
17. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol.Methods, 65:55-63.
18. Zhang, L., and Wei, L.J. (2007) ACTX, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. Life sciences, 80: 1189-1197.
19. Debnath, A., Chatterjee, U., Das, M., Vedasiromoni, J.R., and Gomes, A. (2007) Venom of Indian monocellate cobra and Russell's viper show anticancer activity in experimental models. J. Ethnopharmacology, 111: 681-684.

ภาคผนวก (Appendix)

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

	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

รูปที่ 1. กราฟความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง และ ปริมาณโปรตีนของโปรตีนมาตรฐาน (BSA)



ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสง และ ปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้ของ fraction

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

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสง และ Proteolytic activity ที่คำนวณได้ของ fraction

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)

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสง และ Phosphodiesterase activity ที่คำนวณได้ของ fraction

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	-		-	-	-
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)

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสง และ Phosphomonoesterase activity ที่คำนวณได้จาก fraction

Fraction No.	Tube No.	OD	Vol ml	Δ Absorbance			Average Δ Absorbance 30min	Average Δ Absorbance min	Protein mg/ml (BSA equ.)	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)

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสง และ Phospholipase A activity ที่คำนวณได้จาก fraction

Fraction No.	Tube No.	OD	Vol ml	Sample vol. (μl)	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

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสง และ L-Amino acid oxidase activity ที่คำนวณได้ของ fraction

Fraction No.	Tube No.	OD	Vol ml	Δ Absorbance		Average	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity (unit/mg protein)
						Δ Absorbance		
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)

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสง และ Acetylcholinesterase activity ที่คำนวณได้จาก fraction

Fraction No.	Tube No.	OD	Vol. ml	Δ Absorbance		Average Δ Absorbance	Protein mg/ml (BSA equi.)	Enzyme Activity mmol/min/g
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

ประวัตินักวิจัย และ คณะ

หัวหน้าโครงการ	นาง พรรณีภา จุลสุคนธ์
คุณวุฒิ	ภ.บ. (เกียรตินิยมอันดับสอง), ภ.ม. (เภสัชกรรม), M. Pharm. Sci.
ตำแหน่ง	ผู้เชี่ยวชาญเภสัชกร 8
สถานที่ทำงาน	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
โทรศัพท์	02-2520161-4 ต่อ 162
โทรสาร	02-2540212
E-mail	pannipa_e@yahoo.com
ผลงานวิจัย	

1. Pakmanee N., Khow O., Chanhome L., Aeksowan S., Chulasugandha P. and Sitprijia V. (2003) Cross-Reactivity of Antivenom. *Journal of Toxicology Toxin Reviews* 22 (1): 91-113
2. Chulasugandha P., Khawplod P., Havanond P. and Wilde H. (2006) Cost comparison of rabies pre-exposure vaccination with post-exposure treatment in Thai children. *Vaccine* 24: 1478-1482

ผู้ร่วมโครงการวิจัย	นางสาว อรวรรณ แซ่โศ้ว
คุณวุฒิ	วท.บ. (ชีววิทยา), วท.ม. (เคมีชีวภาพ)
ตำแหน่ง	ผู้ชำนาญการพิเศษ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 7
สถานที่ทำงาน	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
โทรศัพท์	02-2520161-4 ต่อ 182
โทรสาร	02-2540212
E-mail	qsmikhow@yahoo.com
ผลงานวิจัย	

1. Yanoshita R, Ogawa Y, Murayama N, Omori-Satoh T, Saguchi K, Higuchi S, Khow O, Chanhome L, samejima Y, Sitprijia V. (2006) Molecular cloning of the major lethal toxins from two kraits (*Bungarus flaviceps* and *Bungarus candidus*). *Toxicon* 47: 416-424.
2. Khow O, Chanhome L, Omori-Satoh T, Ogawa Y, Yanoshita R, Samejima Y, Kuch U, Mebs D, Sitprijia V. (2003) Isolation, toxicity

and amino terminal sequences of three major neurotoxins in the venom of Malayan krait (*Bungarus candidus*) from Thailand. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 134(6): 799-804.

3. Chanhom L, Khow O, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2003) Antihemorrhagin in the blood serum of king cobra (*Ophiophagus hannah*): purification and characterization. *Toxicon* 41(8): 1013-1019.
4. Sriprapat S, Aeksowan S, Sapsutthipas S, Chotwiwatthanakun C, Suttijitpaisal P, Pratanaphon R, Khow O, Sitprija V, Ratanabanangkoon K. (2003) The impact of a low dose, low volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand. *Toxicon* 41(1): 57-64.
5. Chanhom L, Khow O, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2002) Capacity of Thai green pit viper antivenom to neutralize the venoms of Thai *Trimeresurus* snakes and comparison of biological activities of these venoms. *Journal of Natural Toxins* 11(3): 251-259.
6. Khow O, Chanhom L, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2002) Isolation of the major lethal toxin in the venom of *Bungarus flaviceps*. *Toxicon* 40(4): 463-469.
7. Khow O, Chanhom L, Omori-Satoh T, Puempunpanich S, Sitprija V. (2002) A hemorrhagin as a metalloprotease in the venom of *Trimeresurus purpureomaculatus*: purification and characterization. *Toxicon* 40(4): 455-461.
8. Win-Aung, Pakmanee N, Khow O, Nambut C, Sitprija V. (2001) Cross neutralization of the lethal activities of Myanmar and Thai Russell's viper venoms by Thai and Myanmar antivenoms. *Journal of Natural Toxins* 10(4):335-342.
9. Khow O, Chanhom L, Omori-Satoh T, Sitprija V. (2001) Effectiveness of Thai cobra (*Naja kaouthia*) antivenom against sea snake (*Lapemis hardwickii*) venom: verification by affinity purified F(ab')₂ fragments. *Journal of Natural Toxins* 10(3):249-253.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นาง กุจิตรตรา ขุนทรัพย์
 คุณวุฒิ วท.บ. (ชีววิทยา), วท.ม. (จุลชีววิทยาประยุกต์)
 ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
 สถานที่ทำงาน สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
 โทรศัพท์ 02-2520161-4 ต่อ 161
 โทรสาร 02-2540212
 E-mail sthaitumnas@yahoo.com

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นาง โสภิต ชรรมอารี
 คุณวุฒิ ภ.บ. (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง), วท.ม. (เภสัชวิทยา)
 ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์
 สถานที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 โทรศัพท์ 02-2511965, 02-2564481, 08-13149250
 โทรสาร 02-2511965, 02-2564481
 E-mail sopit.t@chula.co.th
 ผลงานวิจัย

โครงการที่ 7

โครงการบริหารจัดการ การพิมพ์รายงาน และการ
ถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัยการพัฒนา
จากพิษงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก

ADMINISTRATION, REPORT PRINTING
AND TECHNOLOGY TRANSFER
OF THE RESEARCH PROGRAM
ON DRUG DEVELOPMENT
FROM THE VENOM OF KING KOBRA
(*OPHIOPHAGUS HANNAH*):
THE PRECLINICAL STUDIES

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานประมาณ ที่พิจารณาอนุมัติทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2549 ปี พ.ศ. 2550 และปี พ.ศ.25451

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์กิตติคุณ นายแพทย์วิศิษฎ์ สิตปรีชา ผู้อำนวยการสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่กรุณาวิพากษ์ผลงานวิจัย และขอขอบพระคุณคณะแพทยศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยของคณะผู้วิจัยในสังกัด

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ ผู้เข้าร่วมการประชุมรเสนองานวิชาการ เพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยี และได้อภิปราย เสนอความคิดเห็นที่เป็นประโยชน์

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ข
บันทึกอนุมัติจัดการประชุมวิชาการ	1 หน้า
โครงการเสนอผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี	1-4
รายนามผู้ลงทะเบียนเข้าประชุม	4 หน้า
สรุปประเมินผลจากผู้เข้าประชุม	1 หน้า
บทวิพากษ์	1 หน้า
บทคัดย่อการเสนอผลงาน	
โครงการที่ 1 การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน	A01
โครงการที่ 2 การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	A02
โครงการที่ 3 การวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	A03
โครงการที่ 4.1 การศึกษาเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	A04.1
โครงการที่ 4.2 การศึกษาพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	A04.2
โครงการที่ 5 การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	A05
โครงการที่ 6 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่แยกส่วนเพื่อหาส่วนที่มีศักยภาพเป็นประโยชน์ทางการรักษา	A06
การนำเสนอผลงานด้วย Power Point Presentation	
โครงการที่ 1 การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน	
โครงการที่ 2 การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	
โครงการที่ 3 การวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	
โครงการที่ 4.1 การศึกษาเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์	

ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

โครงการที่ 4.2 การศึกษาพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์
ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

โครงการที่ 5 การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้ง
ปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

โครงการที่ 6 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่แยกส่วนเพื่อหา
ส่วนที่มีศักยภาพเป็นประ โยชน์ทางการรักษา



อำนาจ

บันทึกข้อความ

รายงานการประชุม
 วันที่ 20/๒/๕๒
 วันที่ 22 ธ.ค. 2551
 เวลา 1.30 น.

ส่วนงาน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร. 02-2564463 โทรสาร. 02-2524963

ที่ ศบ 0512.13/ 2901 วันที่ 18 ธันวาคม 2551

เรื่อง ขออนุมัติจัดโครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัย...
 การพัฒนาจากพิษงูเอง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก

ภาควิชาดัดนิสัยวิชา
 เลขที่ 26/1
 วันที่ 11/1/2552
 กว. 2552

เรียน รองอธิการบดี (รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจษฎา แสงสุพรรณ)

ด้วย ภาควิชาเภสัชวิทยา ร่วมกับฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถานเสาวภา ตทกทชช.ไทย กำหนดจัดโครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัย การพัฒนาจากพิษงูเอง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก ในวันที่ 17 มีนาคม 2552 ณ ห้อง 301 ตึกอำนวยการ ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ นักวิจัยและผู้สนใจจากสถาบันต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชนได้รับทราบผลงานวิจัย มติจากที่ประชุมคณะกรรมการบริหารคณะแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 22/2551 วันที่ 22 ธันวาคม 2551

อนึ่ง ผู้เข้าร่วมการอบรม จำนวน 110 คน ประกอบด้วย นักวิจัย และผู้สนใจ จากสถาบันต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน และคณะผู้ร่วมวิจัยและนิสิตในหลักสูตรมหาบัณฑิต โดยไม่ต้องชำระค่าลงทะเบียน เนื่องจากใช้งบประมาณจากทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2551 ของแผนงานงานวิจัยการพัฒนาจากพิษงูเอง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก เป็นจำนวนเงิน 47,500.00 บาท ดังรายละเอียดของโครงการที่แนบมาพร้อมกันนี้

ในการนี้ คณะแพทยศาสตร์ จึงใคร่ขอเสนอเพื่อโปรดพิจารณาดำเนินการ

1. นำเสนอขออนุมัติที่ประชุมคณบดี
2. นำเสนอเพื่อขออนุมัติจัดการประชุม และขออนุมัติให้ข้าราชการที่เกี่ยวข้องเข้าประชุม

ได้โดยไม่มีถือเป็นวันลา และมีสิทธิ์เบิกค่าใช้จ่ายอื่นๆ ตามระเบียบของทางราชการจากต้นสังกัด ทั้งนี้ เมื่อได้รับอนุมัติจากผู้บังคับบัญชาแล้ว

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติและดำเนินการต่อไปด้วย จักเป็นพระคุณยิ่ง

เรียน รองอธิการบดี (รศ. นพ.เจษฎา แสงสุพรรณ)

เพื่อโปรดอนุมัติให้จัดสรรคณบดี

Okom

22 ธ.ค. 2551

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ประสงค์ สิริวิริยะกุล)

รองคณบดีฝ่ายบริหาร

ปฏิบัติการแทนคณบดี

มติคณบดีครั้งที่ 1/2552 (รวม 52) ของคณบดี

Okom

7 ธ.ค. 2551

24 ธ.ค. 51

Okom

มติสภามหาวิทยาลัยครั้งที่ 710 (29 ธ.ค. 52)

Okom

11-20 01-11-51

**โครงการเสนอผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัย
การพัฒนายาจากพิษงูจงอาง: การศึกษาระยะก่อนคลินิก
จัดโดย ฝ่ายวิจัย และ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ร่วมกับ สถาบันเสาวภา สภากาชาดไทย
วันอังคารที่ 17 มีนาคม 2552
ณ ห้องประชุม 301 ตึกอำนวยการ ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

หลักการและเหตุผล

สารจากธรรมชาติเป็นแหล่งค้นหา (Drug Discovery) ที่สำคัญที่สุด นอกจากการค้นหาสารที่มีศักยภาพทางยาจากพืชแล้ว มีการค้นหา antibiotics จากจุลชีพ นำมาใช้ประโยชน์ในการฆ่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น สารพิษจากแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* (Botulinum toxin) ถูกนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ โดยอาศัยฤทธิ์ที่ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และถูกนำมาใช้ด้านความงามโดยใช้ลดรอยเหี่ยวย่น ทำให้ผิวหนังตึงเรียบ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจจนมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการเสริมความงาม มีการค้นหาจากพิษงูเช่นกัน ยาตัวแรกที่ประสบความสำเร็จ โดยการพัฒนาจากพิษงู *Bothrops jararaca* คือ ACE inhibitor : captopril ซึ่งเป็น bradykinin potentiating peptides ปัจจุบันนักวิจัยสนใจค้นหาจากพิษงู 2 กลุ่มด้วยกัน ได้แก่ พิษงูที่มีพิษต่อระบบโลหิต มีนักวิจัยสนใจค้นหาเพื่อใช้เป็นยาด้านการจับตัวเป็นลิ่มเลือด ส่วนพิษงูที่มีพิษต่อระบบประสาท ก็อาจมีคุณสมบัติคล้ายกับ botulinum toxin คือมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ จึงควรพัฒนาเพื่อนำมาใช้เป็นยารักษาโรค และใช้ทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

คณะผู้วิจัยของคณะแพทยศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ร่วมงานกับคณะผู้วิจัยจากสถาบันเสาวภา สภากาชาดไทย เพื่อพัฒนายาจากพิษงูจงอาง ซึ่งเป็นงูพิษขนาดใหญ่ที่สุด มีปริมาณพิษมาก และทางสถาบันเสาวภาสามารถทำการเพาะเลี้ยงงูจงอางได้ แผนงานวิจัยมีระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2549 ถึงปีงบประมาณ 2551 เมื่อคณะผู้วิจัยดำเนินงานวิจัยเสร็จเรียบร้อยแล้วสมควรเผยแพร่ผลงานวิจัย และถ่ายทอดเทคโนโลยี ให้กลุ่มผู้สนใจที่จะนำผลการวิจัย ไปศึกษาและผลิตทางอุตสาหกรรมขั้นต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 2.1 เพื่อให้ นักวิจัย และผู้สนใจจากสถาบันต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชนได้รับทราบผลงานวิจัย
- 2.2 เพื่อให้ นักวิจัย และผู้สนใจรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีได้ติดต่อร่วมงานกับคณะผู้วิจัยต่อไป
- 2.3 รับฟังการวิพากษ์ และความคิดเห็นจากผู้เข้าร่วมการประชุม

3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

- 3.1 ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.2 ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สาธารณสุข
- 3.3 สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
4. คุณสมบัติของผู้เข้าร่วมประชุม
 - 4.1 นักวิจัย และผู้สนใจ จากสถาบันต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน จำนวน 80 คน
 - 4.2 คณะผู้ร่วมวิจัยและนิสิตในหลักสูตรมหาบัณฑิต จำนวน 30 คน
5. ระยะเวลา
1 วัน วันอังคารที่ 17 มีนาคม 2552
6. สถานที่
ณ ห้องประชุม 301 ตึกอำนวยการ ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7. วิธีการ
 - 7.1 บรรยาย
 - 7.2 อภิปราย
8. ค่าลงทะเบียน
ไม่เก็บค่าลงทะเบียน
9. การประเมินผล
 - 9.1 แบบสอบถามความคิดเห็นผู้เข้าร่วมประชุม
 - 9.2 สังเกตจากผู้เข้าร่วมประชุม
10. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ
 - 10.1 นำผลงานวิจัยไปพัฒนาต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรค
 - 10.2 มีความร่วมมือระหว่างสถาบันในการพัฒนายาจากสารธรรมชาติ
11. งบประมาณ
ประมาณการรายรับ
เงินทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2551 งวดที่ 2 47,500.00 บาท
ของแผนงานวิจัยการพัฒนายาจากพืชงูจงอาง : การศึกษาระยะก่อนคลินิก
(ดูรายละเอียดงบประมาณในหน้าถัดไป)
ประมาณการรายจ่าย

หมวดค่าตอบแทน		3,200.00
ค่าตอบแทนผู้อภิปราย	2,000.00	
ค่าตอบแทนเจ้าหน้าที่ช่วยงาน	1,200.00	
และเจ้าหน้าที่คุมโสตทัศนอุปกรณ์ เหม่าจ่าย (6 คน x 200 บาท)		
หมวดค่าวัสดุ		16,000.00
เอกสารและอุปกรณ์ประกอบการประชุม (110 ชุด x 100 บาท)	11,000.00	
แผ่นบันทึกเสียงและภาพ และวัสดุสำนักงาน	5,000.00	
หมวดค่าใช้จ่าย		26,300.00
จัดสถานที่ประชุม	1,000.00	
ค่าอาหารว่าง และน้ำดื่ม (110 คน x 40 บาท x 2 มื้อ)	8,800.00	
ค่าอาหารกลางวัน (110 คน x 150 บาท x 1 มื้อ)	16,500.00	
หมวดค่าสาธารณูปโภค		2,000.00
ค่าโทรศัพท์ และไปรษณีย์	2,000.00	บาท
รวมประมาณการรายจ่าย		47,500.00
ประมาณการรายได้เหนือรายจ่าย		0.00

12. กำหนดการ

วันอังคารที่ 17 มีนาคม 2552

08:30 -09:00	ลงทะเบียนรับเอกสาร	
09:00 -09:15	พิธีเปิด	
	โดย ศาสตราจารย์ นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม รองคณบดีฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	
09:15-10:00	การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน	
	* QUALITY SPECIFICATION OF KING KOBRA (<i>OPHIOPHAGUS HANNAH</i>)	
	VENOM FOR STANDARDIZATION นฤมล หักมณี	
10:00-10:15	พัก	
10:15-11:00	การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	
	FRACTIONATION OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING	
	COMPOUND FROM VENOM OF KING KOBRA อรรพรรณ โค้ว	
	จรีพร น้อยพรหม	

- 11:00-12:00 การวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้ง
 ปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
 PROTEIN ANALYSIS OF THE NEUROMUSCULAR
 BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING KOBRA..... พลกฤษณ์ แสงวนิช
- 12:00 -13:00 อาหารกลางวัน
- 13:00-13:45 การศึกษาเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอาง
 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
 PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES OF
 THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE
 VENOM OF KING KOBRA..... ไสภิต ธรรมอารี
- 13:45-14:30 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่แยกส่วนเพื่อหาส่วน
 ที่มีศักยภาพเป็นประโยชน์ทางการรักษา
 STUDIES OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF FRACTIONATED
 VENOM OF KING KOBRA FOR POTENTIAL THERAPEUTIC
 AGENTS..... พรรณีภา จุลสุคนธ์
 สุจิตรรตรา ไทยทำนัส
 อูษา ฤกษ์สิริกุล
- 14:30-14:45 พัก
- 14:45-15:30 การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลาย
 ประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
 CLONING OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND
 FROM THE VENOM OF KING KOBRA อรรรณ โค้ว
 สุนชชา สุนทรารชุน
 ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์
- 15:30-16:30 วิพากษ์ และอภิปราย
 โดย ศาสตราจารย์กิตติคุณ นายแพทย์วิศิษฎ์ สิตปรีชา ผู้อำนวยการ สถาบันเลวภา สมาคมชาติไทย
- 16:30 พิธีปิด
 โดย รศ. ไสภิต ธรรมอารี หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา

คำกล่าวรายงานการจัดประชุมวิชาการ

โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

เรื่อง การพัฒนายาจากพิษงูจงอาง: การศึกษาระยะก่อนคลินิก

จัดโดย ฝ่ายวิจัย และ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ร่วมกับ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

วันที่ 17 มีนาคม 2552

สารจากธรรมชาติเป็นแหล่งค้นหา (Drug Discovery) ที่สำคัญที่สุด นอกจากการค้นหาสารที่มีศักยภาพทางยาจากพืชแล้ว มีการค้นหา antibiotics จากจุลชีพ นำมาใช้ประโยชน์ในการฆ่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น สารพิษจากแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* (Botulinum toxin) ถูกนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ โดยอาศัยฤทธิ์ที่ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และถูกนำมาใช้ด้านความงามโดยใช้ลดรอยเหี่ยวย่น ทำให้ผิวหนังตึงเรียบ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจจนมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการเสริมความงาม มีการค้นหาจากพิษงูเช่นกัน ยาตัวแรกที่ประสบความสำเร็จโดยการพัฒนาจากพิษงู *Bothrops jararaca* คือ ACE inhibitor : captopril ซึ่งเป็น bradykinin potentiating peptides

ปัจจุบันนักวิจัยสนใจค้นหาจากพิษงู 2 กลุ่มด้วยกัน ได้แก่ พิษงูที่มีพิษต่อระบบโลหิต มีนักวิจัยสนใจค้นหาเพื่อใช้เป็นยาต้านการจับตัวเป็นลิ่มเลือด ส่วนพิษงูที่มีพิษต่อระบบประสาท ก็อาจมีคุณสมบัติคล้ายกับ botulinum toxin คือมีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ จึงควรพัฒนาเพื่อนำมาใช้เป็นยารักษาโรค และใช้ทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

คณะผู้วิจัยของคณะแพทยศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ร่วมงานกับคณะผู้วิจัยจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย เพื่อพัฒนายาจากพิษงูจงอาง ซึ่งเป็นงูพิษขนาดใหญ่ที่สุด มีปริมาณพิษมาก และทางสถานเสาวภาสามารถทำการเพาะเลี้ยงงูจงอางได้ แผนงานวิจัยมีระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2549 ถึงปีงบประมาณ 2551 เมื่อคณะผู้วิจัยดำเนินงานวิจัยเสร็จเรียบร้อยแล้ว สมควรเผยแพร่ผลงานวิจัย และถ่ายทอดเทคโนโลยี ให้กลุ่มผู้สนใจที่จะนำผลการวิจัย ไปศึกษาและผลิตทางอุตสาหกรรมขั้นต่อไป

รายนามผู้ลงทะเบียน

โครงการเสนอผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัย

การพัฒนาจากพิษงูจาง: การศึกษาระยะก่อนคลินิก

จัดโดย ฝ่ายวิจัย และ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

วันอังคารที่ 17 มีนาคม 2552

ณ ห้องประชุม 304 ตึกอำนวยการ ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่	ชื่อ-นามสกุล	สถาบัน	โทรศัพท์-โทรสาร	E-mail	ลงนาม
1	ศ.กิตติคุณ นพ.วิศิษฎ์ ลิตปรีชา	ผู้อำนวยการสถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4309		
2	รศ.โสภิต ธรรมอารี	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	02-251-1965, 02-256-4481 081-314-9250	Sopit.t@chula.ac.th	
3	รศ.ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ			
4	ผศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ			
5	นฤมล พักมณี	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext 181	npakmanee@yahoo.com	
6	พรรณนิภา จุลสุคนธ์	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext 182	pannipa_c@yahoo.com	
7	จรีพร น้อยพรหม	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext 162		
8	อรรวรรณ ด้วง	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext 162		
9	สุนุชชา สุนทรารชุน	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext 181		
10	สุจิตรรดา ไทยทำนัส	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext 181		
11	อุษา ฤกษ์สิริกุล	สหสาขาเภสัชวิทยา จุฬาฯ	02-256-4481, 086-504-1496		
12	พญ. สุขมา โชคสุวัฒนสกุล	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	02-251-1965, 02-256-4481	สุขมา โชคสุวัฒนสกุล @ yahoo co.th	
13	นส.พ.ชาญนรงค์ มิตรมูลพิทักษ์	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		

ที่	ชื่อ-นามสกุล	สถาบัน	โทรศัพท์-โทรสาร	E-mail	ลงนาม
14	อ.พญ. ดวงเพ็ญ ธีระบัญชาศักดิ์	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	081-821 8762	drduangpen@hotmail.com	
15	วันดี เข็มศรี	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	02-251-19 65, 02-256-4481	wkhemsri@yahoo.com	
16	นางนุช ภาวร	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	02-251-1965, 02-256-4481	jacknuch@hotmail.com	
17	รศ.สพญ.ดร. อนงค์ บิณฑวิหค	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	081-935-9 Ext587	Anong_vet@yahoo.com	
18	นายสุรพล คงทิม	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล	089-105-9 Ext485	sesco@staff2mahidol.ac.th	
19	นายพัทธดนย์ สุขพันธ์	หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงู พิษกัด	02-256-4000 Ext 3567	pattadon@hotmail.com	
20	นส. ธัญณิชา อ่อนดี	หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงู พิษกัด	02-256-4000 Ext 3567	kungsoon@yahoo.com	
21	นส. อลิษา จันทร์ปี	หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	02-256-4000 Ext 3567	su@junpee@yahoo.com av-junpee@yahoo.com	
22	นส. วิวรพรรณ สรรพประเสริฐ	หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	02-256-4000 Ext 3567	vivorpun@yahoo.com	

รายนามผู้ลงทะเบียน

โครงการเสนอผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัย

การพัฒนายาจากพิษงูจงอาง: การศึกษาระยะก่อนคลินิก

จัดโดย ฝ่ายวิจัย และ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

วันอังคารที่ 17 มีนาคม 2552

ณ ห้องประชุม 304 ตึกอำนวยการ ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (หน้า 3)

ที่	ชื่อ-นามสกุล	สถาบัน	โทรศัพท์-โทรสาร	E-mail	ลงนาม
23	ดร. ทรงศรี เกษมพิมลพร	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
24	สุนันทา เพิ่มพูนพานิช	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
25	วชิราภรณ์ แสงสีลม	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
26	อาธิกยา สว่างศรี	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
27	ดร. ผกามาศ ขาวปลอด	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
28	น.สพ. สุรศักดิ์ เอกโสมวรรณ	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
29	น.สพ. สุรสีห์ อุ่ยสุวรรณ	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
30	เพชรจินต์ ขวัญเพชร	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
31	น.สพ. วีระ เทพสุเมธานนท์	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
32	น.สพ. บุญเลิศ ล้ำเลิศเดชา	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
33	น.สพ. มนตรี เขียวบำรุงเกียรติ	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext		
34	น.สพ. ลาวณิชย์ จันทโรม	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext	lchanthorn @ ysha.com	
35	น.สพ. ทักษะ เวสารัชชพงศ์	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	02-256-4329 Ext 142	tata.vst@hulmed.com	
36	ผกามาศ วงศ์เตย์	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ	02-256-4329 Ext		

รายนามผู้ลงทะเบียน

โครงการเสนอผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัย

การพัฒนาจากพิษงูจงอาง: การศึกษาระยะก่อนคลินิก

จัดโดย ฝ่ายวิจัย และ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

วันอังคารที่ 17 มีนาคม 2552

ณ ห้องประชุม 304 ตึกอำนวยการ ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (หน้า 4)

ที่	ชื่อ-นามสกุล	สถาบัน	โทรศัพท์-โทรสาร	E-mail	ลงนาม
37	อ.นพ.วสุวัฒน์ กิตติสมประมุข				
38	ส.พญ. นงนุช อัสวงค์เกษม	ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	080-200-3567	gee32vet@gmail.com	
39	ส.พญ. พนมพร แส่นประเสริฐ	ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	081-975-9191	panomporn110@yahoo.com	พนมพร แส่นประเสริฐ
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					

วิจารณ์งานเกี่ยวกับพิษของงูจงอาง

1. เป็นการศึกษาที่น่าสนใจเนื่องจากมีการศึกษาเรื่องนี้น้อย จึงมีศักยภาพในการทำการวิจัยได้ในลักษณะ descriptive ในหลาย ๆ ด้าน
2. ผลการศึกษาในด้าน action ของ neurotoxin ไม่แตกต่างจากงานที่ผู้อื่นทำมาแล้ว เป็น postsynaptic action
3. Effect ในด้าน anticancer property สามารถเปิดทางไปสู่การศึกษาที่กว้างขึ้นและจะต้องติดตามต่อไป
4. น่าจะศึกษาผลของพิษงูในด้าน hemodynamics ให้มากกว่านี้โดยศึกษา cardiac output และ systemic vascular resistance เปรียบเทียบกับงูเห่าซึ่งมีผู้ศึกษามาก่อนแล้ว ร่วมกับการศึกษา cytokines และ vasoactive mediators และควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงระยะยาวหลาย ๆ ชั่วโมง ไม่ใช่สังเกตในระยะสั้น การศึกษา cytokines, vasoactive mediator และ hemodynamics ในระยะยาว ยังเปิดกว้าง
5. Natriin จากพิษงูจงอาง น่าจะมีความใกล้เคียงกับ natriuretic peptide จาก green mamba ซึ่งทำให้เกิด natriuresis และ vasodilatation และมีผลในด้าน cancer โดย inhibit MEK 1/2, ERK 1/2 และ inhibit DNA synthesis น่าจะศึกษา natriin และ ophanin ให้มาก natriin มีบทบาทในการลด blood pressure และทำให้มี hemodynamic change โดยไม่ต้องอาศัย cytokines และ mediator, natriin พบในพิษของงูเห่าเหมือนกัน จะมีผลในด้าน natriuresis หรือไม่ ยังไม่มีการศึกษา

Reference

Vesely DL. Cardiac and renal hormones. Anticancer effects in vitro and in vivo. J Investig Med 2009 ; 57 : 22-28

สรุป ประเมินผลการเสนอผลงานวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีของแผนงานวิจัย

การพัฒนายาจากพิษงูจงอาง: การศึกษาระยะก่อนคลินิก

จัดโดย ฝ่ายวิจัย และ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ร่วมกับ สถาบันเสวภา สภาอากาศไทย

วันอังคารที่ 17 มีนาคม 2552 ณ ห้องประชุม 304 ตึกอำนวยการ ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
มีผู้ส่งแบบประเมิน 14 คน

มากที่สุด = 5 มาก = 4 ปานกลาง = 3 น้อย = 2 น้อยที่สุด = 1

ข้อ	หัวข้อประเมิน	จำนวนผู้ตอบ (คน)					เฉลี่ยคะแนน
		5	4	3	2	1	
1	ปริมาณเนื้อหาของผลงานวิจัยที่นำเสนอ						
	1.1 การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน	1	5	3			3.86
	1.2 การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	2	11	1			4.07
	1.3 การวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	2	10	2			4.0
	1.4 การศึกษาเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	1	11	1			4.07
	1.5 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่แยกส่วนเพื่อหาส่วนที่มีศักยภาพเป็นประโยชน์ทางการรักษา	2	11	1			4.07
	1.6 การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ	3	7	4			3.93
2	ความเหมาะสมของวิธีการวิจัย (research methods)	4	8	2			4.0
3	ผลงานวิจัยเป็นความรู้ใหม่	2	9	2			3.54
4	ผลงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปศึกษาต่อยอด	6	8				4.43
5	ประโยชน์ที่ได้รับจากผลงานวิจัยครั้งนี้	5	8	1			4.29
6	ความเหมาะสมของइटัทศนุปรกรณ์ สถานที่สิ่งอำนวยความสะดวก อาหาร ของว่าง	9	4	1			4.57

ขอขอบคุณที่แสดงความคิดเห็น

การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน

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

นฤมล พัทมณี¹, พรรณีภา จตุสุคนธ์¹, อรวรรณ แซ่โก้¹, สุจิตตรา ขุนทรัพย์¹
และ สพ.ญ. ลาวินัย จันทร์โฮม²,¹ ฝ่ายวิจัย และ พัฒนา,² ฝ่ายสวนงู สถานเสาวภา

บทคัดย่อ

พิษงูจงอางที่ใช้ในงานวิจัยได้จาก 2 แหล่ง จากเพชรบูรณ์ และ ภาคใต้ และ เลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันในส่วนงู และ ในโครงการเพาะเลี้ยงงู การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะด้านกายภาพ ชีวเคมี และ ชีววิทยา ของพิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) เพื่อ เป็นมาตรฐานของพิษงูจงอางที่จะใช้ศึกษาพัฒนาขา พบว่า พิษงูจงอาง จาก เพชรบูรณ์ มีความเป็นพิษสูงกว่าพิษของงูจงอางจากภาคใต้ และ สอดคล้องกับการทดสอบ Neurotoxicity ส่วนการศึกษา Enzyme activities พบว่าพิษงูจงอางที่เลี้ยงในส่วนงูมี Phosphomonoesterase และ Proteolytic activity สูงกว่าพิษงูจงอางจากโครงการเพาะเลี้ยงงู ในทางตรงกันข้าม พิษงูจงอางจากโครงการเพาะเลี้ยงงูมี L-amino acid oxidase activity สูงกว่าพิษงูจงอางที่เลี้ยงในส่วนงู การศึกษาด้านชีววิทยาอื่น พบว่าพิษงูจงอางไม่มี Coagulation activity และ พิษงูจงอางที่เลี้ยงในส่วนงูมี Hemolytic activity สูงกว่าพิษที่ได้จากงูที่เลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยงงู ส่วนการศึกษา Cytotoxicity พบว่าพิษงูจงอางจากโครงการเพาะเลี้ยงงูสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร ได้ดีกว่ายาต้านมะเร็ง (Doxorubicine) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ปอด และ ตับ ได้ใกล้เคียงกับยาต้านมะเร็ง ส่วนพิษงูจงอางที่เลี้ยงในส่วนงูมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่ำกว่าพิษงูจงอางที่เลี้ยงในโครงการเพาะเลี้ยงงู และ ยาต้านมะเร็ง เฉพาะเซลล์มะเร็งลำไส้ ที่พิษงูทุกกลุ่มสามารถยับยั้งการเจริญได้ใกล้เคียงกันแต่ต่ำกว่ายาต้านมะเร็ง

คำสำคัญ : protein pattern, king cobra, venom, *Ophiophagus hannah*

การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

FRACTIONATION OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM VENOM OF KING KOBRA

อรวรรณ ไคว่¹, จุรีพร น้อยพรม¹, โสภิต ธรรมอารี²

¹ฝ่ายวิจัย สถานเสาวภา สภากาชาดไทย, ²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาส่วนกึ่งบริสุทธิ์ของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ และกลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของส่วนกึ่งบริสุทธิ์ โดยทำการศึกษาใน phrenic nerve - hemi-diaphragm preparations ที่แยกได้จากกายหนูเมาส์ ซึ่งจะทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ผลการศึกษาพบว่าพิษงูจงอาง (crude) มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ ทำการแยกพิษงูจงอางโดยผ่านลงใน Q-Sepharose column สามารถแยกได้ 7 ส่วน (F1 - F7) F1 มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อดีที่สุดที่สุด นำ F1 มาแยกส่วนโดยผ่านลงใน Cellulofine GCL-1000 sf column ได้ 3 ส่วน (F1.1 - F1.3) F1.2 มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อดีที่สุดที่สุด จึงทำการแยก F1.2 โดยผ่านลงใน SP-Sepharose column ทำให้ได้ส่วนกึ่งบริสุทธิ์ 4 ส่วน (F1.2.1 - F1.2.4) ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ เวลาที่ใช้ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% inhibition) ของ crude venom (80 µg/ml), F1 (30.5 µg/ml), F1.2 (16.6 µg/ml), F1.2.1 (1.4 µg/ml), F1.2.2 (4.4 µg/ml), F1.2.3 (1.7 µg/ml) และ F1.2.4 (3.7 µg/ml) ได้แก่ 4.2 ± 0.1 , 4.6 ± 0.2 , 4.3 ± 0.3 , 30.7 ± 2.0 , 7.4 ± 0.4 , 12.8 ± 0.3 และ 9.5 ± 0.5 นาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าส่วนกึ่งบริสุทธิ์ F1.2.2 - F1.2.4 มีฤทธิ์ดี จึงนำมาศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้น พบว่าส่วนกึ่งบริสุทธิ์ทั้ง 3 ส่วนออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

คำสำคัญ : KING KOBRA, *OPHIOPHAGUS HANNAH*, NEUROMUSCULAR BLOCKING

ศกามาศ วงศ์เคย์ : องค์ประกอบ โปรตีนและฤทธิ์ทางชีวภาพของพิษงูจงอาง *Ophiophagus hannah*. (PROTEIN COMPOSITIONS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF KING COBRA (*Ophiophagus hannah*) VENOM)

อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช, 73 หน้า.

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพิษงูจงอางที่มีอายุและถิ่นกำเนิดที่ต่างกัน การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้เปรียบเทียบด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าพิษงู KV2 มีค่าความเป็นพิษสูงกว่า พิษงู KV6 และ KV9 การเปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนในพิษงูจงอางทั้ง 3 ตัวอย่าง ใช้อิเล็กโตรโฟรีซิสทีศทางเดียว, อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองทีศทางและโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส พบว่า องค์ประกอบโปรตีนของพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกัน แต่พิษงู KV2 มีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่นอย่างเห็นได้ชัดโดยศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพเสีย พบว่า KV2 มีแถบโปรตีนที่เข้มกว่า เช่นเดียวกับวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองทีศทาง พบว่า KV2 มีจุดโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล ต่ำกว่า 14.4 กิโลดาลตัน มากกว่า KV6 และ KV9 และมีบางจุดโปรตีนที่ไม่พบในอีก 2 ตัวอย่าง คือ จุดโปรตีนที่ 2 และ 4 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคเปปไทด์แมสแมพพบว่า เป็นโปรตีนในกลุ่มฟอสโฟไลเปส ส่วนในการศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส พบว่า ลำดับส่วนที่แยกได้จากพิษงู KV2 ใน acetonitrile ความเข้มข้นระหว่าง 31-50% มีความเข้มข้นโปรตีนสูงกว่าลำดับส่วนในช่วงเดียวกันของพิษงู KV6 และ KV9 จากผลทั้งหมดได้แสดงความแตกต่างทางด้านองค์ประกอบโปรตีนในพิษงูทั้ง 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสาเหตุความแตกต่างของความเป็นพิษของพิษงูแต่ละตัวอย่าง จากการแยกโปรตีนพิษงู KV2 ด้วยเทคนิคไอออนเอ็กซ์เชนจ์และเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี ได้ ลำดับส่วน 4 ลำดับส่วน คือ 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3 และ 1.2.4 จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า ลำดับส่วน 1.2.2 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ โปรตีนนาทริน (Natriin) จากพิษงูเห่า และ ลำดับส่วน 1.2.3 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ โปรตีน โอฟานิน (ophanin) จากพิษงูจงอาง และนาทริน จากพิษงูเห่า

A 04.1

การศึกษาเภสัชวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
 PHARMACOLOGICAL STUDIES OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND
 FROM THE VENOM OF KING KOBRA

โสภิต ธรรมอารี¹, จุรีพร น้อยพรหม², พรรณิพา จุลสุนทร², พญ. ดวงเพ็ญ ติระบัญญัติศักดิ์³, ชาญณรงค์
 มิตรมูลพิทักษ์²

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ²ฝ่ายวิจัย สถานเสาวภา สภากาชาด
 ไทย, ³ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ พิษงูเป็นแหล่งที่มาของยาบางชนิด งูจงอางเป็นงูพิษขนาดใหญ่ มีน้ำพิษปริมาณมาก ซึ่งมีพิษ
 ต่อระบบประสาท คณะผู้วิจัยได้แยกส่วนที่มีพิษยับยั้งปลายประสาทของกล้ามเนื้อกระบังลมหนูเม้าส์
 เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบประสาทและกล้ามเนื้อที่มีอาการเกร็ง
 ในขั้นตอนการพัฒนาจะต้องศึกษาฤทธิ์อื่นๆ ทางเภสัชวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลด้านความปลอดภัยก่อนจะ
 นำไปศึกษาในมนุษย์

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลาย
 ประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความปลอดภัยของสารที่จะพัฒนาเป็นยา

วิธีการศึกษา ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อระบบประสาทส่วนกลางในสัตว์ตัวทดลอง (in vivo) และ
 นอกตัวสัตว์ทดลอง (in vitro) ศึกษาฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางในหนูเม้าส์ และหนูแรท ต่อหัวใจ
 ที่แยกจากกายหนูแรท ต่อหลอดลมที่แยกจากกายหนูแรท ต่อทางเดินอาหารในหนูแรท ต่อลำไส้เล็ก
 ส่วนปลาย (ileum) ที่แยกจากกายหนูแรท

ผลการศึกษา ผลการศึกษาในสุนัขพบว่า crude venom ขนาด 0.05-0.1 mg/Kg และ F1.2.2 ขนาด 6-18
 µg/kg มีผลลดการทำหน้าที่ของไต (GFR, RPF) ลด urine flow crude venom ในขนาด 0.2 mg/Kg และ
 F1.2.2 ขนาด 54 µg/kg ทำให้สุนัขตาย F1.2.2 ในขนาด 0.1-0.4 LD50 ไม่มีผลต่อ motor coordination แต่
 ลดระยะเวลาการหลับ (righting reflex) ลดการบีบตัวของลำไส้เล็ก แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษา
 ในเนื้อเยื่อที่แยกออกจากกาย F1.2.2 ในความเข้มข้น 4.4 mcg/ml ไม่ยับยั้งฤทธิ์ของ agonists ได้แก่
 acetylcholine, Epinephrine, Norepinephrine ในเนื้อเยื่อทุกชนิด

สรุปผลการศึกษา F1.2.2 มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีความปลอดภัย และอาจนำไปใช้ทางยาได้

คำสำคัญ : KING KOBRA, *OPHIOPHAGUS HANNAH*, PHARMACOLOGICAL EFFECT

A 04.2

การศึกษาพิษวิทยาของสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
 TOXICOLOGICAL STUDIES OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM
 THE VENOM OF KING KOBRA

โสภิต ธรรมอารี¹, จวีพร น้อยพรหม², พรรณิภา จุลสุคนธ์², พญ. ดวงเพ็ญ ธิระบัญญัติ³

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ²ฝ่ายวิจัย สถานเสาวภา สภากาชาด
 ไทย, ³ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ กร

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความเป็นพิษของส่วนที่แยกได้จากพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ต่ออวัยวะสำคัญภายในร่างกาย (systemic toxicity test) แบบเฉียบพลัน (acute toxicity) พิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity) และศึกษาการก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity) เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความปลอดภัยของสารที่จะพัฒนาเป็นยา

วิธีการศึกษา ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลอง (in vivo) และนอกสัตว์ทดลอง (in vitro) ต่อระบบประสาทส่วนกลางในหนูถีบจักรและหนูขาว ต่อหัวใจที่แยกจากกายหนูขาว ต่อหลอดลมที่แยกจากหนูตะเภา ต่อทางเดินอาหารในหนูขาว ต่อลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ที่แยกจากกายหนูขาว

ผลการศึกษา ผลการศึกษาพบว่า crude venom ในขนาด 0.1-0.4 LD₅₀ ไม่มีพิษต่ออวัยวะต่างๆ F1.2.2 ที่ฉีดให้หนู mouse ในขนาด 2.6 µg, 3.6 µg, 5.0 µg, and 7.1 µg แสดงความเป็นพิษต่อไต แต่ไม่มีพิษต่ออวัยวะอื่นๆ F1.2.2 ไม่มี mutagenic effect

สรุปผลการศึกษา F1.2.2 ไม่มีพิษต่ออวัยวะส่วนใหญ่ ยกเว้น ไต และไม่มี mutagenicity จึงน่าจะนำไปพัฒนาโดยหาขนาดที่ไม่มีพิษต่ออวัยวะทุกแห่ง เพื่อนำไปใช้ทางยาได้

คำสำคัญ : KING KOBRA, OPHIOPHAGUS HANNAH, TOXICOLOGICAL EFFECT, MUTAGENICITY

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่แยกส่วนเพื่อหาส่วนที่มีศักยภาพเป็นประโยชน์ทางการรักษา

STUDIES OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF FRACTIONATED VENOM OF KING KOBRA FOR POTENTIAL THERAPEUTIC AGENTS

พรรณนิภา จุลสุคนธ์¹, สุจิตรตรา ขุนทรัพย์¹, อุษษา ฤกษ์สิริกุล², โสภิต ธรรมอารี²

¹ฝ่ายวิจัย สถานเสาวภา สภากาชาดไทย, ²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณเอนไซม์โปรตีน คุณสมบัติทางชีวเคมี และ ผลต่อเซลล์มะเร็งของส่วนที่แยกได้ 7 ส่วน (fraction) จากการแยกพิษงูจงอางขั้นต้น (จากโครงการย่อยที่ 2) และฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของพิษงูจงอาง ผลการศึกษา พบว่าเอนไซม์บางชนิด เช่น proteolytic, phosphomonoesterase และ phospholipase พบในทั้ง 7 ส่วนที่แยกได้ แต่เอนไซม์บางชนิดพบในเฉพาะบางส่วนที่แยกได้ เช่น phosphodiesterase พบในส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 4, proteolytic activity พบในส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 5, phosphomonoesterase and L-amino acid oxidase activity พบในส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 6 และ phospholipase A activity พบในส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 7

การศึกษาผลต่อเซลล์มะเร็งกับเซลล์มะเร็งของคน 5 ชนิด พบว่า ส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 5 มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งบางชนิดได้ดีกว่ายารักษามะเร็ง Doxorubicin ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก และ ควรศึกษาต่อในรายละเอียดต่อไป

ส่วนการศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของ Crude พิษงูจงอางในเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ E. coli, S. aureus, S. typhimurium, P. aeruginosa และ S. pyogenes พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ S. aureus, P. aeruginosa, S. typhimurium และ E. coli ตามลำดับ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ S. pyogenes

คำสำคัญ : KING KOBRA, OPHIOPHAGUS HANNAH, ENZYME ACTIVITY, ANTICANCER, ANTIMICROBIAL

การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

CLONING OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND FROM THE VENOM OF KING KOBRA

อรวรรณ ไคว¹, สุนุชชา สุนทรารชุน¹, รศ.ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒน์พงษ์², โสภิต ธรรมอารี³

¹ฝ่ายวิจัย สถานเสาวภา สภากาชาดไทย, ²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ³ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ทำโดยนำส่วนประกอบย่อย F 1.2.2 ที่แยกได้จากโครงการที่ 2 (การแยกส่วนพิษงูจงอาง เพื่อหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ) มาแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2 Dimensional gel electrophoresis พบจุดโปรตีน 18 จุด กระจายอยู่ระหว่าง pH 4.5 - 6 เมื่อย่อยจุดโปรตีนและวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วย Mass spectrometer และ MASCOT แล้วนำไปเทียบกับมวลโมเลกุลในฐานข้อมูลโปรตีนที่มีผู้รายงานไว้ (NCBI) พบว่า ที่ค่าความเชื่อมั่น > 0.95 ($p < 0.05$) มีจุดโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับมวลโมเลกุลโปรตีนของงูจงอาง 2 ชนิด จุดโปรตีนที่ 1, 2, 3 และ 4 มวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับมวลโมเลกุลของโปรตีน opharin precursor (ophanin) จุดที่ 7 และ 8 มวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับมวลโมเลกุลของโปรตีน long chain neurotoxin

ทำการออกแบบ primer ตามโปรตีนทั้ง 2 ชนิด สกัด mRNA จากต่อมพิษงูจงอาง จากนั้นทำ RT-PCR ได้ DNA ของ opharin precursor ขนาด 720 bp และ 276 bp ของ long chain neurotoxin ตามต้องการ นำ DNA เข้าสู่ PCR 2.1 cloning vector ตรวจสอบขนาดที่ถูกต้องด้วย restriction enzyme EcoRI และย้ายชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวเข้าสู่ pGEX-2T expression vector เพิ่มจำนวนใน DH5 α host strain ตรวจสอบความถูกต้องโดยใช้ EcoRI และทำ DNA sequencing พบว่ามี Opharin precursor อยู่ใน vector ในขนาดและทิศทางที่ถูกต้อง ขณะที่ Long chain neurotoxin ไม่พบ DNA ขนาดที่ถูกต้องและผล DNA sequencing ไม่เป็นไปตามที่ต้องการ จึงแก้ไขโดยการออกแบบ primer ใหม่ให้มี restriction site EcoRI และ BamHI เชื่อมต่อด้าน 5' primer ของ Long chain neurotoxin เพื่อง่ายต่อการเข้าสู่ pGEX-2T ซึ่งอยู่ระหว่างดำเนินการ ส่วน Opharin precursor ที่อยู่ใน pGEX-2T ใช้ตัวกระตุ้น IPTG ที่ความเข้มข้น 0.1 mM อุณหภูมิ และเวลาต่างๆกระตุ้นให้สร้างโปรตีน พบว่าที่ความเข้มข้นของ IPTG ที่ 0.1 mM อุณหภูมิ 37°C และ เวลา 3-4 ชม. เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง opharin precursor จากนั้นจึงแยกออกมาหาปริมาณโปรตีนได้ 0.35 mg/ml

PowerPoint Presentation

โครงการที่ 1

การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงู
จงอางเพื่อเป็นมาตรฐาน

STUDY OF QUALITY SPECIFICATION OF
KING KOBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*)
VENOM FOR STANDARDIZATION

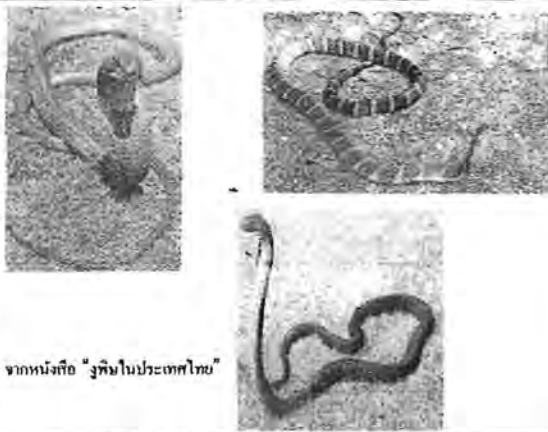
การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูจงอางเพื่อ
เป็นมาตรฐาน

นฤมล พัทธณี
พรรณนิภา จุลสุคนธ์
อรวรรณ ไคว้
สพ.ญ.ลาวัณย์ จันทร์โสม
รศ. โสภิต ชรรณอารี

งูจงอาง (King cobra)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Ophiophagus hannah*

ลักษณะ : ตัวโตเต็มวัยจะมีขนาดและสีของลำตัวที่เด่นชัดและแปร
ผันตามขอบเขตของภูมิศาสตร์
งูจงอางภาคใต้ สีน้ำตาลอมเขียวหรือสีเขียวอมเทา
งูจงอางภาคเหนือ สีเข้มเกือบดำ
งูจงอางภาคกลาง และภาคอีสาน มีลายขวางเป็นบั้งๆ
ตลอดลำตัว



จากหนังสือ "งูพิษในประเทศไทย"

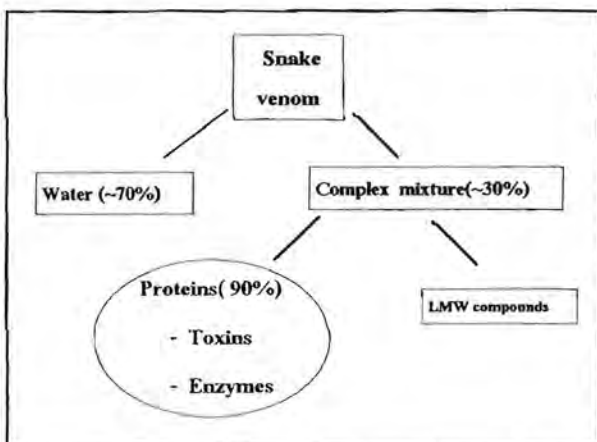
งูจงอาง (King cobra, *Ophiophagus hannah*)

แหล่งที่พบ : พบในป่าทึบ โดยชอบอยู่ใกล้แหล่งน้ำลำธาร
พบทั่วทุกภาคของประเทศไทย
อาหาร : ภูมิต่ออื่นๆ และกิ้งก่า

Composition of snake venoms

(based on pharmacokinetic properties)

- Enzymes
- Toxins



Compositions of snake venoms

- Toxins of the neuro-muscular system
- Toxins which bind cell membrane receptors
- Haemorrhagins
- Factors acting on the blood coagulation
- Enzymes

Variations in snake venoms

- Different concentrations
- The biochemical differences of certain venom components

Neurotoxin

(based on pharmacologic properties)

- Post synaptic neurotoxin
- Pre synaptic neurotoxin

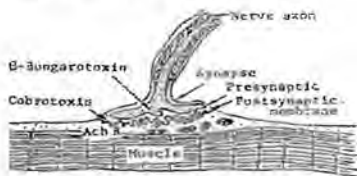
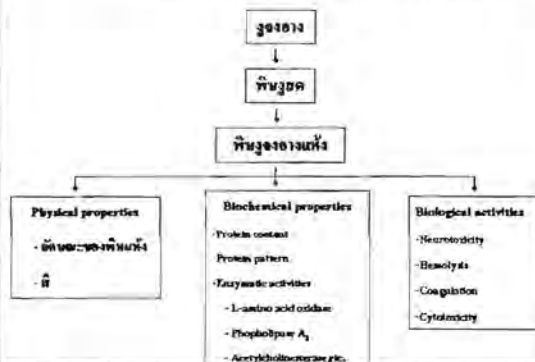


Fig. 1. Neuromuscular junction.

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



พิษงูจงอางที่ใช้ในการศึกษา

พิษงูจงอางที่ได้จากการวัดพิษจากงูจงอางซึ่งเลี้ยงที่สวนงู สภานเสาวภา ทลสารตัวรวมกัน (pooled venom) และทำเป็นทั้ง 4 ตัวอย่าง

วัดพิษงูจงอางในโครงการเพราะเลี้ยงงูและในสวนงู สภานเสาวภา ออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่ม 1 พิษของงูฟักจากไข่ที่ได้มาจาก จ.เพชรบูรณ์ อายุ 3 ปี(5 ตัว)และ 9 ปี (3 ตัว)

กลุ่ม 2 พิษของงูฟักจากไข่ที่ได้มาจากภาคใต้ อายุ 5 ปี(6 ตัว)

กลุ่ม 3 พิษของงูจงอางในสวนงูได้มาจากภาคใต้ (2 ตัว)

ทำเป็นผงแห้งโดยวิธี lyophilization ทั้งหมด 16 ตัว จำนวน 9 lot

แสดง Lot และที่มาของพิษงู

พิษงูตัวซ้ำที่	Lot No.	จำนวน (ขวด)	น้ำหนักรวม (กรัม)	ที่มาของงูจงอาง	สถานที่เลี้ยงงู	อายุของงู (ปี)
1	OBZ54142(1)	2	3.822	เพชรบูรณ์	โครงการเพาะเลี้ยงงู	3
2	OBZ54142(2)	1	6.577	เพชรบูรณ์	โครงการเพาะเลี้ยงงู	3
3	OBZ54948-39/1	1	8.527	เพชรบูรณ์	โครงการเพาะเลี้ยงงู	9
4	OBZ54948-39/2	2	8.4634	เพชรบูรณ์	โครงการเพาะเลี้ยงงู	9
5	OBZ54948-43/1	2	1.7383	ภาคใต้	โครงการเพาะเลี้ยงงู	5
6	OBZ54948-43/2	1	3.8565	ภาคใต้	โครงการเพาะเลี้ยงงู	5
7	OBZ54948-43/3	2	1.7884	ภาคใต้	โครงการเพาะเลี้ยงงู	5
8	OBFARM31048/1	1	1.1828	ภาคใต้	สวนงู	-
9	OBFARM31048/2	1	1.3159	ภาคใต้	สวนงู	-

การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของพืชงองอาจ

สังเกตลักษณะเฉพาะทางกายภาพของพืชงองอาจทั้ง 9 lots คือ ลักษณะของผงพืชงองแห้ง สีของพืชงองแห้ง และบันทึก

ลักษณะเฉพาะทางกายภาพของพืชงองอาจและ ปริมาณโปรตีนในพืชงองอาจ

Sample No.	Lot	Physical appearance		Protein content* (g%)
		General appearance	Colour	
1	OH2501-01	Fine powder	Yellow	24.99
2	OH2605-02	Fine powder	Yellow	24.56
3	OH1509-03-39/1	Cake (effervesced)	Creamy	28.21
4	OH1509-03-39/2	Cake (effervesced)	Creamy	26.55
5	OH1509-03-43/1	Cake (effervesced)	Creamy	20.24
6	OH1509-03-43/2	Cake (effervesced)	Yellow	19.39
7	OH1509-03-43/3	Cake (effervesced)	Creamy	20.36
8	OHFARM0310-01	Cake (effervesced)	Creamy	23.35
9	OHFARM0310-01	Cake (effervesced)	Creamy	23.36

Biochemical Properties

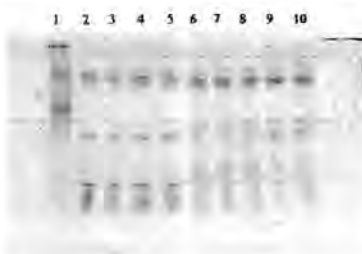
- Protein content โดยวิธีของ Bradford เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)
- Lethal toxicity
- Enzymatic activities
 - L-amino acid oxidase (Tan et al.)
 - Phospholipase A
 - Phosphomonoesterase
 - 5'Nucleotidase
 - Acetylcholinesterase
 - Proteolytic activity

ค่าความเป็นพิษ และ enzymatic activities ของพืชงองอาจ

Sample No.	Lot	LD ₅₀ µg/mouse	Phosphomonoesterase (U)	Phospholipase A (U)	Proteolytic activity (U)	PLA ₂ (U)	L-amino acid oxidase (U)	Acetylcholinesterase ^M (nmol/min/g)
1	OH2501-01		23.43	14.93	0.25	51.62	250.86	0.0112
2	OH2605-02	32.96	21.74	12.93	0.29	44.97	202.60	0.0064
3	OH1509-03-39/1		28.56	12.40	0.32	59.87	150.30	0.0156
4	OH1509-03-39/2		26.31	12.93	0.30	56.90	180.37	0.0123
5	OH1509-03-43/1		30.57	15.00	0.56	44.08	229.05	0.0297
6	OH1509-03-43/2	88.29	29.56	13.60	0.51	47.19	220.70	0.0327
7	OH1509-03-43/3		28.08	15.77	0.54	44.35	241.25	0.0270
8	OHFARM0310-01		57.04	10.85	0.75	35.93	180.40	0.0280
9	OHFARM0310-01	77.82	56.15	12.75	0.75	42.59	140.00	0.0245

^M Venom preparation 0.1 mg/ml

รูปแบบโปรตีนของพืชงองอาจโดยเทคนิค SDS-PAGE



- Protein marker
- OH2501-01
- OH2605-02
- OH1509-03-39/1
- OH1509-03-39/2
- OH1509-03-43/1
- OH1509-03-43/2
- OH1509-03-43/3
- OHFARM0310-01
- OHFARM0310-01

Biological Activities

Sample No.	Lot	Protein content (g%)	Coagulation		Hemolytic Activity %	Necroticity 50% ^M (µg/ml)
			MCD- F^{++} mg/L	MCD- F^{+++} mg/L		
1	OH2501-01	24.99	NA	NA	1.94	
2	OH2605-02	24.56	NA	NA	-	4.28
3	OH1509-03-39/1	28.21	NA	NA	8.88	
4	OH1509-03-39/2	26.55	NA	NA	8.91	
5	OH1509-03-43/1	20.24	NA	NA	18.39	
6	OH1509-03-43/2	19.39	NA	NA	8.48	7.74
7	OH1509-03-43/3	20.36	NA	NA	8.91	
8	OHFARM0310-01	23.35	NA	NA	-	
9	OHFARM0310-01	23.36	NA	NA	11.53	6.44

Cytotoxicity ต่อเซลล์มะเร็ง

พิษงู	IC50 (µg/mL)				
	BT474	Chago	Hep-G ₂	KATO-III	SW620
OH260542(2)	0.88	0.67	0.79	0.63	0.62
OH150948-43/2	0.94	0.72	0.67	0.85	0.68
OHFARM031048/1	6.30	6.60	6.52	6.28	6.67
Doxorubicine	0.70	0.55	0.61	>10	0.10

Simple standard assay procedures for the characterization of snake venom

- Median lethal dose (LD₅₀)
- Minimum coagulant dose (MCD)
- Minimum haemorrhagic dose (MHD)
- Minimum necrotizing dose (MND)
- Minimum defibrinogenating dose (MDD)
- Fibrin polymerization time (FPT) test

From WHO CC for the Control of Antivenoms, Liverpool

ลักษณะเฉพาะด้านคุณภาพของพิษงูของงเพื่อเป็นมาตรฐาน

- Physical properties
- Protein content
- Lethal toxicity
- Neurotoxicity
- Protein pattern

Acknowledgement

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงิน
งบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2549 ของทบวงงานวิจัย
“การพัฒนาจากพิษงูของง: การศึกษาระยะก่อนคลินิก”

โครงการที่ 2

การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาส่วนประกอบที่มี
ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

Fractionation of neuromuscular blocking activity compound from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom

การแยกส่วนพิษงูจงอางเพื่อหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

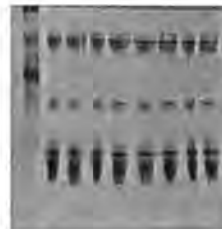
วัตถุประสงค์

- ศึกษาฤทธิ์ของพิษงูจงอางในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
- แยกส่วนพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ให้มีความบริสุทธิ์

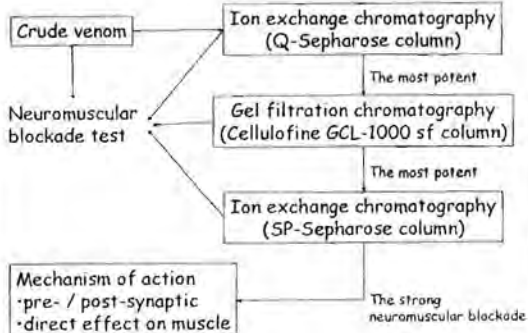
ขั้นตอนการแยกส่วนพิษงู

- เตรียมพิษงูจงอาง
- แยกส่วนพิษงูจงอางด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี exchange gel filtration exchange
- ตรวจสอบพิษงูที่แยกส่วนด้วยวิธี electrophoresis

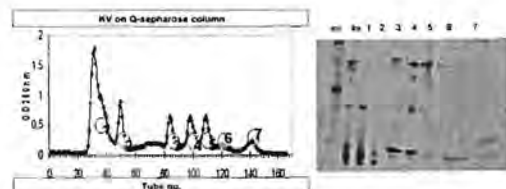
การเตรียมพิษงูจงอาง



- พิษงูจงอางชนิดผงแห้งจากจังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวน 8 ขวด
- ตรวจสอบพิษงูด้วยวิธี gelelectrophoresis
- ละลายน้ำ และนำมารวมกัน
- แบ่งใส่ขวด ทำแห้ง

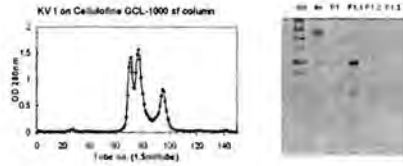


การแยกส่วนพิษงูจงอาง



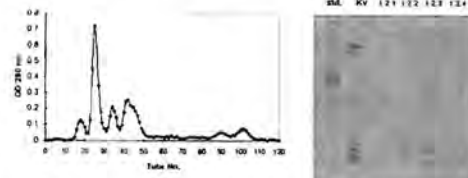
พิษงูจงอาง ๑๓๓ มิลลิกรัม นำมาลงบนคอลัมน์ Q-Sepharose (2.5X28 เซนติเมตร) ด้วยวิธี linear gradient 0.5 M NaCl 0.02 M Tris-HCl pH 7.4 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ปริมาณของสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์แยกเป็น ๕๖๖ ส่วนซึ่งรวมกันเป็น ๑๖๖ มิลลิกรัมของพิษงูที่แยกส่วนแล้ว นำมาทดสอบฤทธิ์ของพิษงูที่ 280 นาโนเมตร

การแยกส่วนพิษงูจงอาง (ต่อ)



พิษงูจงอางที่รกล้างด้วยน้ำ (F1) ขนาดของโมเลกุล Cellulofine GCL-1000 sf (2.8x29 มม.) 0.5 ลิตร 1.0 mM Tris-HCl+0.05 M NaCl pH 8.0 ที่อุณหภูมิห้องและสารสกัดจากพิษงูจงอางที่ล้างด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง นำสารสกัดจากพิษงูจงอางที่ล้างด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 280 ไมโครกรัม

การแยกส่วนพิษงูจงอาง (ต่อ)

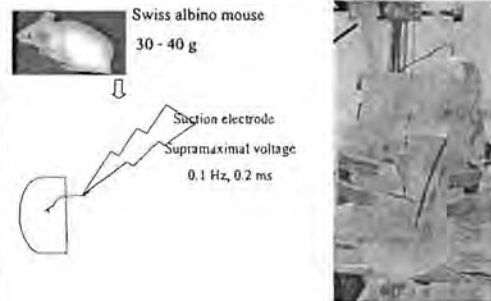


นำพิษงู F 1.2 ขนาดโมเลกุล SP-sepharose ที่ทำการวิเคราะห์ linear gradient 0-0.2 M NaCl 0.05 M PB pH 6.25 ที่อุณหภูมิห้องและสารสกัดจากพิษงูจงอางที่ล้างด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 1.5 มิลลิกรัม นำสารสกัดจากพิษงูจงอางที่ล้างด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 280 ไมโครกรัม

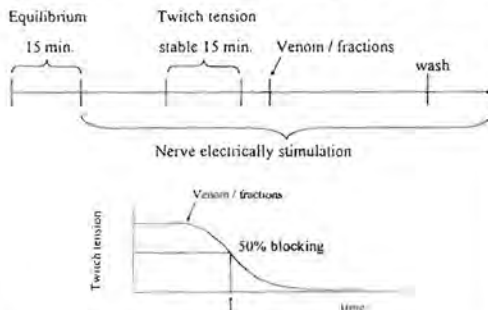
สรุปการแยกส่วนพิษงูจงอาง

	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ร้อยละ
Crude venom	1,500	100
Q-Sepharose (F1)	586.3	39.1
Cellulofine GCL-1000 sf (F1.2)	235.3	15.7
SP-Sepharose (F1.2.2)	43.4	2.9

Neuromuscular blockade test (Mouse phrenic nerve-hemi-diaphragm preparation)

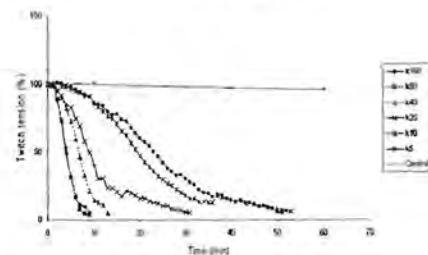


Neuromuscular blockade test (Mouse phrenic nerve-hemi-diaphragm preparation)



Results

Crude venom → Neuromuscular blockade test



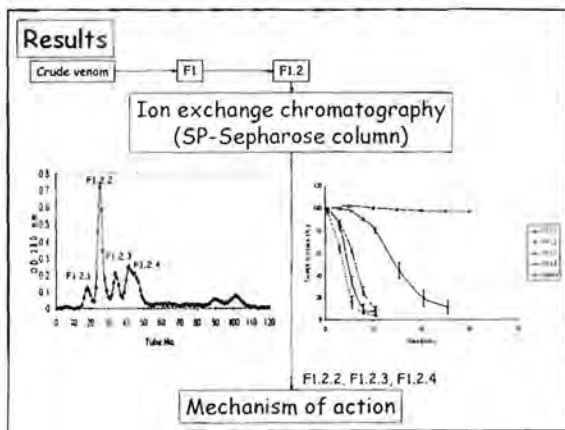
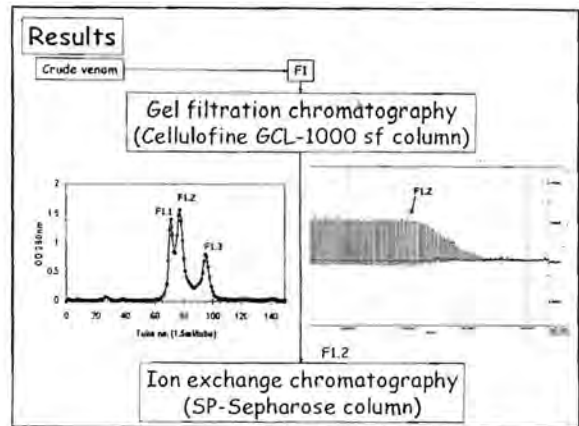
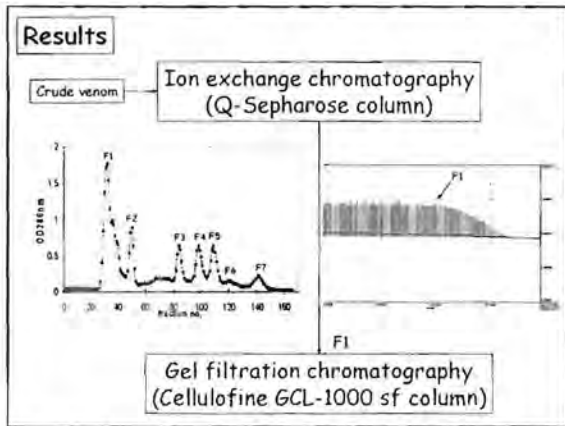
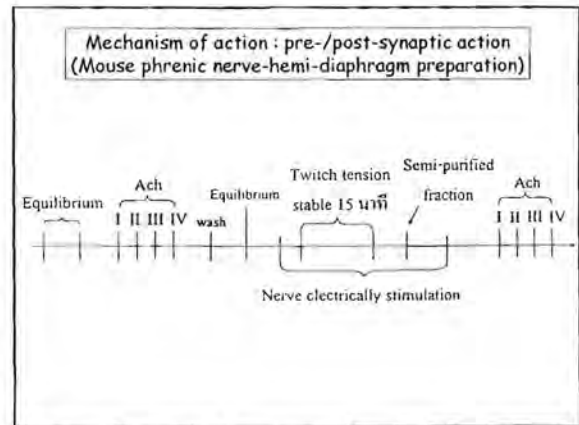
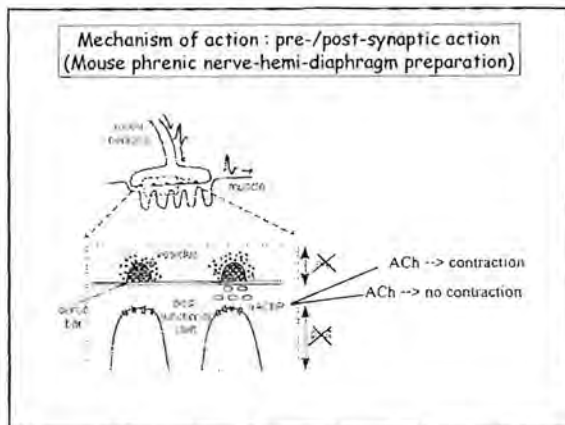
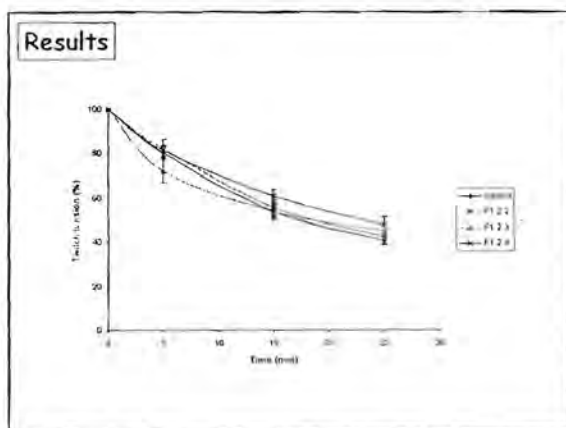
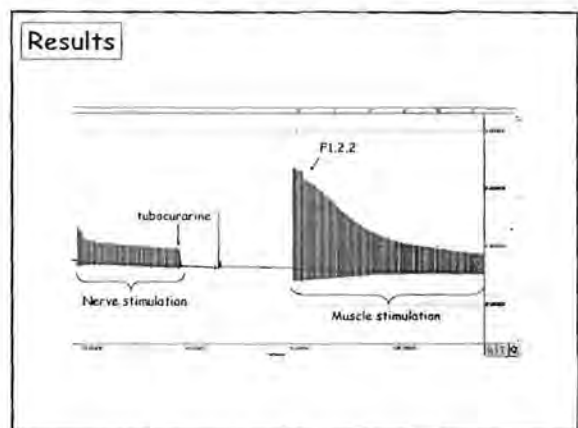
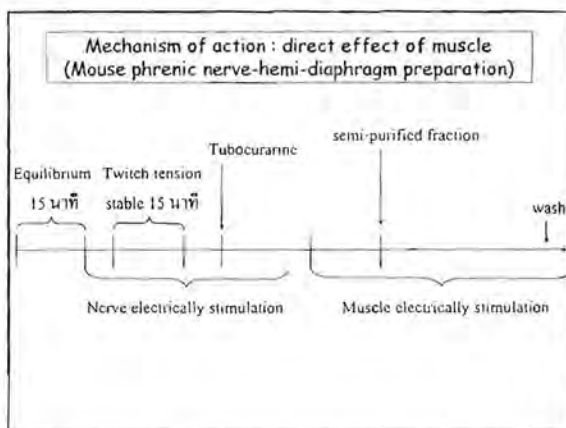
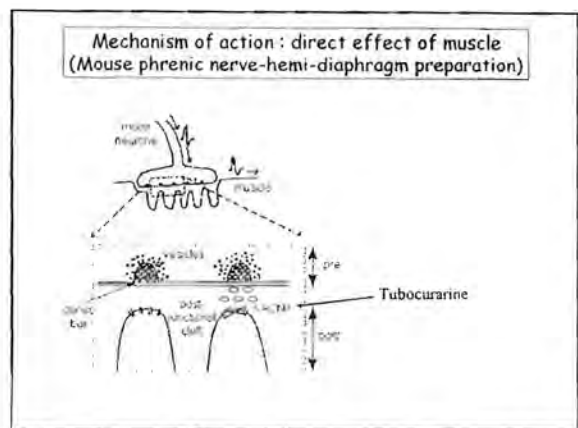
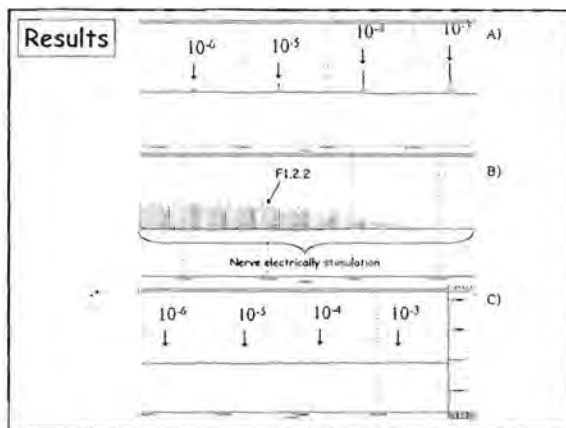


Table 1 Time taken to cause 50% inhibition of the twitch tension by crude king cobra venom and its fractions

Fraction No.	Yield (%)	Concentration (µg/ml)	Time taken to cause 50% inhibition (min)	Twitch tension at the 50% minute after fractions added (%)
Crude	-	80	4.2 ± 0.1	-
1	30.1	30.8	4.6 ± 0.2	-
2	10.4	8.3	-	83.4 ± 2.1
3	9.3	7.4	-	78.7 ± 1.8
4	11.3	9.0	-	67.5 ± 4.5
5	11.3	9.0	-	90.1 ± 2.9
6	4.1	3.3	-	84.3 ± 2.8
7	5.4	4.2	-	83.5 ± 2.7
1.1	23.8	7.3	42.8 ± 2.7	-
1.2	54.4	16.8	4.3 ± 0.3	-
1.3	29.2	8.9	-	70.5 ± 3.1
1.2.1	8.5	1.4	30.7 ± 2.0	-
1.2.2	26.8	4.4	7.4 ± 0.4	-
1.2.3	18.2	1.7	12.8 ± 0.3	-
1.2.4	22.2	3.7	9.5 ± 0.5	-

Data was expressed as mean ± S.E.M (n = 5).





Discussion and Conclusion

- * The neuromuscular blockade of crude venom was dose-dependent and the concentration of 80 µg/ml was the lowest concentration that produced the highest neuromuscular blockade.
- * The time taken to produce 50% inhibition of the twitch tension of crude venom, fraction No.1 and fraction No.1.2 were not different.
- * The action of semi-purified fractions was post-synaptic.
- * Semi-purified fractions had no direct effect on muscle.
- * The action of the semi-purified fractions should be at acetylcholine receptor site.
- * The semi-purified fraction No.1.2.2 is the fraction of interest that should be characterized, further purified and study to confirm the mechanism of action.

Summary of the purification

	Protein (mg)	Activity (ug/ml)	Total activity	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude	1500.0	80.0	187,500	1	100
F1	586.3	30.5	167,514	2.6	89
F1.2	235.2	16.6	141,686	4.8	75.6
F1.2.2	43.4	4.4	98,636	18.2	52.6

THE END

โครงการที่ 3

การวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอาง
ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกกล้ามเนื้อ

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

Snake Venom Proteins Identification

Polkit Sangvanich

Research Center for Bioorganic Chemistry
Department of Chemistry, Chulalongkorn University

Outline

- Technique for Protein Identification → Mass Spectrometry
- Experimental
- Results and Discussion
- Conclusion

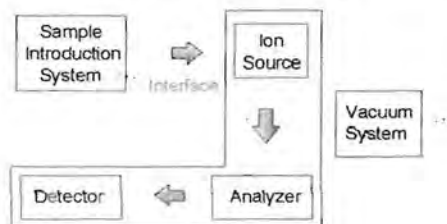
Definition of Mass Spectrometer

Mass Spectrometer

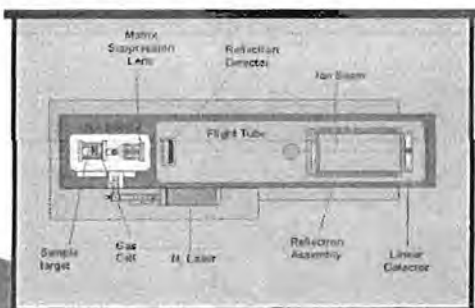
An electronic instrument that analyze substances according to the mass-to-charge (m/z) ratio of constituent atoms, groups of atoms or molecules present.



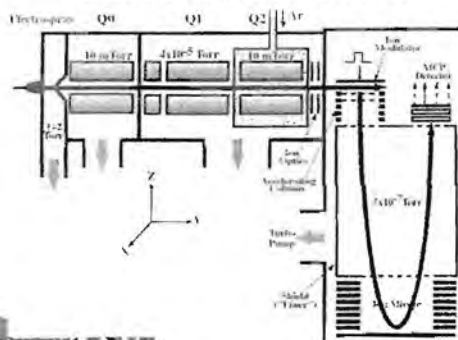
Major Components of MS

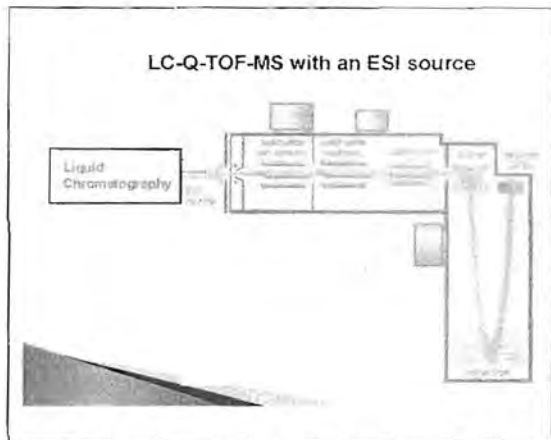


Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of flight



Schematic Diagram of QqTOF MS

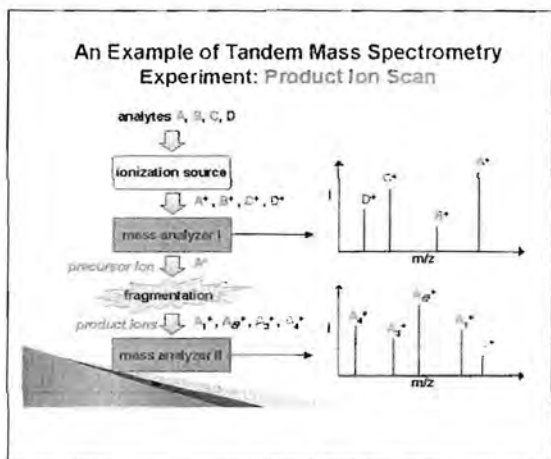




What is Tandem Mass Spectrometry?

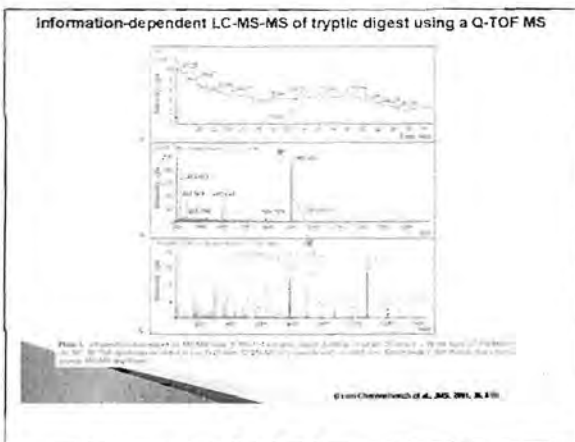
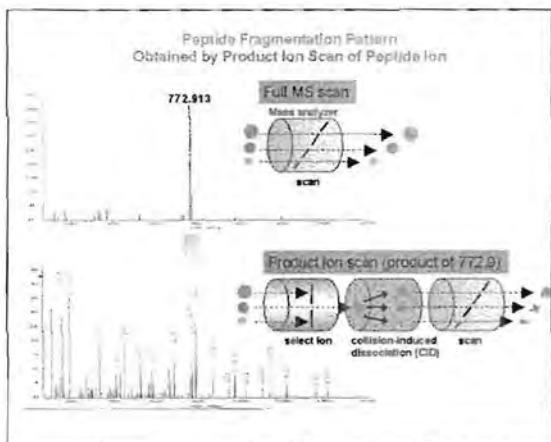
Dictionary definition of "tandem":
 An arrangement of two or more people or things placed one behind the other.
 For examples, tandem bicycle

Tandem Mass Spectrometry:
 An arrangement of two or more mass spectrometers (or mass spectrometry experiments) placed one behind the other.
 Acronym: MS/MS



Rationales for (Why) Performing Tandem Mass Spectrometry

- To obtain chemical structure-related information.
For example, differentiation of isobar compounds or isomers.
- To increase selectivity and S/N ratio in quantitative measurement.
For example, metabolite quantitation in complex biological matrices.



Information-dependent LC/MS/MS with precursor ion scan as a survey scan

7 fragments with m/z values 155.1, 156.1, 165.1, 181.1, 183.1, 191.1, and 192.1 were selected for multiple precursor ion scanning

From Chamekh et al. JMS, 2003, 36, 958

Figure 6 Information-dependent LC/MS/MS data analysis of a protein with a defined scan. The data shows a precursor ion scan at m/z 155.1, which is selected for multiple precursor ion scanning. The resulting precursor ion scan is shown in the bottom panel of the figure.

Peptide fragmentation in Mass Spectrometry

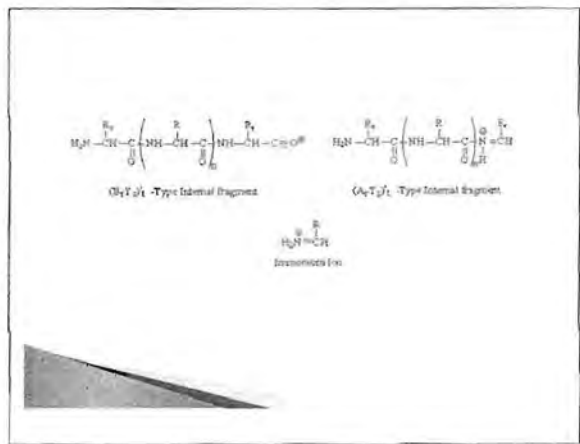
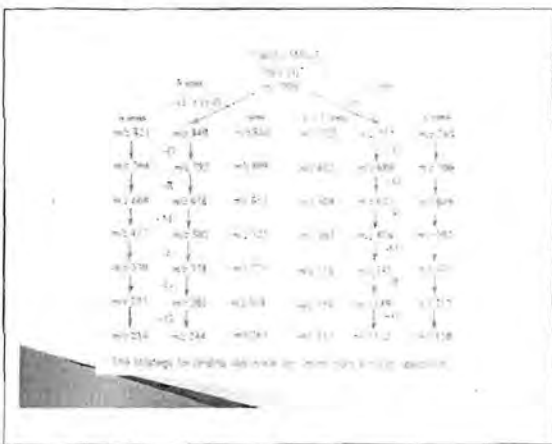
The nomenclature of the common peptide fragment ions

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}^+$ B_1

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}_2)-\text{COOH}$ Y_2^*

Residue of amino acid residues, their amino acid names, and their masses

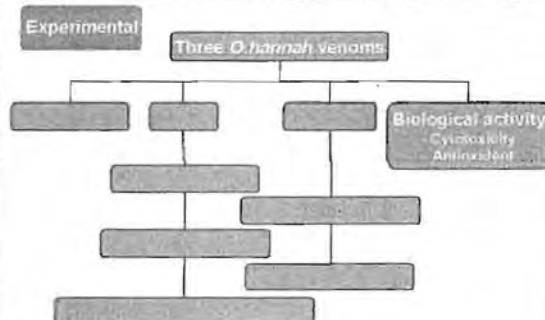
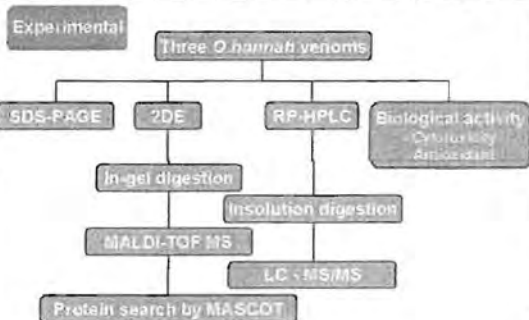
Amino acid	Symbol	Residue Mass (Da)	Residue Mass (Da)	R.D. C-terminus Mass (Da)	
Alanine	Ala	8	71.067	44	67
Arginine	Arg	18	146.154	129	102
Asparagine	Asn	15	114.070	97	70
Aspartic acid	Asp	14	115.093	96	69
Cysteine	Cys	17	163.070	146	119
Glutamic acid	Glu	16	129.070	112	85
Glycine	Gly	7	75.069	58	31
Histidine	His	17	155.093	138	111
Isoleucine	Ile	19	159.152	142	115
Leucine	Leu	17	133.070	116	89
Lysine	Lys	19	146.154	129	102
Methionine	Met	21	173.093	156	129
Phenylalanine	Phe	21	165.093	148	121
Proline	Pro	11	97.093	80	53
Serine	Ser	10	105.093	88	61
Threonine	Thr	12	119.093	102	75
Tryptophan	Trp	23	204.093	187	160
Valine	Val	14	117.093	100	73
Unknown	X	17	133.070	116	89



- Experimental
- Results and Discussion

Crude *O. hannah* venoms

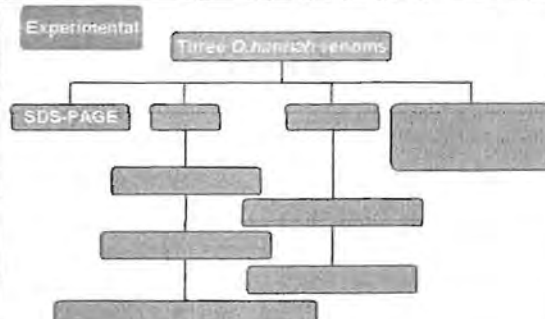
Sample	Location	Culture	Age (years)
KV2	Phetchaboon	Snake culture	3
KV6	Southern Thailand	Snake culture	5
KV9	Southern Thailand	Snake Farm	-

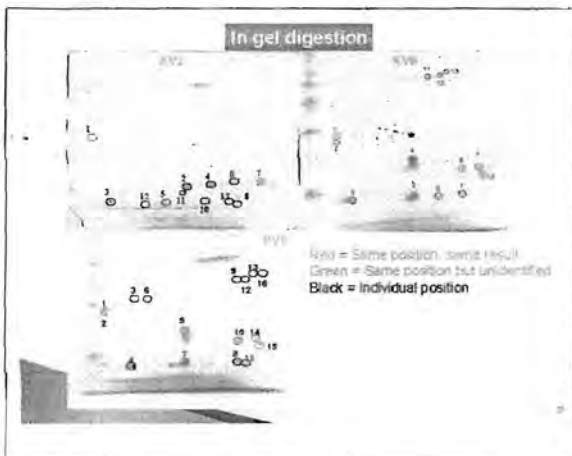
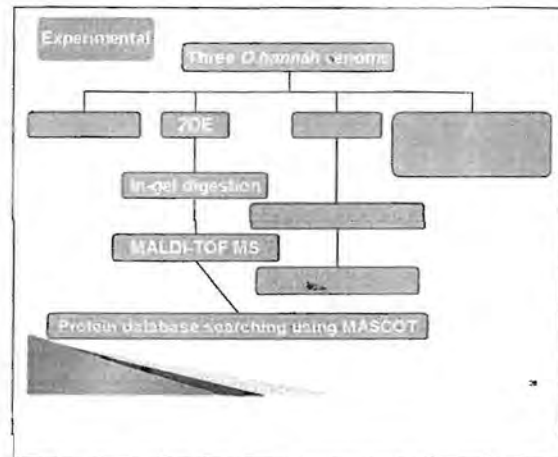
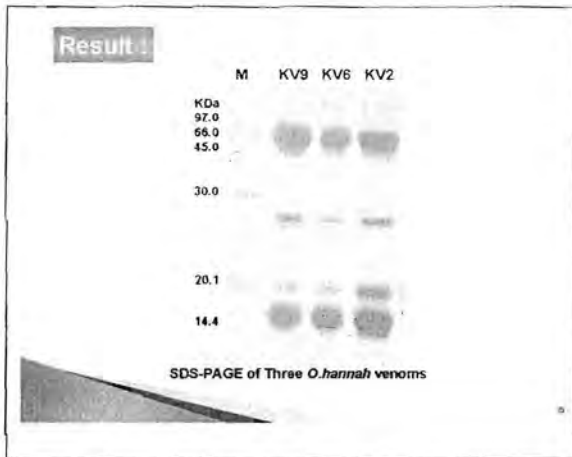


Comparison of biochemical and biological activity
of three *O. hannah* venoms

Biochemical and biological activity	KV2	KV6	KV9
Protein concentration (mg/ml)	0.39	0.36	0.36
Cytotoxicity (IC ₅₀) (µg/ml) [*]	2.99	6.11	-
LD ₅₀ (mg/kg) in mouse †	1.65	4.41	3.89

* Cytotoxicity on Hep-G2 cell line (MTT assay)
† data from Queen Saovabha Memorial Institute





Comparison number of spot protein from 2-DE gel

Molecular mass range (KDa)	Number of spot protein		
	KV2	KV6	KV9
97-66	8	5	9
66-45	3	-	4
45-30	-	1	2
30-20	1	3	5
20-14	7	6	10
<14	7	1	1

The MASCOT Result

No.1 of KV2	Ophanin	80	5	21
No.1 of KV6	Ophanin	38	4	39
No.1 of KV9	Ophanin	81	4	21

1	NIAPTELSLA	VLQQRFGYV	DFRREYTRQ	KKQKREYDUI	WELRVSVEPT
51	ASNNLACVPS	YSAAPMRSR	ATDCELRSP	DTFRVLESLR	COEDTYRSH
101	FRANTELIGL	WRDEYKHEVT	GVDAFFPQSV	TGHTQLVWF	KYRIRGCAVR
151	KCSGSEYVY	VYDGLCEKQK	YRQYNTETFK	RRFTCRDCEK	KDRHGLATRF
201	CTLYREYTHC	DSLVLDGSSQ	DEWIKRQDA	RRFTCRDCEK	

Ophanin

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.

Yamashita Y et al. Wide distribution of cytosolic secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of a snake venom cytosolic secretory protein. Arch Biochem Biophys 412:133-141(2002)

The MASCOT Result

No. of KV2	Chain A, Structure of an acidic PhospholipaseA2	85	5	43
No.10 of KVS	Chain A, Structure of an acidic PhospholipaseA2	46	3	31
No.15 of KVS	Chain A, Structure of an acidic PhospholipaseA2	44	3	31

1 ELVQFWRIR CTYPSIPFW DYSDYCYCG QSSSTFVDE LDRCCQVDR
 51 CTTQAQLTE CSPYKRFY DQRRDLCK NDRDCKRMY DQDYSKAC
 101 DQDYSKAC NDRDCKRMY DQDYSKAC

The MASCOT Result of Spot No.2 of KV2

Protein	Organism	MW (Da)	pI	Score
PhospholipaseA2	<i>O.hannah</i>	13,447	4.47	74

1 DLIQFQRIQ CTVFQLEWI KTRDCCYDQ ADRPPTVDE LDRCCQVDR
 51 CYDQCLRS CRSDRWTY KTFYDRCR VAVTCKADR DQDYSKAC
 101 DVAVYFAAS PYRRRVID TX

The MASCOT Result of Spot No.4 of KV2

Protein	Organism	MW (Da)	pI	Score
PhospholipaseA2, acidic 1 precursor	<i>O.hannah</i>	15,433	5.67	81

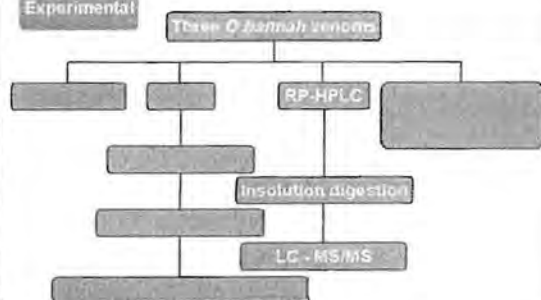
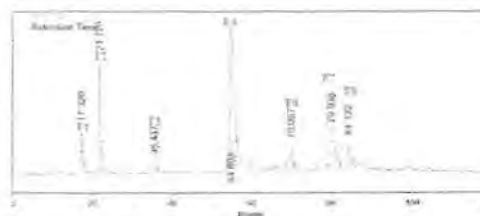
1 HRFANLVLS AYCNLGLAS VTFQVNIIT QFQRIQCYV PVLDRVETL
 51 DQDYSKAC NDRDCKRMY DQDYSKAC NDRDCKRMY DQDYSKAC
 101 STCKRFTV CRDQDQDRA FTFQVNIIA NCTKAPFDR RYGRDITL
 151 C

Phospholipase A2

Function : catalyzes the calcium-dependent hydrolysis of the 2-acyl groups in 3-sn-phosphoglycerides. Exhibits cardiotoxicity, myotoxicity, antiplatelet activity, and edema-inducing activity

Lee, W., and Zhang, Y. Molecular cloning and sequence analysis of a phospholipase A2 from king cobra (*Ophiophagus hannah*). Submitted (AUG-2000) to the EMBL/GenBank/DBJ databases.

Experimental

RP-HPLC Separation for *O.hannah* venoms

The Mascot Result of Fraction 1

Protein	Organism	MW (Da)	Score
Fraction 1	<i>Ophiophagus hannah</i>	-	-
L-amino acid oxidase	<i>Ophiophagus hannah</i>	55941	102

```

1  MSKFLALLAV LKLVWYKCNH WYDGLSECFQ EPETEMLAT AAGSLKTKLN
51  PKKQGVGAS LKGLFAARLF REAGHNVIL EASDRVGGI KTRHDKGTV
101 DWGHWVPQT HRIVREYKIK FHLNHPERQ TDSKAPLLEK HVRQDSKAM
151 PENFGYQLNP NRRGASQQL FDEYLDNVD DCTLQKSEYD SFSTKYLK
201 EGKLTGAVE NIGDFINSEA GFNSFLISV MSHFLINIS FDEITGGFDQ
251 LPERFFNMD STVGLNSTVE KIVHINQVT VFYEGLSNM ALYDQVLEK
301 AGRATFLIK FVPLSIFPK KALASLIYAS ATKILVCTD KPWEDGIDK
351 GRSLDLSR VIYVNEET NGIGVLIAS TWYSLSEFYT TLDENVDV
401 VDDVVEIDH VSDVLSVC GRVVGKAL QYSGKAFYI YTFYQITWY
451 LKLVNIGRI YFAGEYTAH HMKETSSES ALREAINEN A
  
```

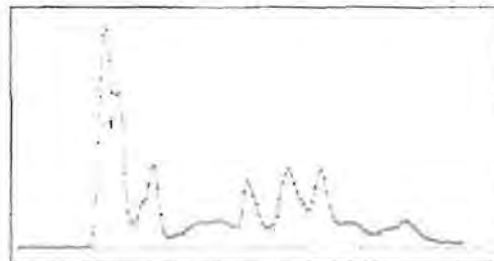
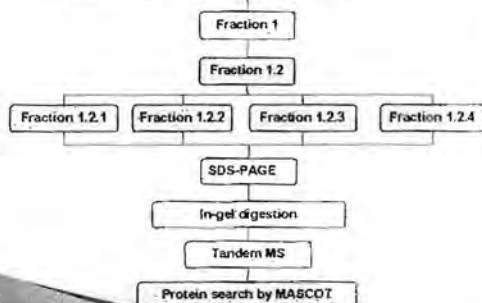
L amino acid oxidase

Catalyzes an oxidative deamination of predominantly hydrophobic and aromatic L-amino acids. Has an ability to induce apoptosis and hemorrhage. Has an antibacterial activity. By similarity. Has cytotoxic activity. Induces platelet aggregation.

Min M, Zeng B, M., and Kim, Y. S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from *Ophiophagus hannah*. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (1997) 911-919

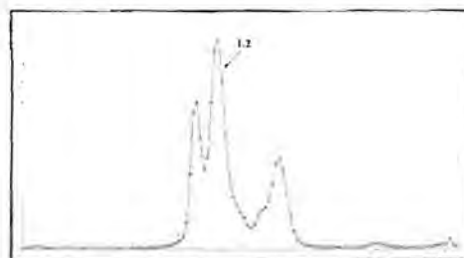
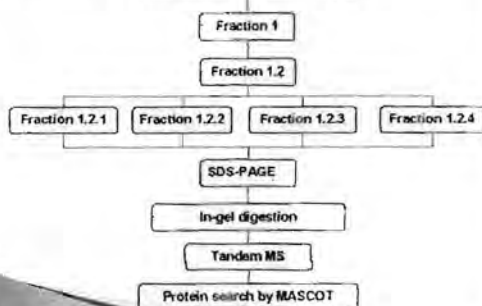
Experimental

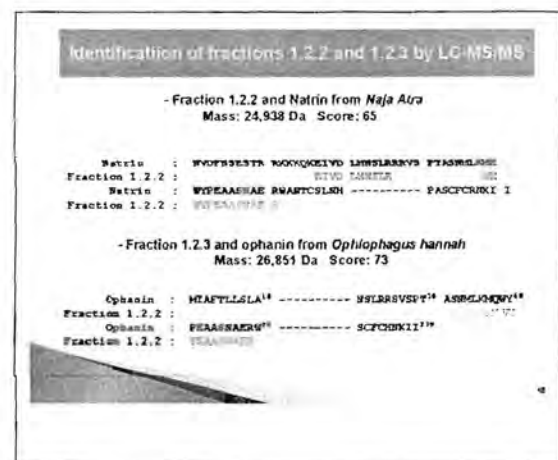
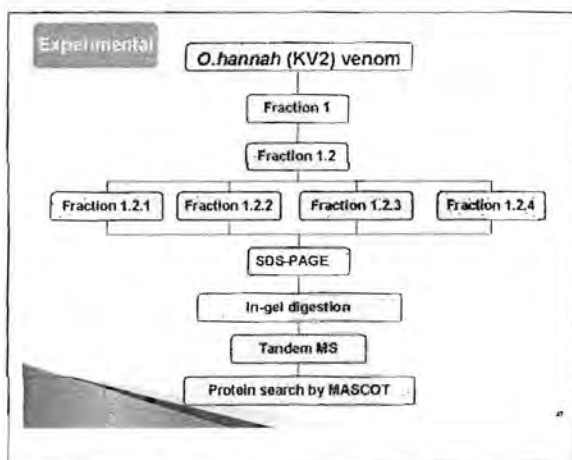
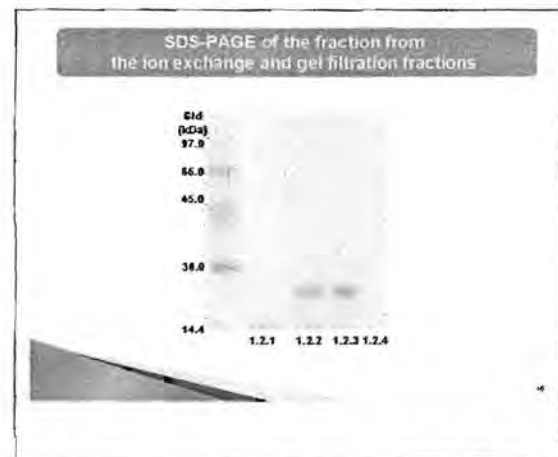
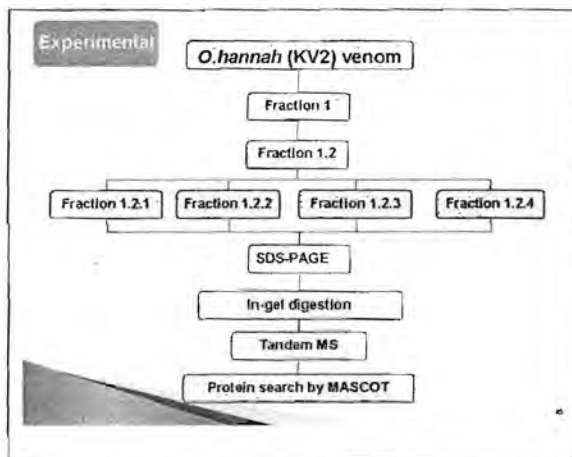
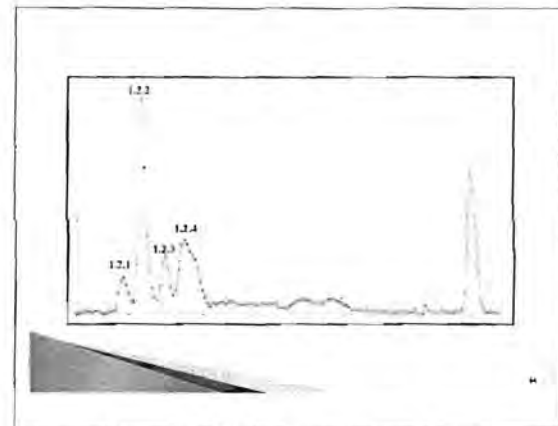
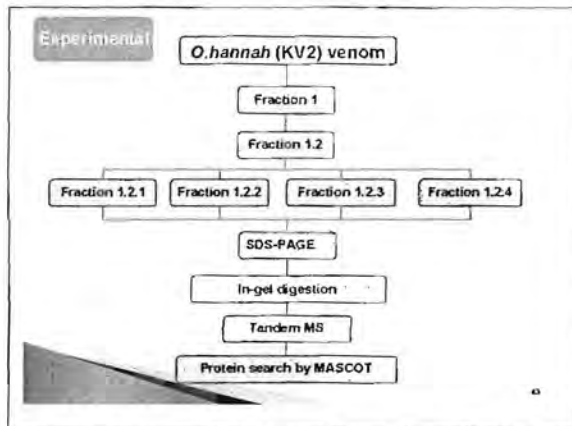
O.hannah (KV2) venom



Experimental

O.hannah (KV2) venom





Conclusions:

• Crude venom of *O.hannab* from Petchabun province were higher toxicity than venoms from South of Thailand

• Separation protein pattern of KV6 and KV9 were similar

Sample	Protein	MW
KV2	1. Chain A, Structure of an acidic PhospholipaseA2	13,182
	2. PhospholipaseA2	13,447
	3. PhospholipaseA2, acidic 1 precursor	16,433
	4. Natrin	24,938
	5. Ophanin	26,851
KV6 & KV9	Chain A, Structure of an acidic PhospholipaseA2	13,182

• The geographic origin variation was the factor of protein composition variation

โครงการที่ 4

การศึกษาเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของ
สารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลาย
ประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

การศึกษาเภสัชวิทยา
ของสารประกอบของพิษงูจงอาง
ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
PHARMACOLOGICAL STUDIES
OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPONENT
FROM KING COBRA VENOM

Sopit Thamaree¹, Jureeporn Nolprom², Punnipa Julsukon²
Chanarong Mitmoonpitak²
¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Queen Saowapa Memorial Institute, Thai Red Cross Society

Scope

- Introduction
- Objectives
- Materials & Methods
- Results
- Discussion
- Conclusion

Introduction

พิษงูเป็นแหล่งที่มาของยาบางชนิด จงอางเป็นงูพิษขนาดใหญ่ มีน้ำพิษปริมาณมาก ซึ่งมีพิษต่อระบบประสาท คณะผู้วิจัยได้แยกส่วนที่มีพิษยับยั้งปลายประสาทของกล้ามเนื้ออะระบงลมนูเม่าส เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบประสาทและกล้ามเนื้อที่มีอาการเกร็ง ในขั้นตอนการพัฒนาจะต้องศึกษาฤทธิ์อื่นๆ ทางเภสัชวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลด้านความปลอดภัยก่อนจะนำไปศึกษาในมนุษย์

Objectives

ศึกษาเภสัชวิทยาของส่วนย่อยสุดท้ายที่กึ่งบริสุทธิ์ของพิษงูจงอาง (F 1.2.2) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

Materials & Methods

1. ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปของ F1.2.2 ในสุนัขป่า F1.2.2 ที่ความเข้มข้น 6, 18 และ 54 µg/kg มาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปในสุนัขพันธุ์ทางเพศผู้ น้ำหนัก 12-15 กิโลกรัม ที่ทำให้อสลบ

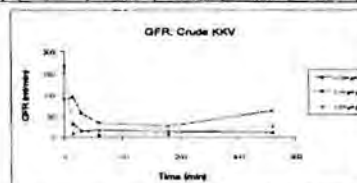
Results

No. Dogs	DOSE µg/kg	Average Mean Arterial Pressure (mmHg)					
		0 นาที	15 นาที	30 นาที	1 ชม.	3 ชม.	6 ชม.
3	6	148.3	136.7	146.1	150.5	163.3	153.9
3	18	122.2	109.4	113.3	102.8	125.0	133.3
3	54	116.1	85.5	74.4	72.2	-	-

No. Dogs	DOSE µg/kg	Average Heart Rate (beats/min)					
		0 นาที	15 นาที	30 นาที	1 ชม.	3 ชม.	6 ชม.
3	6	85.7	83.3	101.9	123.3	118.6	131.7
3	18	101.9	108.3	116.7	123.3	130.0	156.7
3	54	75.5	70.0	75.3	86.7	ควบคุม	ควบคุม

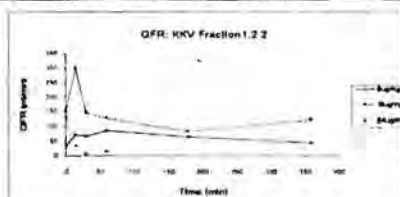
Results

Crude venom mg/Kg	Average GFR (ml/min) ± SE					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
0.05 (N=3)	No data*	32.2917 ±18.14	15.5278 ±7.30	17.1384 ±6.54	13.6137 ±13.20	10.7329 ±5.45
0.1 (N=4)	88.9069 ±14.01	92.4380 ±85.87	55.5422 ±14.52	33.6541 ±13.77	26.0945 ±14.04	61.1387 ±60.50
0.2 (N=3)	168.755 ±1.20	9.6339 ±1.20	16.0456 ±13.05	6.4279 ±1.87	7.8789 ±3.84	25.4923 **



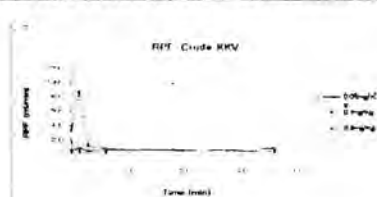
Results

F1.2.2 µg/Kg	Average GFR (ml/min) ± SE					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
6 (N=3)	32.9380 ±7.10	72.0126 ±42.36	66.2384 ±59.37	86.8704 ±56.41	65.6585 ±25.79	44.0134 ±21.57
18 (N=3)	148.3173 ±52.73	300.8435 ±124.11	143.1220 ±82.25	126.6502 ±65.91	82.8554 ±48.29	121.1082 ±59.79
54 (N=3)	132.4766 ±106.67	36.9444 ±10.56	6.6939 ±5.29	16.9272 ±106.67	No data*	No data*



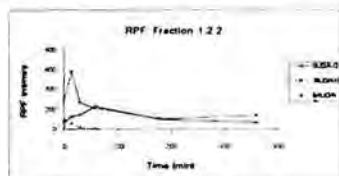
Results

Dose mg/Kg	Average RPF (ml/min) ± SE					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
0.05 (N=3)	39.2157**	82.8117 ±47.19	40.8225 ±22.96	45.9288 ±18.38	54.1471 ±53.19	31.9350 ±5.14
0.1 (N=4)	325.2463 ±176.42	855.9980 ±620.92	111.0033 ±56.49	68.4630 ±27.58	42.5291 ±17.27	76.9034 ±61.65
0.2 (N=3)	155.2100 ±145.16	36.8382 ±23.16	50.2318 ±42.72	14.9105 ±2.67	992.9480 ±926.21	No data*

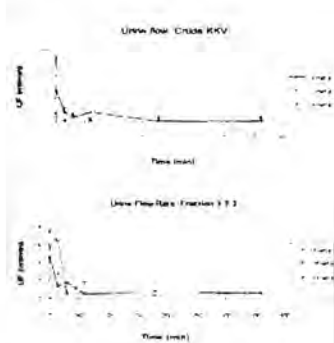


Results

Dose µg/Kg	Average RPF (ml/min) ± SE					
	0 min	15 min	30 min	60 min	180 min	360 min
6 (N=3)	71.7283 ±7.95	130.8839 ±81.00	152.4538 ±119.56	227.3292 ±158.19	99.6271 ±45.58	67.8546 ±34.83
18 (N=3)	293.3761 ±116.32	576.3295 ±391.64	266.4630 ±243.23	213.4028 ±160.83	107.2016 ±85.59	139.8717 ±95.04
54 (N=3)	96.0572 ±66.81	62.8029 ±14.12	10.4601 ±8.19	9.0503	No data*	No data*



Results



Materials & Methods

2. ศึกษาผลของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพิษงูจงอางต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system)
 - 2.1. ศึกษาผลต่อ motor co-ordination โดยการท่า Rotarod test

Animal: mice จำนวน 15 ตัว



สัตว์ทดลองที่โหยทั้งหมด สังขีจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ตาลายา การเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง เป็นไปตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย หลัก 3R's++

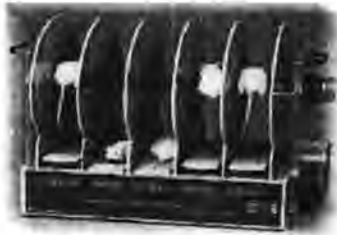
Materials & Methods

2. ศึกษาผลของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพิษงูจงอางต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system)
 - 2.1. ศึกษาผลต่อ motor co-ordination โดยการท่า Rotarod test

Methods:

- ฝึกให้หนูเมาส์สามารถเดินทรงตัวอยู่บน rod (diameter 3.5 cm) หมุน 16 RPM ได้อย่างน้อย 1 นาที
- 2. แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ซิต F1.2.2 เข้าง้ามเนื้อที่ขาหลัง
 - กลุ่มที่ 1 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.1 LD50 (1 LD 50 = 4.8 µg/mouse)
 - กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.2 LD50
 - กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.4 LD50
 - กลุ่มที่ 4 ได้รับตัวทำละลาย

วัสดุและวิธีการ



เครื่องมือส่วนในการทดสอบการเคลื่อนไหวและการทรงตัวของหนูเมาส์ (Rotarod Test)

Results

ให้หนูเดินบน Rotarod bar หลังได้รับ F1.2.2 ที่เวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง ดูความสามารถของหนูในการเดินทรงตัวบน rod ได้อย่างน้อย 1 นาที ในการโคทั้งหมด 3 ครั้ง

จากการทดลองพบว่าหนูทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง สามารถเดินทรงตัวบน rod ได้อย่างน้อย 1 นาที ในการโคทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง

Materials & Methods

2. ศึกษาผลของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพืชงูจงอางต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system)

2.2 ศึกษาฤทธิ์ของสารประกอบที่แยกได้จากพืชงูจงอางเมื่อให้ร่วมกับ pentobarbital sodium โดยการบันทึกเวลาที่สูญเสีย righting reflex

Animal: Mice (n=5)

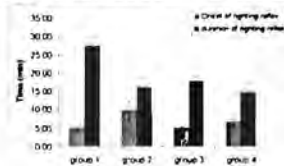
Method:

หนู mice เพศผู้ น้ำหนัก 25-30 กรัม แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีด pentobarbital sodium 45 mg/kg/BW ทาง ip

กลุ่มที่ 1 ได้รับเฉพาะ pentobarbital sodium
กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.1 LD50 ร่วมกับ pentobarbital sodium
กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.2 LD50 ร่วมกับ pentobarbital sodium
กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.4 LD50 ร่วมกับ pentobarbital sodium
ตรวจการสูญเสีย righting reflex

Results

Group	Onset of righting reflex (min)	duration of righting reflex (min)
1	4.78 ± 0.22	27.34 ± 1.27
2	9.60 ± 2.33	16.02 ± 2.30
3	4.88 ± 0.41	17.73 ± 1.30
4	6.60 ± 1.10	14.82 ± 2.38



Materials & Methods

3. ศึกษาฤทธิ์ของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพืชงูจงอางต่อระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal system)

3.1 ศึกษาฤทธิ์ของ F1.2.2 ต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กของหนูเมาส์โดยการเคลื่อนที่ของผงถ่าน

Method: ผงถ่าน (charcoal) ขนาดคอนใน 2% Tragacanth mucilage หนูเมาส์งดอาหารก่อนการทดลอง 14-16 ชั่วโมง แบ่งเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีด F1.2.2 ทาง im.

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Tragacanth mucilage)

กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.1 LD50

กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.2 LD50

กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.4 LD50

ป้อนผงถ่านปริมาณ 0.5 ml เข้าทางปาก เมื่อครบเวลา 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัว วัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่าน เปรียบเทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็กในหนูแต่ละตัว

Results

group	% การเคลื่อนที่ของผงถ่าน
1	76.87 ± 3.61
2	65.37 ± 4.09
3	74.80 ± 4.03
4	64.50 ± 1.87



Materials & Methods

3. ศึกษาฤทธิ์ของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพิษงูจงอางต่อระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal system)
 3.2 ศึกษาฤทธิ์ของ F1.2.2 ต่อลำไส้เล็กที่แยกจากกายหนู rat

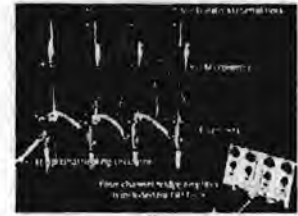
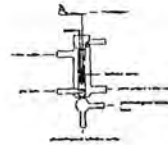
Animals: Rat

Method: ทำใหญ่ rat สลบด้วย $CO_2 + O_2$ แยกลำไส้เล็กส่วน ileum ใส่ใน organ bath

หลักการการศึกษา Isolated organ/tissue in vitro study

1. สารทดสอบที่ไม่มีฤทธิ์เป็น agonist (กระตุ้น) จึงทดสอบแบบ antagonist
2. ถ้าเนื้อเยื่อ spontaneous contraction ไม่ต้องใช้สารกระตุ้น
3. ถ้าเนื้อเยื่อไม่มี spontaneous contraction จะศึกษาฤทธิ์โดยตรงของสารสกัด และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมื่อให้ก่อน และให้หลังสารกระตุ้นเนื้อเยื่อ
4. ศึกษา dose-response curve ของสารกระตุ้นเนื้อเยื่อ และไม่มีสารสกัด
5. ศึกษาความคงทนของเนื้อเยื่อ ในระยะเวลาที่จะทำการศึกษา
6. ศึกษาผลของ ตัวทำละลาย (ถ้าไม่ใช่ DW ละลาย) ต่อเนื้อเยื่อ
7. ปกติจะศึกษาอย่างน้อย 3 ความเข้มข้นของสารสกัด (สูง กลาง ต่ำ) แต่ในการศึกษาที่ใช้ความเข้มข้น 4.4 mcg/ml (มาจาก product ที่ได้จากการแยก)

วัสดุและวิธีการ



แก้ว(chamber)2 ชั้นบรรจุเนื้อเยื่อที่จะใช้ทดสอบ

วัสดุและวิธีการ

ใส่ยาเข้าเข็มเบี่ยงเบือนขดคนแก้ว
 ชั้นนอกหล่อฉนวนควบคุมอุณหภูมิ



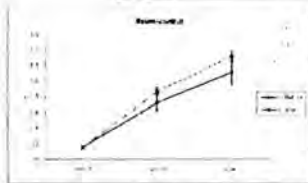
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ

วัสดุและวิธีการ

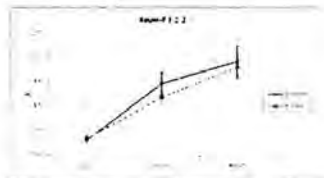


ชุดแปลงสัญญาณและ
 บันทึกผลการทดลอง Biopac

Results



Agonist = Acetylcholine (ACh)

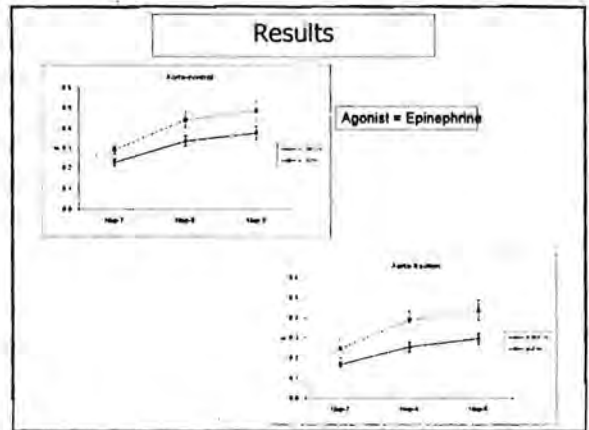
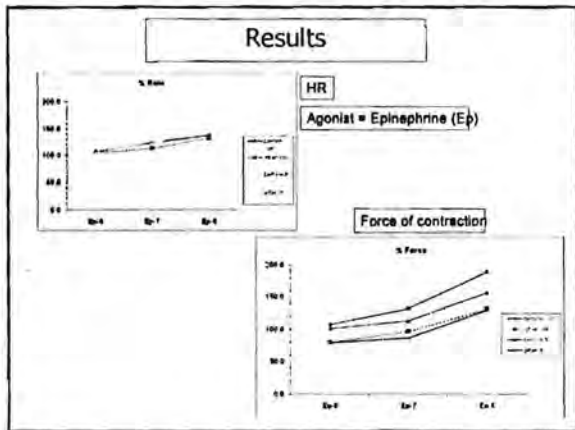


Materials & Methods

4. ศึกษาฤทธิ์ของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพิษงูจงอางต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด(Cardiovascular system)
 4.1 ศึกษาฤทธิ์ของ F1.2.2 ต่อหลอดเลือดที่แยกจากกายหนู rat

Animal: Rat

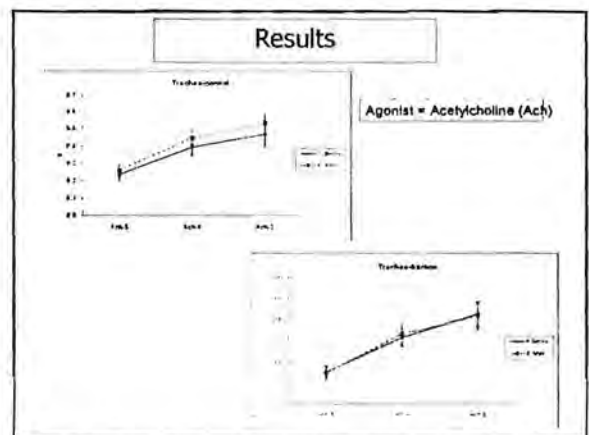
Method: เหมืองการศึกษา Isolated organ/tissue ข้างต้น



Materials & Methods

5. ศึกษาฤทธิ์ของ F1.2.2 ที่แยกได้จากพิษงูจงอางต่อหลอดลม (Trachea) ที่แยกจากกวางหนู rat

Animal: Rat
Method: เพิ่มการศึกษา isolated organ/tissue สัตว์ต้น



Discussion

ผลการศึกษาในสุนัขพบว่า crude venom ขนาด 0.05-0.1 mg/Kg และ F1.2.2 ขนาด 6-18 µg/kg มีผลลดความดันเลือด ลดการฟารน้ำที่ขອງไต (GFR, RPF) ลด urine flow crude venom ในขนาด 0.2 mg/Kg และ F1.2.2 ขนาด 54 µg/kg ทำให้สุนัขตาย

F1.2.2 ในขนาด 0.1-0.4 LD50 ไม่มีผลต่อ motor coordination แต่ลดระยะเวลาการหิ้น (righting reflex) ลดการบีบตัวของลำไส้เล็ก แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาในเนื้อเยื่อที่แยกออกจากกวางหนู F1.2.2 ในความเข้มข้น 4.4 mcg/ml ไม่ยับยั้งฤทธิ์ของ agonists ได้แก่ acetylcholine, Epinephrine, Norepinephrine ในเนื้อเยื่อทุกชนิด

Conclusion

สรุปผลการศึกษา F1.2.2 มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีความปลอดภัย และอาจนำไปใช้ทางยาได้

การศึกษาพิษวิทยา
ของสารประกอบของพิษงูจงอาง
ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
*TOXICOLOGICAL STUDIES
OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND
FROM KING COBRA VENOM*

Sopit Thamaree¹, Jureeporn Nolphrom², Punnipa Julsukon²
Duangpen Thirabunchasak¹
¹Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
Queen Saowapa Memorial Institute, Thai Red Cross Society

Scope

- Introduction
- Objectives
- Materials & Methods
- Results
- Discussion
- Conclusion

Introduction

พิษงูเป็นแหล่งที่มาของยาบางชนิด งูจงอางเป็นงูพิษ
ขนาดใหญ่ มีน้ำพิษปริมาณมาก ซึ่งมีพิษต่อระบบประสาท
คณะผู้วิจัยได้แยกส่วนที่มีพิษยับยั้งปลายประสาทของ
กล้ามเนื้อกระบังลมหนูเม้าส์ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษา
โรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบประสาทและกล้ามเนื้อ
ที่มีอาการเกร็ง ในขั้นตอนการพัฒนาจะต้องศึกษาฤทธิ์
อื่นๆ ทางพิษวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลด้านความปลอดภัยก่อน
จะนำไปศึกษาในมนุษย์

Objectives

ศึกษาพิษวิทยาของส่วนย่อยสุดท้ายที่กึ่งบริสุทธิ์
ของพิษงูจงอาง (F 1.2.2) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลาย
ประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

Materials & Methods

1. การหา LD50

Animal: Mice

Methods: ตามวิธีที่นำเสนอในโครงการที่ 1 (A 01)

Materials & Methods

2. Acute Toxicity (single dose toxicity)

3. Subacute Toxicity (repeated-dose toxicity) 28 days

Animal: Mice

Methods:

Materials & Methods

การศึกษา single dose toxicity 5 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว

ฉีด F1.2.2 ปริมาตร 0.1 ml เข้ากล้ามเนื้อเนื้อขาหลัง

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ Normal saline
- กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 2.6 µg/mouse
- กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 3.6 µg/mouse
- กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 5.0 µg/mouse
- กลุ่มที่ 5 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 7.1 µg/mouse

ดูผล 14 วัน

Results

single dose toxicity

- ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ 1-3 สัตว์ทดลองมีชีวิตรอดจนครบ 14 วัน
- ส่วนกลุ่มที่ 4-5 สัตว์ทดลองตายภายใน 1 ชั่วโมงหลังฉีด F1.2.2
- เมื่อครบตามระยะเวลา euthanized สัตว์ทดลอง
- ตัดอวัยวะไตแก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด ม้าม และอวัยวะสืบพันธุ์ เก็บใน 10% Formalin เพื่อเตรียมสำหรับการตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไป

Materials & Methods

การศึกษา repeated-dose toxicity 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ฉีด F1.2.2 ปริมาตร 0.1 ml เข้ากล้ามเนื้อเนื้อขาหลังวันละครั้ง ติดต่อกัน 28 วัน

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ Normal saline
- กลุ่มที่ 2 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.1 LD50 (0.4 µg)
- กลุ่มที่ 3 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.2 LD50 (0.8 µg)
- กลุ่มที่ 4 ได้รับ F1.2.2 ขนาด 0.4 LD50 (1.6 µg)
- เมื่อครบตามระยะเวลา euthanized สัตว์ทดลอง
- ตัดอวัยวะไตแก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด ม้าม และอวัยวะสืบพันธุ์ เก็บใน 10% Formalin เพื่อเตรียมสำหรับการตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไป

Results

repeated-dose toxicity

- ผลการทดลองพบว่าเมื่อให้ F1.2.2 ทุกวันจนครบ 28 วัน กลุ่มที่ 1-3 สัตว์ทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมียมีชีวิตรอด ทว่าการเก็บเลือดเพื่อตรวจค่าเม็ดเลือด และเก็บอวัยวะต่างๆ เพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไป ในขณะที่กลุ่มที่ 4 สัตว์ทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมียตายในวันที่ 5 หลังได้รับสารทดสอบ แต่ไม่สามารถเก็บเลือดได้ เก็บได้เพียงอวัยวะต่างๆ เพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยาเท่านั้น

Results

Group	% Differential count					
	Neutrophils	Band	Eosinophils	Basophils	Lymphocyte	Monocyte
NSS/Male	38.4	0	1.6	0	59.6	0.4
NSS/Female	27.4	0	3	0	69.2	0.2
0.1LD50/Male	37.5	0	2.5	0	60	0
0.1LD50/Female	26.4	0	1.8	0	71.6	0.2
0.2LD50/Male	34	0	2.4	0	62.4	1.2
0.2LD50/Female	33	0	1	0	65	1
0.4LD50/Male	พบสัตว์ทดลองตายในวันที่ 5 หลังฉีดเพียง (ไม่สามารถเก็บเลือดมาตรวจได้)					
0.4LD50/Female	พบสัตว์ทดลองตายในวันที่ 5 หลังฉีดเพียง (ไม่สามารถเก็บเลือดมาตรวจได้)					

Results

Group	R.B.C.	Hemoglobin	Hematocrit	Platelets	W.B.C
	per µl (x10 ⁶)	g/dl	%	per µl (x10 ³)	per µl
NSS/Male	6.29	12.00	38.80	469.80	4420.00
NSS/Female	6.8	13.0	41.8	466.4	4700.0
0.1LD50/Male	6.08	11.80	37.80	557.40	3340.00
0.1LD50/Female	6.24	12	38.6	434.8	4280
0.2LD50/Male	6.82	10.60	38.80	552.40	5740.00
0.2LD50/Female	6.56	11.8	38.2	444.4	5800
0.4LD50/Male	พบสัตว์ทดลองตายในวันที่ 5 หลังฉีดเพียง (ไม่สามารถเก็บเลือดมาตรวจได้)				
0.4LD50/Female	พบสัตว์ทดลองตายในวันที่ 5 หลังฉีดเพียง (ไม่สามารถเก็บเลือดมาตรวจได้)				

Results

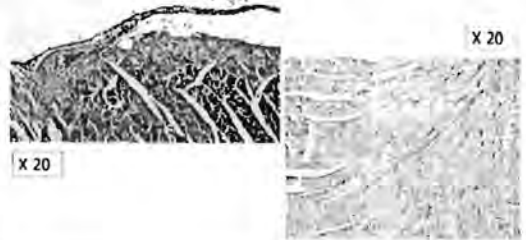
Pathological Findings

At 0.1, 0.2 and 0.4 LD50 in both male and female groups, there was no significant change in multiple major organs including liver, kidney, heart, lung, spleen, and genital organs.

Hepatic parenchyma was in well recognized architecture with intact central vein and unremarkable change of portal triads. Hepatic sinusoids and their neighbors (Kuffer Cells) had no significant change. Nonspecific congestion was observed, which was more likely be post mortem change. Kidneys showed well demarcated cortex and medulla area with nonspecific vascular congestion. Glomeruli were intact with no significant change in renal tubules and blood vessels. Interstitium was unremarkable. Four functional components of kidney were examined and founded no serious pathologic condition.

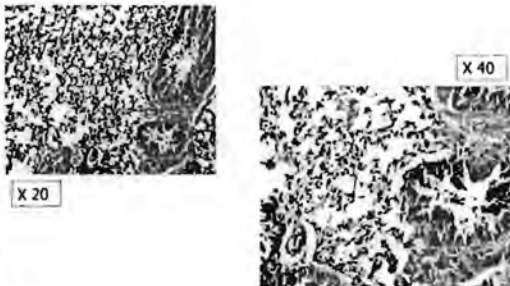
Results

Heart



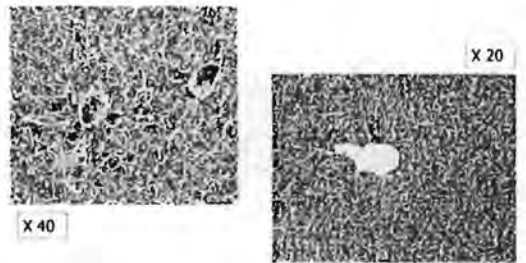
Results

Lung



Results

Liver



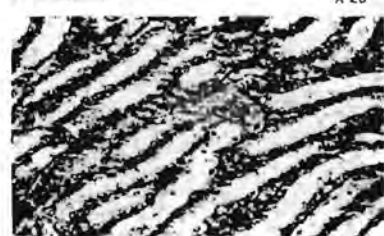
Results

Kidney



Results

Kidney



Results

- Heart muscle revealed no evidence of ischemia or infarction.
- Endocardium was smooth and intact. Pericardium was unremarkable. Sampling lung tissue exhibited nonspecific congestion without occupying lesion.
- Alveoli were empty in good shape with thin interstitium and capillaries. Broncheal tree had no significant change. Pleura was thin and no abnormal infiltration.
- Spleen had no significant histologic change. Congestion in splenic parenchyma was remarkable with intact lymphoid tissue.
- Testes showed well preserved seminiferous tubules with active secondary spermatogenesis. No abnormal cellular infiltration was detected.
- Ovaries were in normal histology.

Results

NSS, F1.2.2 (2.6 µg, 3.6 µg, 5.0 µg, and 7.1 µg)

When we administrated different amount of venom, at 2.6 µg, 3.6 µg, 5.0 µg, and 7.1 µg and used control as NSS, we observed significant change in multiple major organs including liver, kidney, heart, lung, spleen, and genital organs. Liver tissue was in well recognized architecture with intact central vein and unremarkable change of portal triads. Hepatic sinusoids and regional Kuffer Cells had no significant change. Nonspecific congestion was observed, possible nonspecific post-mortem change.

Results

NSS, F1.2.2 (2.6 µg, 3.6 µg, 5.0 µg, and 7.1 µg)

Kidneys showed well demarcated cortex and medulla area with nonspecific vascular congestion. Glomeruli were intact with no significant change in renal tubules and blood vessels. Interstitium was unremarkable. No significant histopathologic change is found.

Heart muscle revealed no evidence of ischemia or infarction.

Results

Endocardium was smooth and intact. Pericardium was unremarkable. Sampling lung tissue exhibited nonspecific congestion without occupying lesion. Alveoli were empty in good shape with thin interstitium and capillaries. Broncheal tree had no significant change. Pleura was thin and no abnormal infiltration. Spleen had no significant histologic change. Congestion in splenic parenchyma was remarkable with intact lymphoid tissue. Testes showed well preserved seminiferous tubules with active secondary spermatogenesis. No abnormal cellular infiltration was detected. Ovaries were unremarkable.

Materials & Methods

การศึกษา Mutagenicity

Methods:

ทำการศึกษาในหลอดทดลองโดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นสำหรับทดสอบการกลายพันธุ์ (Ames' Test) เปรียบเทียบกับ สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 4 nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)

Results

จากการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสาร KV 1.2.2 และ KV fraction 5 โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสภาวะที่มีและไม่มี S9 พบว่า สาร KV 1.2.2 และ KV fraction 5 ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์

Discussion

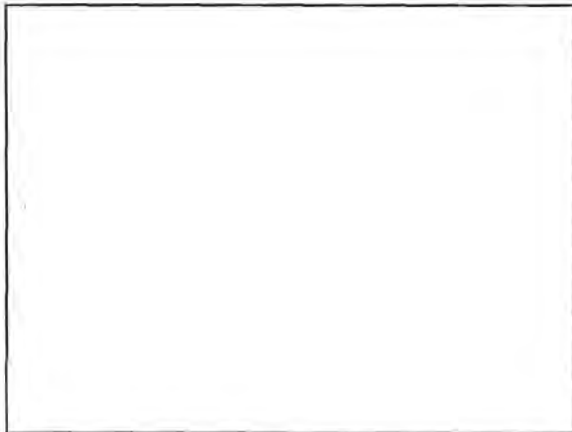
ผลการศึกษาพบว่า crude venom ในขนาด 0.1-0.4 LD50 ไม่มีพิษต่ออวัยวะต่างๆ F1.2.2 ที่ฉีดให้หนู mouse ในขนาด 2.6 μg , 3.6 μg , 5.0 μg , and 7.1 μg แสดงความเป็นพิษต่อไต แต่ไม่มีพิษต่ออวัยวะอื่นๆ

F1.2.2 ไม่มี mutagenic effect

สรุปผลการศึกษา F1.2.2 ไม่มีพิษต่ออวัยวะส่วนใหญ่ ยกเว้น ไต และไม่มี mutagenicity จึงน่าจะนำไปพัฒนาโดยหาขนาดที่ ไม่มีพิษต่ออวัยวะทุกแห่ง เพื่อนำไปใช้ทางยาได้

Conclusion

สรุปผลการศึกษา F1.2.2 ไม่มีพิษต่ออวัยวะส่วนใหญ่ ยกเว้น ไต และไม่มี mutagenicity จึงน่าจะนำไปพัฒนาโดยหาขนาดที่ ไม่มีพิษต่ออวัยวะทุกแห่ง เพื่อนำไปใช้ทางยาได้



โครงการที่ 5

การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอางที่มี
ฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

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

การทำโคลนนิ่งสารประกอบของพิษงูจงอาง ที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ

CLONING OF THE NEUROMUSCULAR BLOCKING COMPOUND
FROM THE VENOM OF KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAI*)

วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อในพิษงูจงอาง

ระเบียบวิธีการวิจัย

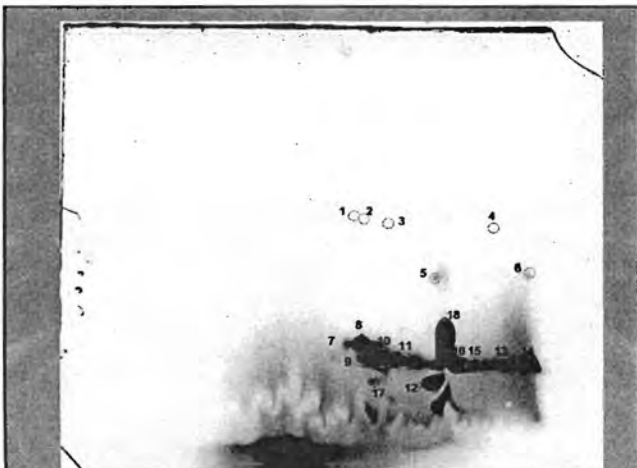
- ออกแบบ degenerate primers ที่จำเพาะต่อ amino acid sequences ที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนในสารประกอบของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ
- สกัด total mRNA จากค่อมพิษงูจงอางเพื่อใช้เป็นแม่แบบในการศึกษาด้วย nucleotide
- ศึกษาลำดับ nucleotide โดยวิธี PCR และวิเคราะห์ลำดับ nucleotide โดยวิธี DNA sequencing
- ศึกษาการแสดงออกของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ในเชื้อ *E. coli*
- นำสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อที่แสดงออกใน *E. coli* ไปทดสอบในสัตว์ทดลอง

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2 Dimensional Gel electrophoresis

- ส่วนประกอบย่อย F 1.2.2 ที่แยกได้จากโครงการที่ 2
- Linear Immobilized™ Drystrip pH 3-10 ความยาว 7 ซม. (GE Healthcare)

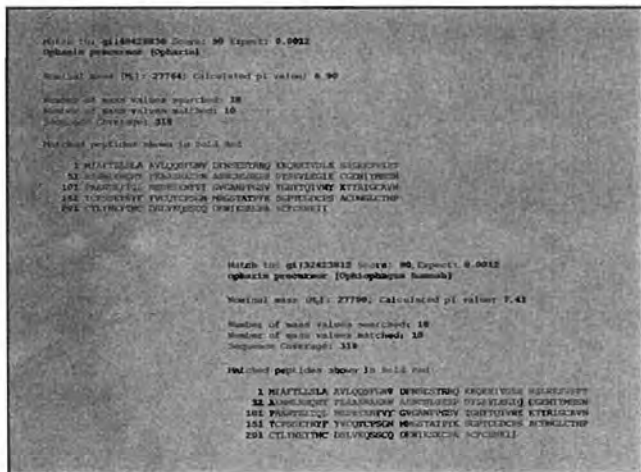
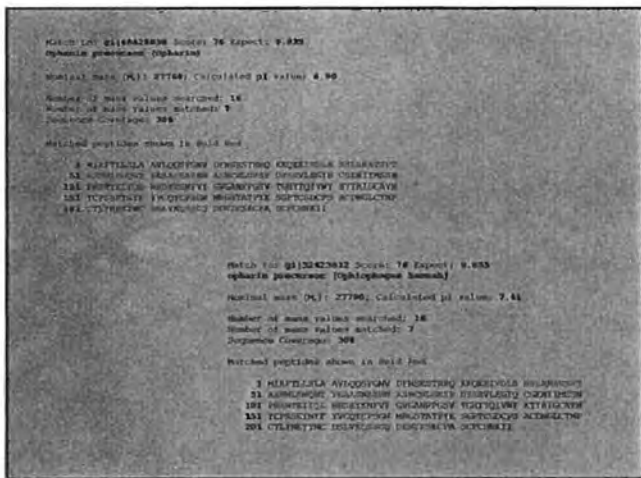
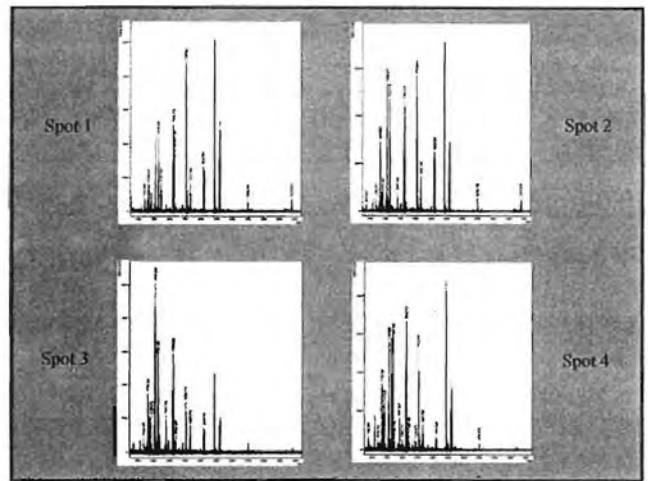
การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของจุดโปรตีน

- Mass spectrometer (MALDI-TOF MS model reflex V, Bruker Daltonik GmbH, Bio Service Unit, Biotec)
- MASCOT (Matrix Science)

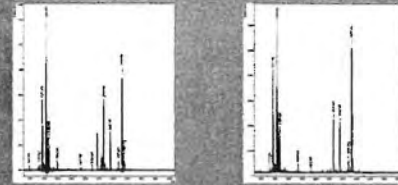


ผลการวิเคราะห์

- จุดโปรตีนที่ 1, 2, 3 และ 4 มีมวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับ Ophanin precursor (opharin)
- จุดโปรตีนที่ 7 และ 8 มีมวลโมเลกุลคล้ายคลึงกับ long chain neurotoxin



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.



Spot 7

Spot 8

PK2662 1 mktlltliv mfvcllqy tlfclshd svfcapgenv cflkswdaw cgsrgkdsf
61 gcaatcpkm ppidieccst dncmphkdr p

Match for Q151105368 Score: 66 Expect: 0.36
Long chain neurotoxin precursor (Ophiophagus hannah)
Nominal mass (M): 10473; Calculated pI value: 7.44
Number of mass values searched: 28
Number of mass values matched: 4
Sequence Coverage: 46%

Matched peptides shown in Bold Red

1 MKTLLTLIV MFTVCLLQY TLFCLSHD SVFCAPGENV CFLKSWDAW
61 GCAATCPKM PPIDIECCST DNCMPHKDR P

Match for Q151105371 Score: 69 Expect: 0.15
Long chain neurotoxin precursor (Ophiophagus hannah)
Nominal mass (M): 10473; Calculated pI value: 7.44
Number of mass values searched: 19
Number of mass values matched: 4
Sequence Coverage: 46%

Matched peptides shown in Bold Red

1 MKTLLTLIV MFTVCLLQY TLFCLSHD SVFCAPGENV CFLKSWDAW
61 GCAATCPKM PPIDIECCST DNCMPHKDR P

Produces peripheral paralysis by blocking neuromuscular transmission at the postsynaptic site. Binds to muscular and neuronal (only alpha-7 alpha-8 alpha-9) nicotinic acetylcholine receptors

คณะผู้วิจัย

- พรรณิภา จตุตศนธ์
- อรรรรมณ แจ่มไคว้
- สุจิตตรา ขุนทวีทย์
- สุนุชชา สุนทรารจุน
- จุวีพร น้อยพรหม

95 for gi|26397290, Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)
Mass 8099

gi|26397290|sp|P82662.1|NXL6_OPHHA

This record has been replaced by P82662.2

1 kcfsshdv vtcaggenw flkswdaww gsrqkdsf gcaatpknv gdlccsd
61 ncrphkdr

[FUNCTION] Produces peripheral paralysis by blocking neuromuscular transmission at the postsynaptic site. Binds to muscarinic and neuronal (only alpha-7 alpha-8 alpha-9) nicotinic acetylcholine receptors (by similarity).

gi|26397290 8097 59 Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)
gi|51105969 10477 69 long chain neurotoxin precursor (Opilophagus hamuli)
gi|51105371 10473 69 long chain neurotoxin precursor (Opilophagus hamuli)

100 for gi|26397290, Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)

gi|26397290 8099 100 Long neurotoxin OH-6A/OH-6B (Alpha-neurotoxin)
gi|51105969 10477 69 long chain neurotoxin precursor (Opilophagus hamuli)
gi|51105371 10473 69 long chain neurotoxin precursor (Opilophagus hamuli)

gi|26397290 70 aa Mass 8099

1 kcfsshdv vtcaggenw flkswdaww gsrqkdsf gcaatpknv gdlccsd
61 ncrphkdr

P82662 91 aa

1 mklrlrvv mtvcdlgy tcfsshdv svtcaggenw dflkswdaww cgsrkdksf
61 gcaatpknv gdlccsd dncrphkdr p

gi|82193162 91 aa

1 mklrlrvv mtvcdlgy tcfsshdv svtcaggenw dflkswdaww cgsrkdksf
61 gcaatpknv gdlccsd dncrphkdr p

gi|166213959 91 aa

1 mklrlrvv mtvcdlgy tcfsshdv svtcaggenw dflkswdaww cgsrkdksf
61 gcaatpknv gdlccsd dncrphkdr p

Cloning steps

1. Primer design
2. mRNA extraction
3. RT-PCR: one step PCR
4. Cloning vector
5. Expression vector : E.coli

1. Primer design :

Ophanin: 720 bp

OPH-Forward 5' ATGATTGCCTTCACCTTGCTAAGTC 3'

OPH-Reverse 5' TTATATTATTTTATTGTGGCAGAAGC 3'

Long-chain neurotoxin: 276 bp

LNTX-Forward 5' ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTT 3'

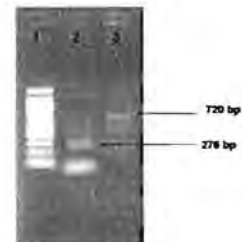
LNTX-Reverse 5' TCAAGGTCTCAATTCGGATGTG 3'

2. mRNA extraction: Qiagen kit

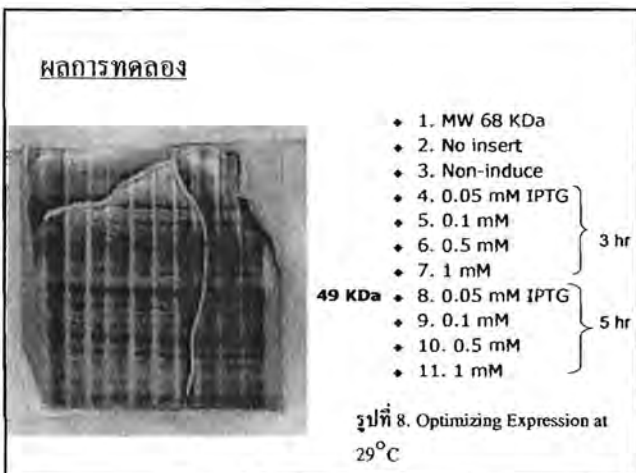
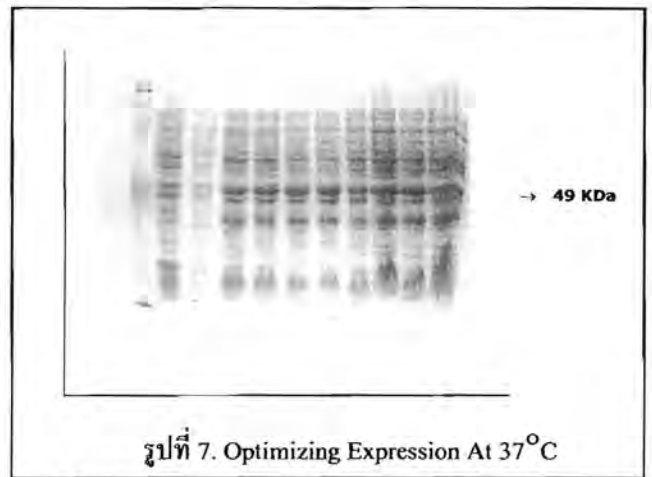
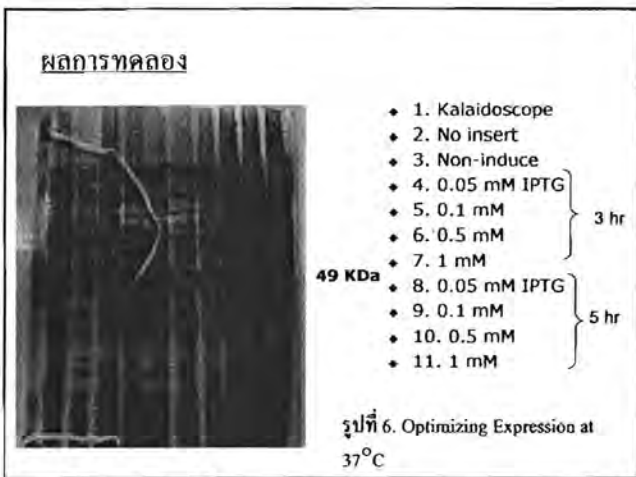
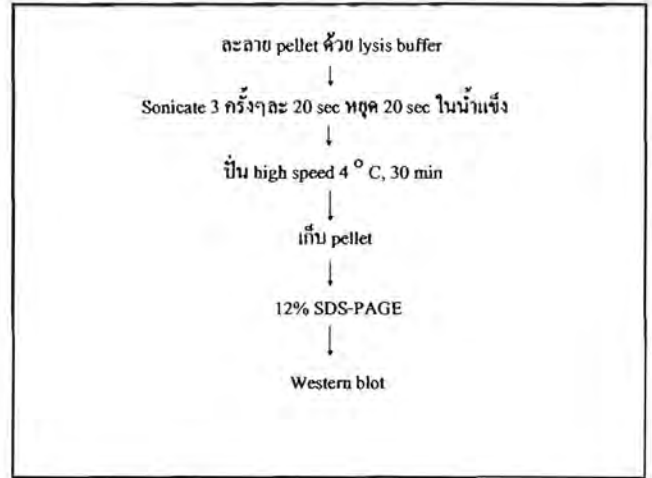
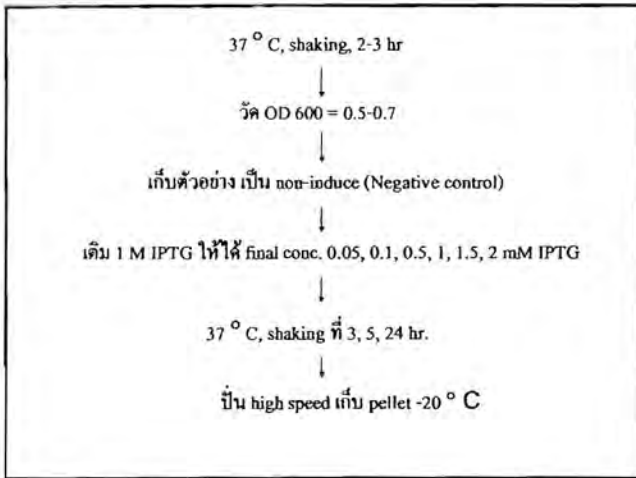
3. RT-PCR: one step PCR ; Qiagen kit

Reaction	RT	50 °C	30 min
		95 °C	15 min
40 Rx		94 °C	1 min
		55 °C	1 min
		72 °C	1 min
		Final	72 °C

Results

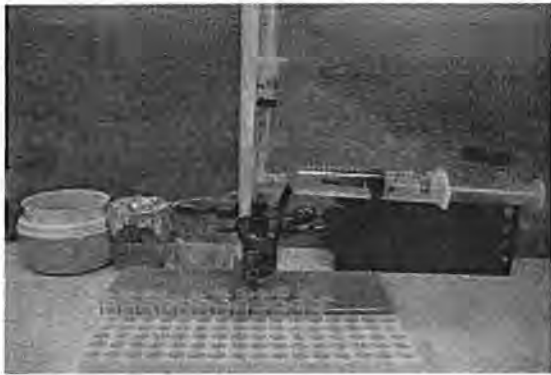


Lane 1: DNA ladder 100 bp lane 2 : PCR product of long-chain neurotoxin 276 bp
lane 3: PCR product of Ophanin 720 bp



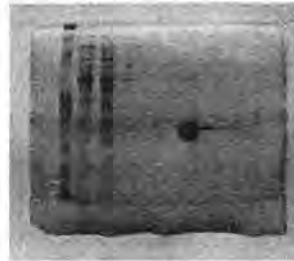
Protein purification

- GSTrap FF column ขนาด 1 ml
- Culture volume 400 ml
- Volume of sonicate 20 ml
- Expression ที่ 37 ° C เวลา 3-4 hr
- Conc. ของ IPTG 0.1 mM,
- Apply ด้วยขั้วข้างครั้งละ 2-3 ml
- Cleavage of GST-tagged protein using thrombin
- วัด OD 280 = 1 → 0.5 mg/ml
- Analyzed by 12% SDS-PAGE



รูปที่ 9. protein purification

ผลการทดลอง จาก 1st Purification



- ◆ Lane 1 Kalaidoscope
- ◆ Lane 2 Fraction 12
- ◆ Lane 3 Fraction 13
- ◆ Lane 4 Fraction 14
- ◆ Lane 5 Fraction 15
- ◆ Lane 6 Fraction 16
- ◆ Lane 7 Fraction 17 ขนาดประมาณ 24 KDa

รูปที่ 10. 12% SDS-PAGE from 1st purification

ผลการทดลอง จาก 2nd Purification



- ◆ Lane 1 Kalaidoscope
- ◆ Lane 2 Fraction 4
- ◆ Lane 3 Fraction 12
- ◆ Lane 4 Fraction 13
- ◆ Lane 5 Fraction 16
- ◆ Lane 6 Fraction 17
- ◆ Lane 7 Fraction 18
- ◆ Lane 8 Fraction 19
- ◆ Lane 9 Fraction 20
- ◆ Lane 12 Concentrated protein from 1st purification

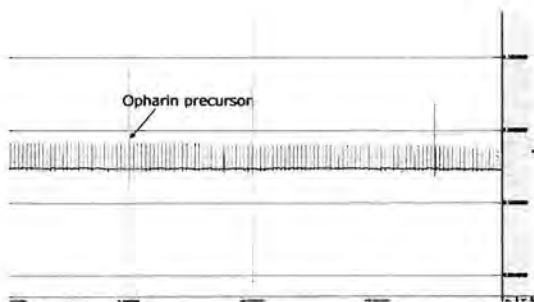
รูปที่ 11. 12% SDS-PAGE from 2nd purification

ผลการทดลอง จาก 3rd Purification



- ◆ Lane 1 Kalaidoscope
- ◆ Lane 2 Fraction 2
- ◆ Lane 3 Fraction 4
- ◆ Lane 4 Fraction 6
- ◆ Lane 5 Fraction 15
- ◆ Lane 6 Fraction 20 = 24 KDa
- ◆ Lane 7 Fraction 22

รูปที่ 12. 12% SDS-PAGE from 3rd purification



รูปที่ 13 . Neuromuscular blockade test of opharin precursor

สรุป

- ◆ โปรตีนที่พบ 2 ตัวคือ Opharin และ Long Chain neurotoxin
- ◆ ผล DNA และ Protein sequencing ของ Opharin precursor ที่ได้ คล้ายคลึงกับที่มีรายงานใน NCBI
- ◆ สภาวะที่เหมาะสมในการ express Opharin precursor คือ 37 ° C เวลา 3-4 hr ที่ IPTG Conc. 0.1 mM
- ◆ โปรตีนที่แยกได้ในแต่ละครั้งมีปริมาณ 0.3 mg/ml
- ◆ Opharin precursor ที่ได้มีฤทธิ์ไม่เท่ากับ fraction ที่แยกได้จากพิษโดยตรง
- ◆ Opharin precursor มีคุณสมบัติเป็นตัว block การทำงานของ smooth muscle contraction มากกว่าเป็น neuromuscular block

โครงการที่ 6

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูจงอางที่
แยกส่วนเพื่อหาส่วนที่มีศักยภาพ
เป็นประโยชน์ทางการรักษา

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

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
ของพิษงูจงอางที่แยกส่วน
เพื่อหาส่วนที่มีศักยภาพเป็นประโยชน์ทางการรักษา

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

วัตถุประสงค์

- เพื่อให้ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
ของส่วนต่างๆที่แยกได้จากพิษงูจงอาง
ที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาต่อไป

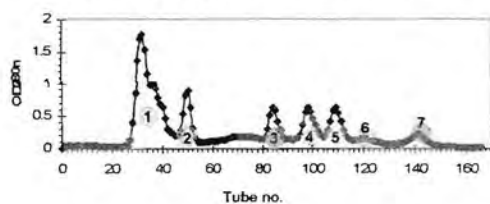
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ได้สารเพื่อพัฒนาตัวยารักษาที่มีฤทธิ์ยับยั้ง
neuromuscular junction
- อาจได้ฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ทางการรักษาใหม่
ที่จะพัฒนาเป็นยาต่อไปได้

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

- นำ 7 ส่วนย่อย (F1 - F7) ของพิษงูจงอาง
ที่แยกได้ในการแยกครั้งที่ 1
จากโครงการย่อยที่ 2 มาศึกษา
 - คุณสมบัติทางชีวเคมี
 - Biological activities

Fractionation of KV on Q-sepharose column



คุณสมบัติทางชีวเคมี

- ปริมาณโปรตีน (Protein content) โดยวิธีของ Bradford
- การศึกษา Enzyme activities
 - Proteolytic activity ตามวิธีของ Kunitz
 - Phosphodiesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan
 - Phosphomonoesterase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan
 - Phospholipase A activity ตามวิธีของ Tan และ Tan
 - L-Amino acid oxidase activity ตามวิธีของ Tan และ Tan
 - Acetylcholinesterase activity ตามวิธีของ Ellman และ กิติยะ

Biological activities

- Hemolysis
- Coagulation
- Cytotoxicity
- Antimicrobial

ผลการวิจัย

Fraction No.	Protein mg/ml (BSA equl.)	Proteolytic Activity (unit)*	PDE Activity (unit)*	PME Activity (unit)*	PLA Activity (L. unit)**	LAAO Activity (unit)*	ACE Activity (unit)*
1	0.71	0.3028	-	15.53	43.64	77.01	-
2	0.54	0.6432	29.63	22.47	34.85	-	-
3	0.67	0.3234	153.50	17.41	139.52	-	-
4	0.75	1.0221	38.67	148.24	179.50	546.67	0.0125
5	0.71	0.3014	53.52	105.87	61.56	13936.75	0.1449
6	0.65	0.8531	27.69	68.09	76.36	-	0.3312
7	0.67	0.3204	-	23.32	1702.40	-	0.0539
Crude	1.01	1.4449	254.05	184.51	394.79	2754.46	0.2230

การศึกษาผลต่อเซลล์มะเร็งกับเซลล์มะเร็งของคน 5 ชนิด พบว่า ส่วนที่แยกได้ส่วนที่ 5 มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งบางชนิด ได้ดีกว่า ยารักษามะเร็ง Doxorubicin ที่ใช้เป็นตัวแทนควบคุมผลบวก

คณะผู้วิจัย

- ทวณิกา จุลสุกนธ์
- อรวรรณ แซ่โก้
- สุจิตตรา ขุนทรัพย์
- อูษา ฤกษ์สิริกุล
- ศศ. โสภิต ชรรมอารี

Cytotoxicity assay

Introduction:

As cancer is one of the major caused of death in the world, many researchers are searching for effective drugs for treatment. Anticancer is one of pharmacological activity of interest.

Bacteria, Plants, Venoms (snake, bee, scorpion, spider etc.)

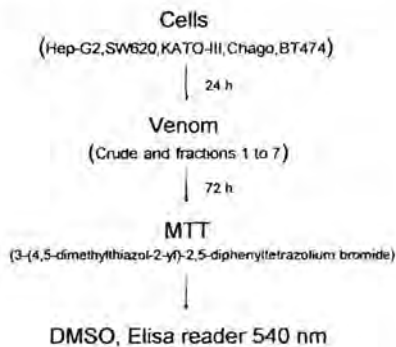
Specific to cancer cells & no effects to normal cells

snake venom: contortrostatin

L-amino acid oxidase

Phospholipase A2 etc.

Method



Method

การคำนวณผล

$$\% \text{ cell survival} = \frac{\text{ค่า OD540 ของเซลล์ที่ทดสอบ} \times 100}{\text{ค่า OD540 ของ Control}}$$

Inhibit concentration 50 % (IC50)

Results

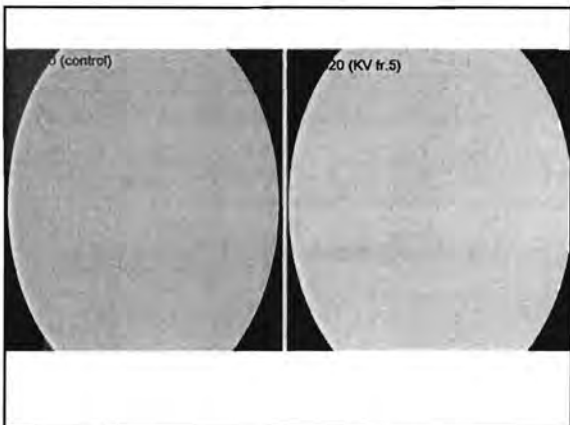
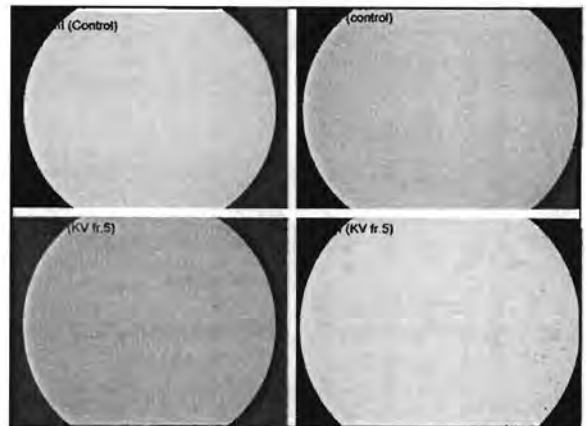
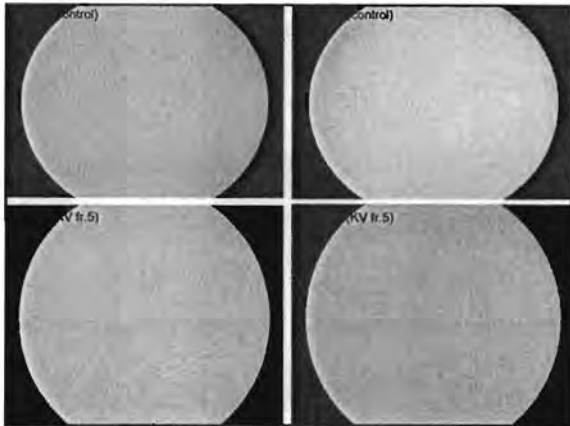
IC50 (µg/ml)

	BT 474	Chago	Hep-G2	KATO-III	SW620
OH2	0.88	0.67	0.79	0.63	0.62
OH6	0.94	0.72	0.67	0.85	0.68
OH9	6.30	6.60	6.52	6.28	0.67
Doxorubicine	0.70	0.55	0.61	>10	0.10

Results

IC 50 (µg/ml)

Fractions	OH fr.1	OH fr.2	OH fr.3	OH fr.4	OH fr.5	OH fr.6	OH fr.7	DOX
KATO-III	>10	>10	>10	>10	0.68	0.49	>10	0.48
HEP-G2	>10	>10	6.78	8.24	0.06	1.51	>10	0.4
SW620	>10	>10	>10	7.38	0.48	0.78	>10	0.57
BT 474	>10	>10	7.61	8.11	0.77	0.87	>10	1.5
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



Conclusion

ผลของพิษของทั้ง 7 fractions ต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ Human Gastric carcinoma (KATA III), Human Duetol carcinoma (BT 474), Human Colon adenocarcinoma (SW620), Human Liver hepatoblastoma (HEP-G2), Human Lung and differentiated (Clago) พบว่า

fraction ที่ 5 มีผลต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด รวมทั้ง CH-liver ซึ่งเป็นเซลล์ต้นปกติของคน

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

เมื่อเปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์ของพิษของผลกับการออกฤทธิ์ของยา Doxorubicin ในแต่ละเซลล์มะเร็ง พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางทรงจันทร์ ภูทอง

ขอบคุณค่ะ

Manuscript

ส่งตีพิมพ์

Study of Quality Specification of Thai King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom for Standardization

Pakmanee N¹, Chulasugandha P¹, Khoo O¹, Noiphrom J¹, Chanhome L¹, and Thamaree S²

¹ Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, Bangkok,

² Dept. of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Bangkok.

Quality specification including physical properties, biochemical properties and biological activities of 9 samples of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom were investigated. The venom samples were extracted from king cobra with different geographic areas and lyophilized. The physical properties of the lyophilized venoms are fine powder with cream or yellow color. There is little density variation in bands of protein analyzed by SDS-PAGE and 2-DE. Similar distribution of protein points in anionic range and low molecular weight were observed. The venoms show activities of phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phospholipase A₂, acetylcholinesterase and L-amino acid oxidase. The venom of *O. hannah* from Petchaboon exhibits higher lethal toxicity and neurotoxicity than those from the southern of Thailand. All venoms do not show coagulation activity. Hemolytic activity of all samples were low. In addition, the venoms inhibit proliferation of cancer cell lines including , breast cancer(BT 474), lung cancer (Chago), liver cancer (HEP-G₂), gastric carcinoma (KATO-III) and colon adenocarcinoma (SW620). High ability of inhibition of cancer cell proliferation was observed in the venoms with high activity of L-amino acid oxidase. These quality specification are the data base for standardization of starting king cobra venoms using in drug development.

Introduction

Preliminary research on the observation of a particular biological activity can lead to discover naturally occurring bioactive compounds. Snake venoms are complex mixture, composed of as many as a hundred different peptides, enzymes and toxins, each with a specific biological activity(1,2,3). The study of these bioactive components can lead to the elucidation of natural pathways. Moreover, these molecules may be useful as lead compounds for seeking to design new drugs.

Snake venoms play two main functions: to immobilize and to digest the prey . The venom toxins and enzymes are usually highly potent and specific for some physiological pathways(4,5). In viper venoms, many enzymes can affect the hematological system ,e.g. hemorrhage, hemolysis and coagulation(5). Many of these proteins have been characterized and used as therapeutic agents. A thrombin-like enzyme (Ancrod)

from the Malayan pit viper has been used to treat thrombosis (6). A class of drugs used to treat high blood pressure and other cardiovascular disorders, ACE inhibitors, captopril, were developed from the venom of a Brazilian snake(7,8). Elapid venoms, e.g. cobra venom, contain postsynaptic neurotoxins which act specifically on nicotinic acetylcholine receptor(9). These toxins are used as instrument for isolation and characterization of the receptor. The postsynaptic neurotoxin of king cobra shows neuromuscular blocking effects, which is similar to that effect of *Clostridium botulinum* neurotoxin. It may be lead compounds for developing skin-tightening or analgesic drug(10,11,12). Because of a large size and a large amount of king cobra venom, it is interested in its venom to use as a source of bioactive compounds that have beneficial attributes in the treatment of various pathophysiological conditions.

In this study, quality specification including physical properties, biochemical properties and biological activities of the samples of *O. hannah* venom were investigated for using as the standard information.

Materials and Methods

Venoms

Nine venom samples were obtained from king cobra snakes in snake husbandry program and snake farm at Queen Saovabha Memorial Institute.

Protein determination

Protein concentration of *O.hannah* venoms were determined by the method described by Bradford (13).

Assays of enzymes

Venom was dissolved (1mg/ml) in normal saline solution and used for determinations of enzyme activity and biological assays. Phospholipase A₂ activity was determined using the method of Tan and Tan (14). Phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities were assayed as described in Tan and Tan (14) and one unit of activity was defined as the amount of enzyme that caused an increase of 0.001 absorbance unit at 440 nm per min. Proteolytic activity was measured using casein as substrate, as described by Tan and Tan(15); one unit of activity is an increase of 1 absorbance unit per hr at 280 nm. L-amino acid oxidase activity was determined as described by Tan et al.(16); one unit of activity is an increase of 0.001 absorbance unit at 436 nm per min. Acetylcholinesterase activity was determined as described by Elliman et al.(17).

Biological assays

Hemolytic activity was measured as described by Karlson et al.(18). The LD₅₀(i.v.) of the venom samples were determined by i.v. injection into the caudal veins of mice (20 ± 2g) and calculated by the Spearman-Kärber method (19). Coagulation activity of venoms were determined by using plasma (MCD-P) and fibrinogen (MCD-F) as described by Theakston and Reid (19). Neurotoxicity was measured by the method described by Bulbring (20). Cytotoxicity of venom samples were measured by inhibition of cell proliferation assay using 5 kinds of cancer cell lines. Inhibition of cell proliferation was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay(21).

SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis and 2-Dimensional electrophoresis

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of *O.hannah* venoms was carried out by the method of Laemmli (22) at pH 8.3 in 10% polyacrylamide gel. The king cobra venoms were also analyzed by 2-dimensional electrophoresis (23,24).

Results and Discussion

Nine samples of *O.hannah* venom are extracted from king cobra snakes that collected from various habitats as shown in Table 1. The samples lot 1,2 ,3 and 4 are belong to king cobra snakes collected from Petchaboon province. The venoms lot 5,6 and 7 are extracted from the snakes from the southern part of Thailand and are fed in the QSMI Snake Husbandry Program. The other lot 8and 9 are also collected from the southern snakes which are fed in the QSMI snake farm. Physical properties of all lyophilized venom samples are observed and shown in Table 2.The venom lot 1 and 2 are fine powder with yellow color. The other 6 samples(lot 3,4,5,7,8and 9) are effervesced cake with creamy color and the another one(lot 6) is yellow effervesced cake. Protein contents of the nine freeze-dried venom samples are approximately 20-28%. From the observation, it found that the venoms collected from the same age of snakes showed similar protein contents. The enzyme contents of the 9 venom samples are comparable as shown in Table 3. The venoms of *O.hannah* exhibit activities of phosphomonoesterase , phosphodiesterase , phospholipase A₂, acetylcholinesterase and L-amino acid oxidase. It is interesting to note that phosphomonoesterase activities in the venoms of king cobra snakes in snake farm are 2 times higher than that of the snakes in the QSMI Snake Husbandry Program. The i.v. LD₅₀ values of the three venom samples(lot 2,6 and 9) are not the same. Lot 2 shows highest toxicity and exhibits approximately 2.7 and 2.5 folds higher toxicity than lot 6 and lot 9. There is little density variation in bands of protein analyzed by SDS-PAGE and 2-DE (Fig 1 and 2). Similar distribution of protein points in anionic range and low molecular weight were observed. It shows a little intraspecific or individual variation in the enzyme and protein composition of *O.hannah* venom. There appears to be same results as the previous study of Tan and Saifuddin (10). Biological activities ,

including coagulation, hemolytic activity and neurotoxicity, of *O.hannah* venoms are shown in Table 4. The venom of *O. hannah* from Petchaboon exhibits higher lethal toxicity and neurotoxicity than those from the southern of Thailand. All venoms do not show coagulation activity. It confirms that the principal effect of *O.hannah* venom is neurotoxicity. Hemolytic activity of all samples were low. Table 5 shows cytotoxicity of king cobra venom on 5 kinds of cancer cell lines. The venoms inhibit proliferation of cancer cell lines including, breast cancer(BT 474), lung cancer (Chago), liver cancer (HEP-G₂), gastric carcinoma (KATO-III) and colon adenocarcinoma (SW620). The results indicate that venoms(lot 2 and 6) of the snakes in the QSMI Snake Husbandry Project induced decreases in cell proliferation of almost of cancer cell lines like anti-cancer drug, Doxorubicine, exception of colon adenocarcinoma (SW620). It is important to note that these two lots of venoms exhibited ten times of decreases in cell proliferation of gastric carcinoma (KATO-III) than doxorubicine. In addition, the high ability of inhibition of cancer cell proliferation was observed in the venoms with high activity of L-amino acid oxidase.

Our results indicated that the venom of *O.hannah* snake has many enzymatic activities and biological activities. These particular biological activities can lead to discover naturally occurring bioactive compounds. The information of lethal toxicity and neurotoxicity of this venom may be useful for development of novel medical therapies to treat venomous snakebite. The previous study of Pu et al.(25), neurotoxin of *O.hannah*, namely hannagesin, showed high potent analgesic action. In addition, its post-neurotoxicity may be useful for develop new skin-tightening like botox. Therefore, the further study of these bioactive compounds of *O.hannah* venom will be occurred. The property of killing cancer cells of *O.hannah* venom is very interested to be lead compounds for developing a new drug cancer treatment. Comparative study of the cancer cell killing ability between on cancer cells and normal cell population should be investigated further. These quality specifications including, physical, enzymatic and biological properties are the useful as information base for standardization of starting king cobra venoms using in drug development.

Acknowledgements - This work was supported by research budgets of the Thai government fiscal year 2006 and 2007.

Table 1 Sources of investigated *Ophiophagus hannah* venoms

Venom sample	Lot No.	Number (bottles)	Weight of venom (g)	Habitat of snake	Feeding place	Age of snake (years)
1	OH250142(1)	2	3.8212	Petchaboon	Snake Husbandry	3
2	OH260542(2)	3	6.5777	Petchaboon	Snake Husbandry	3
3	OH150948-39/1	1	0.5217	Petchaboon	Snake Husbandry	9
4	OH150948-39/2	2	0.6034	Petchaboon	Snake Husbandry	9
5	OH150948-43/1	2	1.7383	South	Snake Husbandry	5
6	OH150948-43/2	2	1.8563	South	Snake Husbandry	5
7	OH150948-43/3	2	1.7886	South	Snake Husbandry	5
8	OHFARM031048/1	1	1.1820	South	Snake Farm	-
9	OHFARM031048/2	1	1.3159	South	Snake Farm	-

Table 2 Physical properties and protein contents of *Ophiophagus hannah* venoms

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

Table 3 Enzymatic activities and lethal toxicity of *Ophiophagus hannah* venoms

Sample no.	Lot	LD ₅₀ µg/mouse	Phosphomono- esterase(U)	Phosphodi- esterase(U)	Proteolytic activity (U)	PLA ₂ (U)	L-amino acid oxidase(U)	Acetylcholin- esterase ^(a) mmole/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

Table 4 Biological activities of *Ophiophagus hannah* venoms

Sample No	Lot	Protein content (BSA* equivalent) (%)	Coagulation		Hemolytic activity (DW Equ.) %	Neurotoxicity 50%inhibition Min.
			MCD-P** mg/L	MCD-F*** mg/L		
1	OH 250142(1)	24.99	NA	NA	1.94	
2	OH 260542(2)	24.56	NA	NA	-	4.20
3	OH 150948-39/1	28.21	NA	NA	0.80	
4	OH 150948-39/2	26.55	NA	NA	0.91	
5	OH 150948-43/1	20.24	NA	NA	10.39	
6	OH 150948-43/2	19.39	NA	NA	8.68	7.74
7	OH 150948-43/3	20.36	NA	NA	0.91	
8	OHFARM 031048/1	23.35	NA	NA	-	
9	OHFARM 031048/2	23.36	NA	NA	11.53	6.44

Table 5 Cell proliferation inhibition of cancer cell lines by *Ophiophagus hannah* venoms

Test substances	IC ₅₀ (µg/ml)				
	BT474 ⁽¹⁾	Chago ⁽²⁾	Hep-G ₂ ⁽³⁾	KATO-III ⁽⁴⁾	SW620 ⁽⁵⁾
OH 260542(2)	0.88	0.67	0.79	0.63	0.62
OH 150948-43/2	0.94	0.72	0.67	0.85	0.68
OHFARM 031048/2	6.30	6.60	6.52	6.28	0.67
Doxorubicine	0.70	0.55	0.61	>10	0.10

⁽¹⁾ breast cancer, ⁽²⁾ lung cancer, ⁽³⁾ liver cancer,

⁽⁴⁾ gastric carcinoma, ⁽⁵⁾ colon adenocacinoma

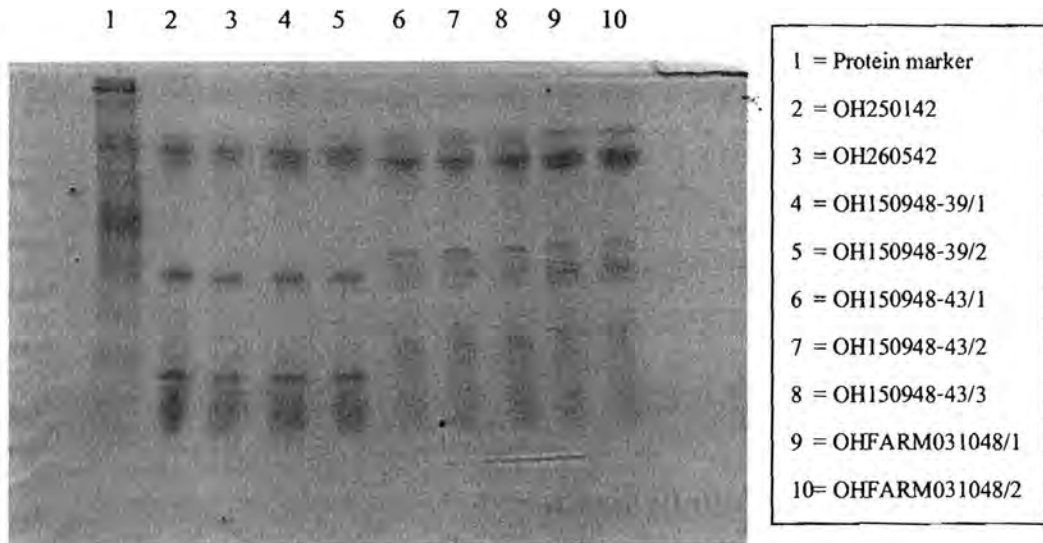


Figure 1 Protein pattern of *Ophiophagus hannah* venoms analysed by SDS-PAGE using 10% gel in pH 8.3

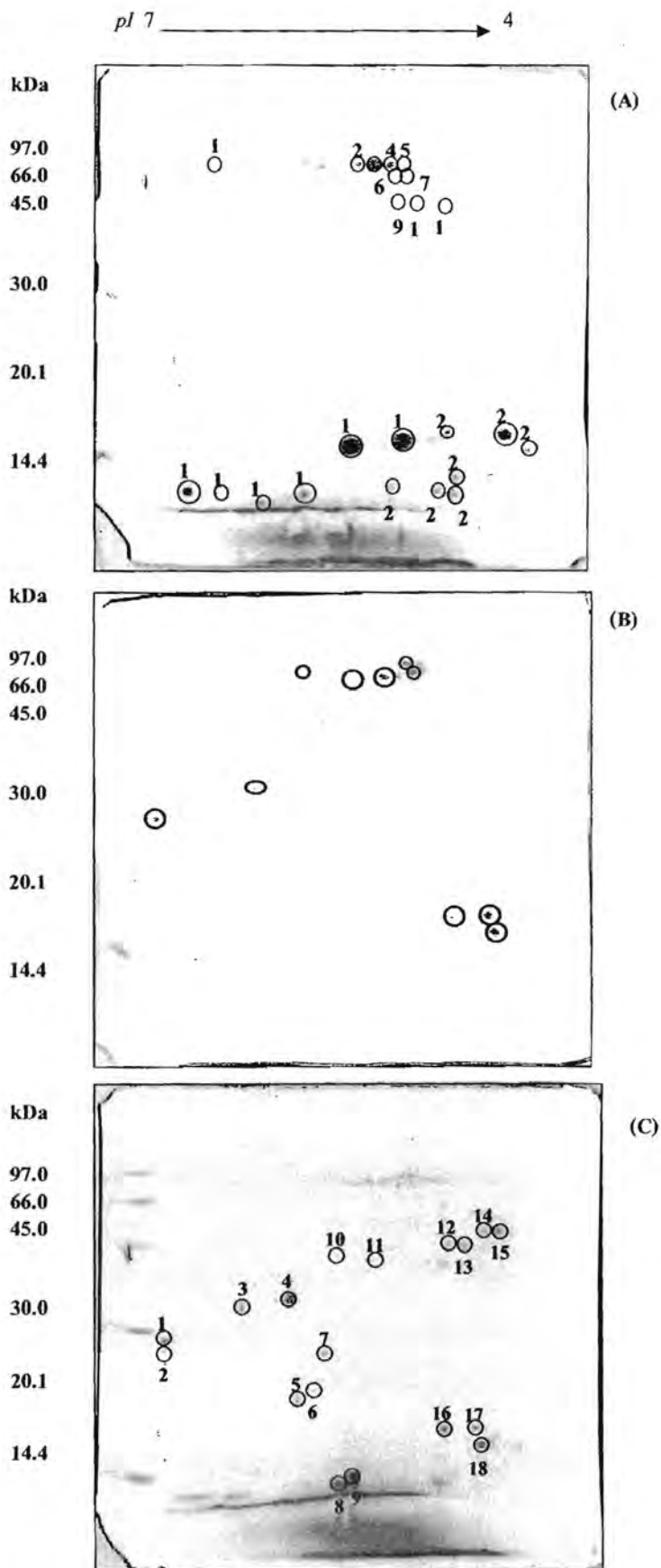


Figure 2 2-DE gel of *Ophiophagus hannah* venoms
(A): OH lot 2, **(B):** OH lot 6 and **(C):** OH lot 9

References

1. Li S, Wang J, Zhang X, Ren Y, Wang N, Zhao K, et al. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. *Biochem J* 2004; 384:119-27.
2. Stocker KF. Research, Diagnostic and Medicinal uses of snake venom enzymes. In: *Enzymes from snake venom*. Bailey GS (ed.). Colorado: Fort Collins. Alaken Inc., 1998: 705-36
3. Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, Jerusalinsky DA. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 1998; 36(11): 1635-40
4. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 1991;29(11):1279-303.
5. Fati R, Mitra P, Sarker S, Bhattacharyya KK. Snake venom hemorrhagins. *Crit Rev Toxicol* 1999;29:1-19.
6. Sherman DG, Atkinson RP, Chippendale T, et al. Intravenous ancrod for treatment of acute ischemic stroke: the STAT study: a randomized controlled trial. *Stroke Treatment with Ancrod Trial. JAMA* 2000;283 (18): 2395-403.
7. Ferreira SH, Vane JR. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. *Br J Pharm Chemother* 1967;30: 417-24.
8. Smith CG, Vane JR. The discovery of captopril. *FASEB J* 2003;17:788-9.
9. Yang CC. Structure and function of cobra neurotoxin. *Adv Exp Med Biol* 1996;391:85-96.
10. Tan NH, Saifuddin MN. Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom and venom fractions. *Toxicon* 1989; 27(6): 689-95.
11. Stupak HD, Maas CS. New procedures in facial plastic surgery using botulinum toxin A. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2003;11(4):515-20.
12. Vartanian AJ, Dayan SH. Complications of botulinum toxin A use in facial rejuvenation. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2003;11(4):483-92.
13. Bradford MN. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72: 248-54.
14. Tan NH, Tan CS. Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension substrate. *Analyt. Biochem.* 1988; 170:282.
15. Tan NH, Tan CS. Thermal stability of snake venom enzymatic activities. In: *Progress in Venom and Toxin Research*. Gopalakrishnakone P, Tan CK (eds.) Singapore: National University of Singapore. 1987 : 188.
16. Tan NH, Kanthimathi MS, tan CS. Enzymatic activities of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. *Toxicon.* 1986; 24: 626.

17. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colourimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmac.* 1961; 7: 88.
18. Karlson E, Amberg H, Eaker D. Isolation of the principle neurotoxins of two *Naja naja* subspecies. *Eur J Biochem.* 1971; 21: 1-16.
19. Theakston RDG, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull Wld Org.* 1983; 61: 949-56.
20. Bülbbring, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *British Journal of Pharmacology* 1 (1946): 38-61.
21. Iwaguchi T, Takechi M, Hayashi K. Cytolytic activity of cytotoxin isolated from Indian cobra venom against experimental tumor cells. *Biochem Int* 1985;10:343-9.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
23. Nawarak J, Sirichaikul S, Wu C-Y, Lian M-Y, Phutrakul S, Chen S-T. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis* 2003; 24: 2838-54.
24. Berkelman, T., and Stenstedt, T. 2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients: Principle and Methods. Sweden: Amersham Biosciences AB, 1998.
25. Pu XC, Wong PTH, Gopalakrishnakone P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus Hannah*). *Toxicon* 1995; 33: 1425-31.

**Fractionation of neuromuscular blocking activity compound
from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom**

Jureeporn Noiphrom¹, Orawan Khow¹ and Sopit Thamaree²

¹Research and Development Department, Queen Saovabha Memorial Institute, Bangkok,
Thailand

²Pharmacology Department, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok,
Thailand

Correspondence : Jureeporn Noiphrom

Research and Development Department,

Queen Saovabha Memorial Institute

The Thai Red Cross Society

1871 Rama IV Rd. , Bangkok 10330, Thailand

Tel.: +66(2)-252-0161 (ext. 161)

Fax: +66(2)-254-0212

ABSTRACT

King cobra venom (KCV) causing muscle paralysis is classified as neurotoxic venom. The neuromuscular (NM) blocking effect of KCV may be of interest for developing a therapeutic agent. Therefore this study aimed at investigating the semi-purified fractions of king cobra venom possessing the neuromuscular blocking action and their mechanisms. Neuromuscular blocking proteins (semi-purified fractions, F1.2.1-F1.2.4) were purified from king cobra venom by chromatography technique using Q-Sepharose, Cellulofine GCL-1000 sf and SP-Sepharose column. F1.2.2 was the most potent fraction, having 18-fold purification of crude with an overall yield of 52.6% of the activity. The molecular weight determined by gel electrophoresis was 8.4 kDa. For NM blocking test using the isolated mouse's phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation, the effect of the test compounds on muscle contraction induced by electrical stimulation of the phrenic nerve was measured. The crude venom showed dose-dependent NM blocking effect. The time taken to produce 50% inhibition of twitch tension was 4.2 ± 0.1 and 7.4 ± 0.4 min for crude venom (80 $\mu\text{g/ml}$) and F1.2.2 (4.4 $\mu\text{g/ml}$), respectively. The study for mechanism of action of F1.2.2 showed postsynaptic action with no direct effect on muscle.

INTRODUCTION

King cobra, *Ophiophagus hannah*, the member of Elapid family, is believed to be the world's largest venomous snake with large amount of venom injection and classified as neurotoxic venom. Human envenomed by *O. hannah* develops muscle paralysis because of its neuromuscular effect. Several therapeutic agents with neuromuscular effect were developed, for example; tubocurarine, the first muscle relaxant used in anesthetic practice; and botulinum toxin which is used to treat blepharospasm and other similar syndromes associated with overactivity of skeletal muscle. King cobra venom and its fractions were

investigated for neuromuscular blocking candidate that might further be developed to be therapeutic agent. Mechanism of action, pre- or post-synaptic and direct effect on muscle, was studied as well.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

O. hannah venom was milked and lyophilized at Queen Saovabha Memorial Institute. Q-Sepharose fast flow (anion exchanger) and SP-Sepharose (cation exchanger) was purchased from GE-Healthcare (Sweden), Cellulofine GCL-1000 superfine was from Seikagaku kogyo Ltd. (Tokyo, Japan). The molecular weight standard for SDS-PAGE (kaleidoscopic prestained) was from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA).

Animals

Male Swiss albino mice (30-40 g) were housed in the Animal Holding Unit of the faculty of medicine, Chulalongkorn University, before use. The mice were kept at 25°C on a 12 h light/dark cycle and had free access to food and water. All animal experiments were done in accordance with the general guidelines proposed by the faculty of medicine, Chulalongkorn University.

Chromatographic procedures

Step1: Cation exchange chromatography on Q-Sepharose fast flow

One hundred milligrams of *O. hannah* venom were dissolved in 5 ml of 0.02 M of Tris-HCl buffer, pH 7.4, and applied to a column (2.5 x 28 cm.) of Q-Sepharose fast flow equilibrated with the buffer. A linear gradient elution was achieved with NaCl from 0 to 0.5 M in 500 ml of the buffer. The fraction volume was 3 ml and the flow rate was 15 ml/h.

Step 2: Size exclusion Chromatography on Cellulofine GCL-1000 superfine

The active fraction from step 1 was concentrated to about 1 ml and applied to a column (2.8 x 29 cm) of Cellulofine GCL-1000 superfine equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.05 M NaCl. The column was eluted with the same buffer with a fraction volume of 1.5 ml.

Step 3: Anion exchange chromatography on SP-Sepharose

The major fraction obtained on step 2. were pooled, concentrated in a collodion bag in *vacuo*, and then dialyzed against 50mM phosphate buffer (pH 6.25). The dialyzed solution was applied to a SP-Sepharose column (1.5 x 21.5 cm) equilibrated with the buffer. The column was eluted with a linear gradient of 0-0.2 M NaCl . Fractions of 1.5 ml were collected at the flow rate of 7.5 ml/h.

The protein content in the fraction was calculated from the absorbance at 20 nm in a 1 cm cell, based upon the assumption that the absorbance of 1 mg/ml crude venom was 1,113

Analytical procedure

SDS-PAGE was performed in 12.5% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS according to Laemmli (1970). A constant current of 3 mA/cm gel was applied. The gel was stained with 0.05% Coomassie brilliant blue R-250 in 25% ethanol-10% acetic acid and destained with the solvent.

Assays

Isolated mouse's phrenic nerve-diaphragm preparation

The phrenic nerve-diaphragm preparations were isolated from 30-40 g male Swiss Albino mice anesthetized with 100% CO₂, then mounted under the ~0.8 g resting tension in

the 25 ml organ bath containing Krebs solution of the following formula (mM): NaCl (118); KCl (4.8); KH_2PO_4 (1.2); CaCl_2 (2.5); NaHCO_3 (25); MgSO_4 (2.4) and D-glucose (11). The solution was maintained at 34°C and aerated with 95% O_2 and 5% CO_2 . The preparations were equilibrated for 40-60 min with 20-30 min interval changing of solution.

Neuromuscular blocking effect of crude venom and its fractions

For indirect stimulation, the phrenic nerve was electrically stimulated with supramaximal (4x thresholds) pulses for 0.2 ms duration at a frequency of 0.1 Hz. The twitch tension was recorded and the time taken to maintain the stable tension was observed (control, n = 10). The twitch tension were stabilized for 10 min before king cobra venom or its fractions were added (n = 5). The final concentrations of crude venom were 5, 10, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{g/ml}$. The testing concentration of fractions was calculated from percentage of protein yield. The time (min) taken to produce 50% inhibition of the twitch tension was observed.

Pre- or post-synaptic activity study

Pre- or postsynaptic action was studied using acetylcholine to induce contraction. Acetylcholine iodide, of the concentration 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M, was added cumulatively to the equilibrated preparations at 5 min interval. Then the preparations were washed at 3 min interval 10 times. The preparations were then allowed to equilibrate for 30 min before nerve stimulation with supramaximal (4x thresholds) pulses of 0.2 ms duration at a frequency of 0.1 Hz. The twitch tension was maintained for 60 min. After that, electrical stimulation was switched off. Acetylcholine iodide of the same concentration, as previously described, was added. The tension, caused by acetylcholine iodide, before and after electrical stimulation, was compared (control, n = 5). For testing of selected fractions, after adding of acetylcholine iodide, washing and electrical stimulating, the preparations were allowed to stabilize for 10 min then the fraction of the concentration as previously described in neuromuscular blockade test was added. The electrical stimulation was

stopped at the time of 60 min and acetylcholine iodide of the same concentration was added again. The tension caused by acetylcholine iodide before and after neuromuscular blockade were compared (n = 5).

Neuromuscular blocking effect on direct muscle stimulation

To abolish neuromuscular transmission, the phrenic nerve was electrically stimulated then tubocurarine chloride (10 μ M, 100 μ l) was introduced. After neuromuscular transmission blocking, the muscle was directly stimulated with supramaximal (4x thresholds) pulses of 2 ms duration at a frequency of 0.1 Hz and the twitch tension was recorded (control, n = 5). For testing of selected fractions, the muscle was allowed to contract for 5 min, then the fraction of the concentration as previously described in neuromuscular blockade test was added and the twitch tension was observed (n = 5).

RESULTS

Crude venom was determined the neuromuscular blocking effect using mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm preparations. The control preparations could maintain stable twitch tension at >95% within 60 minutes. Crude venom caused a dose-dependent neuromuscular blockade and the concentration of 80 μ g/ml was considered to be the lowest concentration that could produce the highest neuromuscular blockade (Fig.1). The step 1 of venom fractionation was presented in Fig.2 illustrating the results of column chromatography on Q-Sepharose fast flow. Crude venom was divided into 7 pooled parts as shown in the table 1.

Among seven fractions (F1 to F7), the highest neuromuscular blocking fraction (F1) was further fractionated, step 2, to obtain fraction F1.1 to F1.3. Fig.3 shows the elution pattern of the cellulofine column. The most potent fraction was presented in the second

peak (F1.2). This fraction was step 3 purified. 4 semi-purified fractions (F1.2.1 to F1.2.4) were obtained, the chromatogram of SP-Sepharose column showing in Fig.4. The apparent molecular weight of semi purified fractions (F1.2.2, F1.2.3 and F1.2.4) was estimated from the results of SDS-PAGE (Figure 5), being 8.4, 9.0 and 7.8 kDa respectively (the calibration curve for estimation of molecular weight is not show). Table 2 summarizes the purification procedure of the neuromuscular block protein in *O. hanan* venom. The conclusion of neuromuscular blockade test of crude venom and all fractions was shown in table 1. Due to strong neuromuscular blockade (Fig.6), fractions F1.2.2 to F1.2.4 were used in study of mechanisms of action. All three fractions showed post-synaptic action. Fig.7 shows the post-synaptic action of fraction F1.2.2 and Fig.8 shows that all three fractions possess no direct effect on muscle.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Ion exchange and size exclusion chromatography are general technique used in venom fractionation. In this study, three steps of chromatography were made to obtain the semi-purified fractions from crude venom, which might or might not be the same neurotoxin as the previous studies of other researches. These fractions should be further identified. The maximum concentration of crude venom suitably applied on 2.5 x 28 cm. ion exchange column is 100 mg. Each fraction from each application would be pooled. Four semi-purified fractions obtained from 1500 mg of crude venom, F1.2.1 to F1.2.4, were 14.07 (0.9%), 43.42 (2.9%), 17.78 (1.2%) and 31.65 (2.1%) mg, respectively. All 4 fractions possessed neuromuscular blocking activity. F1.2.2 was the most potent fraction, having 18-fold purification of crude with an overall yield of 52.6% of the activity. The molecular weight determined by gel electrophoresis was 8.4 kDa.

Neurotoxins, of pre- or postsynaptic action, are the main toxic proteins from snake venom that block neuromuscular transmission. The neuromuscular effect can be

investigated on isolated mouse's phrenic nerve-diaphragm preparations. For control preparation, the twitch tension was stabilized at >95% to assure that after adding of venom or fractions, the tension could hardly be affected by other factors. The tests lasted for 60 minutes that stable tension at >95% could be maintained. The neuromuscular blockade of crude venom was dose-dependent and the concentration of 80 µg/ml was the lowest concentration that produced the highest neuromuscular blockade. The time taken to produce 50% inhibition of the twitch tension of crude venom, fraction F1 and fraction F1.2 was not different. This means that at the same concentration, the fraction was more potent than the crude venom. Each semi-purified fraction took more time to produce 50% inhibition than crude venom. It may be due to calculation of concentration according to percentage of protein yield in each step, the lost of protein during fractionation, the change of protein structure after fractionation or synergism action of fractions.

For the study of mechanism of action, acetylcholine could not induce muscle contraction after neuromuscular blocking by fractions. This proved that the action was post-synaptic. As twitch tension caused by direct stimulation with and without fractions was not significantly different, this showed that fractions had no direct effect on muscle. It might not destroy the muscle. The action of the semi-purified fractions should be at acetylcholine receptor site.

From this study, the semi-purified fraction F1.2.2 is the fraction of interest that should be characterized, further purified and studied to confirm the mechanism of action.

Acknowledgement: This work was supported by research budgets of the Thai government fiscal year 2006 and 2007. Special thanks to Assistant Professor Doctor Sarinee Kalandakanond-Thongsong, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for the useful suggestions and kind help.

REFERENCES

1. Damico D. 2005. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. Toxicon 46:222-229.
2. Fontana MD. 2002. Neuromuscular blocking action of the *Theraphosa blondii* spider venom. Journal of Venomous Animals and Toxins 8:98-101.
3. Harvey AL. 1998. What can toxins tell us for drug discovery? Toxicon 36:1635-1640.
4. Reali M. 2003. Neurotoxic and myotoxic actions of *Naja naja Kaouthia* venom on skeletal muscle *in vitro*. Toxicon 41:657-665.
5. Laemli UK. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
6. Bentsianov, B.; Zalvan, C. and Blitzer, A. 2004. Noncosmetic use of Botulinum toxin. Clinics in Dermatology 22: 82-88.
7. Yee, J. S. P.; Nanling, G.; Afifiyan, F.; Donghui, M.; Lay, P. S.; Armugam, A. and Jeyaseelan, K. 2004. Snake postsynaptic neurotoxins; gene structure, phylogeny and applications in research and applications in research and therapy. Biochimie 86: 137-149.
8. Yang, C. C. 1984. Snake neurotoxins. The Snake 16: 90-103.
9. Bern, R. M.; Levy, M. N.; Koeppen, B. M. and Stanton, B. M. 2004. Physiology. 5th ed. U.S.A.: Mosby,
10. Meunier, F. A.; Schiavo, G. and Molgo, J. 2002. Botulinum neurotoxins: from paralysis to recover of functional neuromuscular transmission. Journal of Physiology 96: 105-113.
11. Garland, M. C.; Foreman, R. C.; Chad, J. E.; Holden-Dye, L. and Walker, R. J. 1998. The actions of muscle relaxants at nicotinic acetylcholine receptor isoforms. European Journal of Pharmacology 357: 83-92.
12. Tatro, D. S. 2000. Drug facts 2nd ed. U.S.A.: Facts and comparisons,
13. Lee, C. Y. 1979. Snake Venom U.S.A.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg ,

14. Joubert, F. J. 1973. Snake venom toxins: The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure 317: 85-98.
15. Tan, N. H. and Saifuddin, M. N. 1989. Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom and venom fractions. Toxicon 27, 6: 689-695.
16. Chang, C.; Huang, T. Y.; Kuo, K. W.; Chen, S. W.; Huang, K. F. and Chiou, S. H. 1993. Sequence characterization of a novel α -neurotoxin from the king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom. Biochemical and Biophysical Research Communications 191, 1: 214-223.
17. Lin, S.; Chang, L. and Chang, C. 1999. Disulfide isomers of α -neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. Biochemical and Biophysical Research Communications 254: 104-108.
18. Chang, L.; Liou, J.; Lin, S. and Huang, H. 2002. Purification and characterization of a neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hanna* (king cobra) venom. Biochemical and Biophysical Research Communications 294:574-578.
19. De, P.; Dasgupta, S. C. and Gomes, A. 2002. A lethal neurotoxic protein from Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. Indian Journal of Experimental Biology 40, 12: 1359-64.
20. He, Y. Y.; Lee, W. H and Zhang, Y. 2004. Cloning and purification of alpha-neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*). Toxicon 44, 3: 295-303.
21. Pu, X. C.; Wong, P. T. H.; and Gopalakrishnakone, P. 1995. A novel analgesic toxin (Hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) Toxicon 33, 11: 1425-1431.

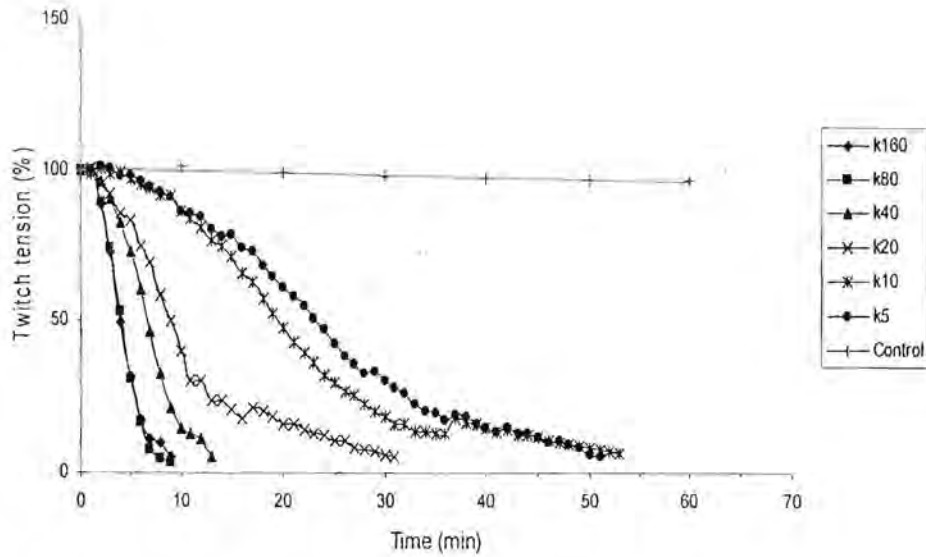


Figure 1 Neuromuscular blockade of the isolated mouse's phrenic nerve-diaphragm preparation induced by crude king cobra venom.

Each line represented the average of five experiments from each concentration of 5, 10, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{g/ml}$ (k5, k10, k20, k40, k80 and k160, respectively) of the crude venom. Control data was collected from ten experiments.

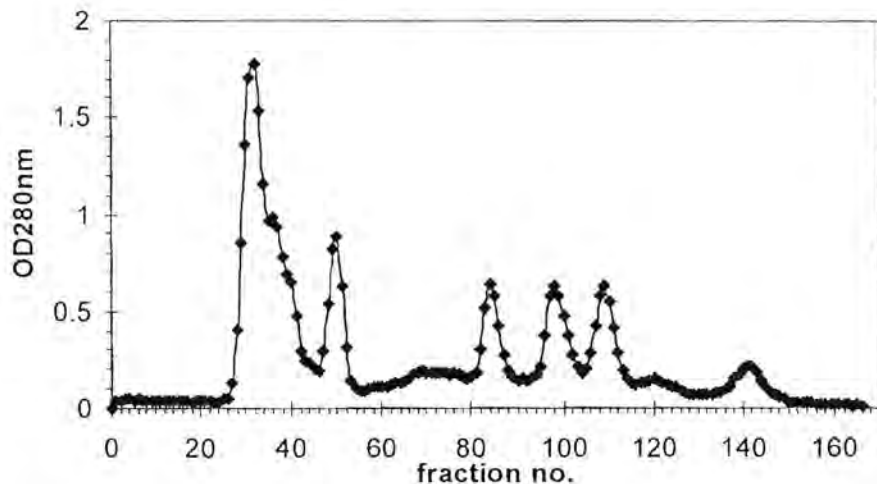


Figure 2 Ion-exchange. One hundred milligram of *O. hannah* venom dissolved in 5 ml of 20 mM Tris-HCl pH 7.4 were applied to a column of Q-Sepharose equilibrated with the buffer. The column was eluted with a linear gradient from 0 to 0.5 M of NaCl in the buffer and 3 ml fractions were collected.

Table 1 Time taken to cause 50% inhibition of the twitch tension by crude king cobra venom and its fractions

Fraction No. (Tube no)	Yield (%)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Time taken to cause 50% inhibition (min)	Twitch tension at the 50 th minute after fractions added (%)
crude	-	80	4.2 ± 0.1	-
Q-Sepharose column				
1 (27-42)	38.1	30.5	4.6 ± 0.2	-
2 (46-54)	10.4	8.3	-	83.4 ± 2.1
3 (80-89)	9.3	7.4	-	70.7 ± 1.9
4 (95-104)	11.3	9.0	-	67.5 ± 4.5
5 (105-115)	11.3	9.0	-	90.1 ± 2.9
6 (118-128)	4.1	3.3	-	84.3 ± 2.9
7 (136-148)	5.4	4.3	-	83.5 ± 2.7
Cellulofine column				
1.1 (68-74)	23.9	7.3	42.8 ± 2.7	-
1.2 (75-86)	54.4	16.6	4.3 ± 0.3	-
1.3 (92-101)	29.2	8.9	-	70.5 ± 3.1
SP-Sepharose column				
1.2.1 (15-21)	8.5	1.4	30.7 ± 2.0	-
1.2.2 (23-30)	26.8	4.4	7.4 ± 0.4	-
1.2.3 (32-38)	10.2	1.7	12.8 ± 0.3	-
1.2.4 (39-50)	22.2	3.7	9.5 ± 0.5	-

Data was expressed as mean \pm S.E.M (n = 5).

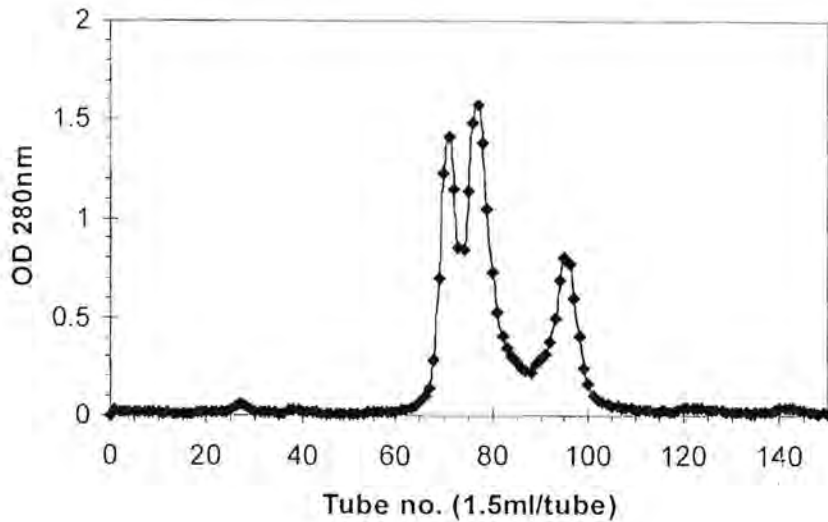


Figure 3 Gel filtration. The neuromuscular block fraction in Figure 2 were pooled and applied to a column of cellulofine GCL-1000 sf.

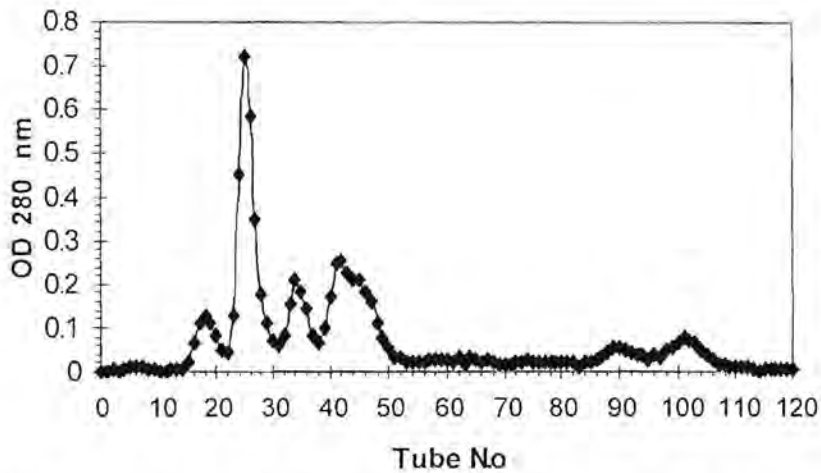


Figure 4 Column chromatography on SP-Sepharose. The major fraction in Figure 3 (tube no. 75-86) was concentrated and dialyzed against 50 mM phosphate buffer pH 6.25. The dialyzed solution was subjected to a chromatography on SP-Sepharose column with a linear gradient from 0 to 0.2 M NaCl. 1.5 ml fractions were collected.

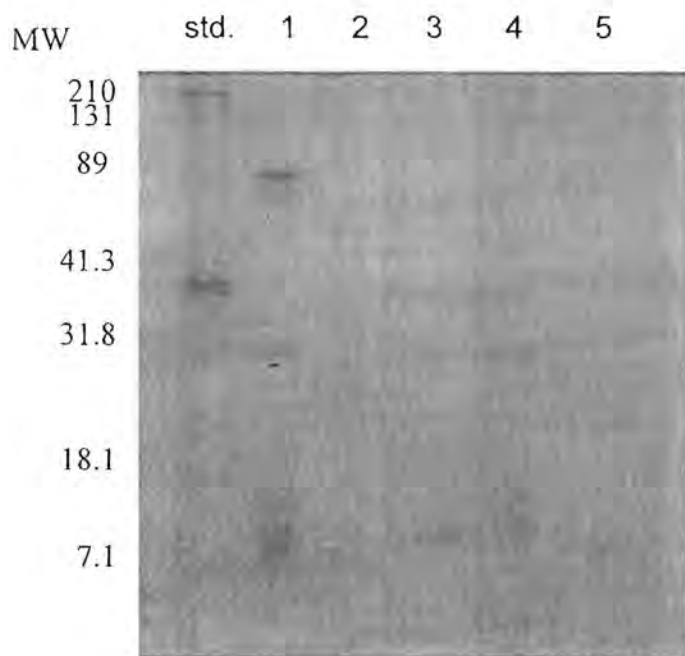


Figure 5 SDS-PAGE of the semi-purified fractions electrophoresis was performed in 12.5% PAGE containing 0.1%SDS according to Laemmli (1970). Lane 1 kaleidoscopic prestained standard; lane 2 crude venom 12 µg; lane 3 F1.2.1, 10 µg; lane4 F1.2.2, 10 µg; lane 5 F1.2.3, 10 µg; and lane 6 F1.2.4, 10 µg.

Table 2 Summary of the purification of the active neuromuscular blocking agent

Purification step	Protein mg	Activity (µg/ml)	Total activity	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude venom	1500.0	80.0	187,500	1	100
Q-Sepharose F1	586.3 (39.1%)*	30.5	167,514	2.6	89
Cellulofine GCL-1000 sf F1.2	235.2 (15.7%)	16.6	141,686	4.8	75.6
SP-Sepharose F 1.2.1	14.1(0.9%)				
F 1.2.2	43.4(2.9%)	4.4	98,636	18.2	52.6
F 1.2.3	17.8(1.2%)				
F 1.2.4	31.6(2.1%)				

* The figures in parentheses are percentage calculated against crude venom.

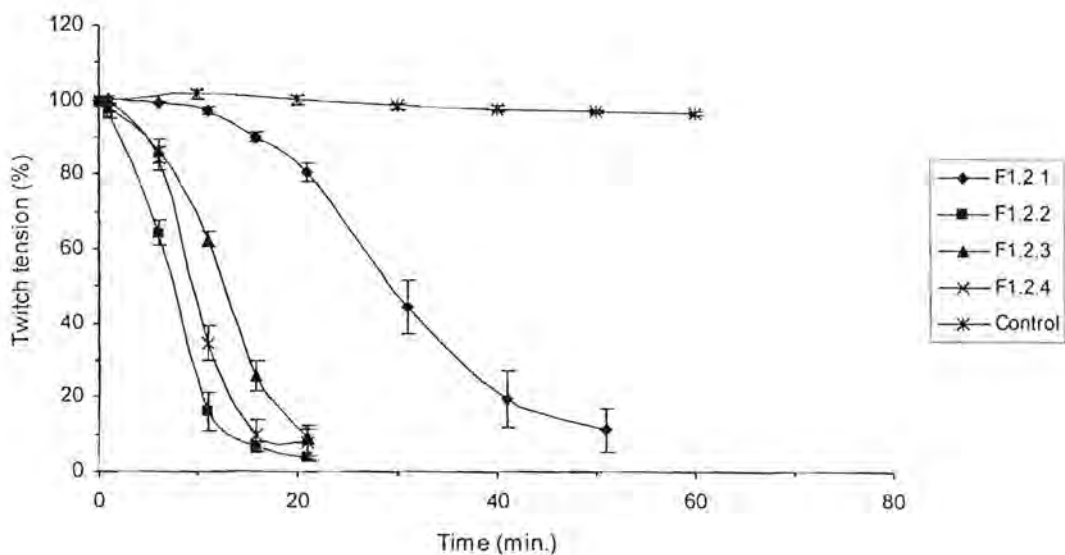


Figure 6 Neuromuscular blockade of the isolated mouse's phrenic nerve-diaphragm preparation induced by semi-purified fractions (F1.2.1 to F1.2.4)

Each line represented the average of five experiments from each concentration, showing in table 1, of each fraction. Control data was collected from ten experiments.

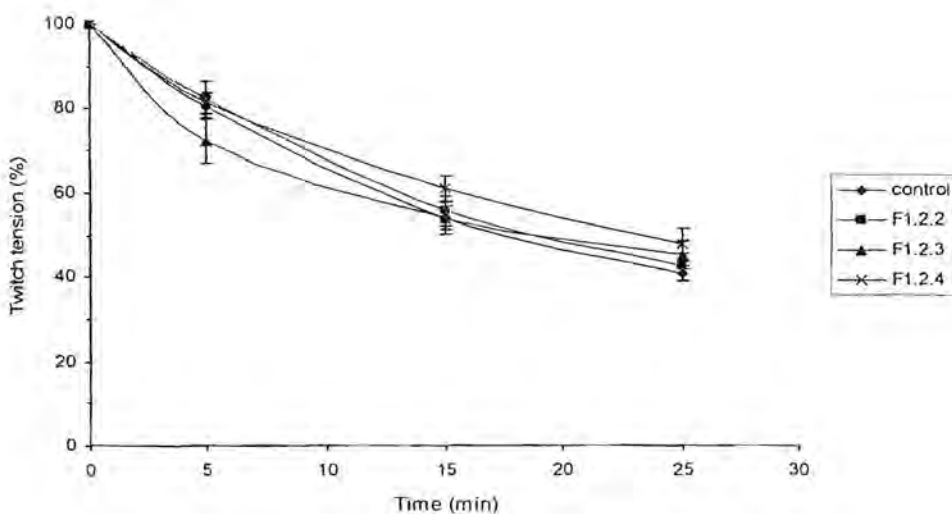


Figure 8 Effect of semi-purified fractions No.1.2.2, No.1.2.3 and No.1.2.4 (F1.2.2, F1.2.3 and F1.2.4 respectively) on direct muscle stimulation after neuromuscular blocking by tubocurarine

Direct muscle stimulation, after neuromuscular blocking by tubocurarine, at time 0 showed 100% contraction. Each line represented the average of five experiments of each fraction. Control data was collected from ten experiments.

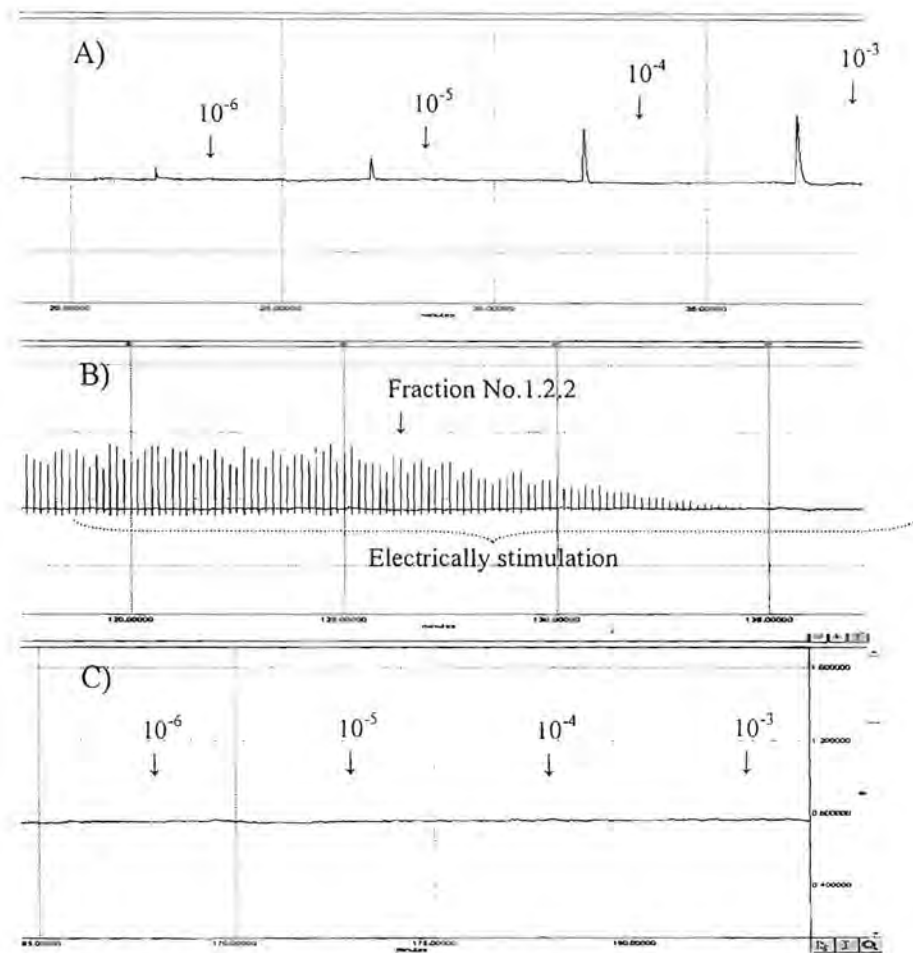


Figure 7 A) The tracing of muscle contraction induced by exogenous acetylcholine (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M) B) Neuromuscular blockade caused by the fraction No.1.2.2 and C) the contraction induced by exogenous acetylcholine (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M) after neuromuscular blockade by fraction No.1.2.2

**PROTEIN COMPOSITIONS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES FROM KING
COBRA SNAKE *Ophiophagus hannah* VENOM**

Abstract

In this research comparison of biochemical properties and biological activities of different age and region of originate of three *Ophiophagus hannah* venoms. Biological activity was measured by cytotoxicity (IC_{50}) in cell line. KV2, crude venom showed higher toxicity than KV6 and KV9 venom. Comparative proteins of *O.hannah* venoms were separated by 1-D gel electrophoresis, 2D-gel electrophoresis and reverse-phase HPLC. Although protein compositions in all venoms were similar, KV2 venom was very difference from each other venom. The protein banding of KV2 in SDS-PAGE showed high expression of all bands. 2DE gel of KV2 has many low molecular weight (14 kDa) spots. Spot No.2 and spot No.4 of KV2 are not found in KV6 and KV9 in 2DE gels. From peptides mass mapping by MALDI-TOF MS and amino acid sequence database searching, the amino acid sequence of protein spot 2 and spot 4 are similar to partial amino acid residue of phospholipase group from *O.hannah* venom. The RP-HPLC pattern of KV2 is different from other venoms. The eluted in range 31-41% ACN have high protein concentration than other venoms in same range. All of results indicated that variable protein composition were cause of difference in toxicity. The amino acid sequence of fraction 1.2.2 and 1.2.3, which were separated by ion exchange chromatography and gel filtration chromatography, were similar to partial amino acid residue of natrin and ophanin from *Naja Atra* and *O.hannah* venom respectively.

Keywords: *Elapidae* / Venom / *Ophiophagus hannah* / Biological activity

1. Introduction

Ophiophagus hannah (King cobra) belongs to the Elapidae family, and is believed to be the world's largest poisonous snake. Elapidae snake venoms usually contain

neurotoxins, phospholipaseA₂(PLA₂) enzymes and cardiotoxins (cytotoxins), especially neurotoxin with small molecules that can be absorbed very quickly into victims' blood circulation and cause death with short time. The α -neurotoxins are usually classified into short-chain neurotoxins (of 60~62 residues and four conversed disulfide bridges) and long-chain neurotoxins (of 66~75 residues and five conversed disulfide bridges) [1]. Several α -neurotoxins have been purified from *O. hannah* venom and well characterized, including nineteen long-chain neurotoxins [2-9], ten short-chain neurotoxins [7, 8, 10], five weak toxin [7-9, 11] and Muscarinic toxins (MTXs) [8, 9] belong to the neurotoxin group, members of which interfere in the transmission of nervous impulses by selectively binding to particular receptors in the nerve or muscular membrane. The major members of the cardiotoxin group [8, 9] exhibit quite different pharmacological properties, such as cytolysis, haemolysis and heart failure. Snake venom phospholipaseA₂ (PLA₂) enzymes [12-14] are low molecular weight (13-15 kDa) protein and exhibit a wide variety of pharmacological effect such as hemolysis, platelet aggregation inhibition, neurotoxicity and myonecrosis. Thioredoxin [13] (Lee et al., 2000), ophanin [15] (Yamazaki et al., 2003), venom chymotrypsin inhibitor [16] (Chang et al., 2001), L-amino acid oxidase [17] (Ahn et al., 1997) and ohanin [18] (Pung et al., 2006) are also reported. Different biological activity of crude venoms of *O.hannah* originating from different regions lead to the study of the composition of *O.hannah* venoms is focused on chemical substances of these venoms and comparison with the same species in different originated. The results will be used as basic information for venom analysis, medicinal production and medical treatment that have its own specific characteristics.

2. Materials and method

2.1 Snake venoms

Three Crude *Ophiophagus hannah* venom (KV2, KV6 and KV9) were collected from different regions of Thailand and keep at 4 °C (Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, Bangkok Thailand). Three samples were prepared: KV2 collected from snake from Petchabun Province (3 year olds snake), KV6 collected from the south of Thailand (5 year olds snake) and KV9 collected from South part of Thailand. (For this sample, there are no data on the age of snakes)

Fractions 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3 and 1.2.4, were fractionated from KV2 sample by ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography, were obtained from the Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, Bangkok Thailand. The crude venom was lyophilized and stored at 4 °C before use.

2.2 Determination of protein by Bradford method

Protein content was determined according to the method described by (Bradford, 1976) Venoms were dissolved in water (1 mg/mL) and using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

2.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was carried out according to Slater *et al* (1990) with a slight modification. Polyacrylamide gel at 15% was used as separating gel and 3% of the gel was used as stacking gel. Sample of crude venoms were dissolved in water (10 mg/ml). The electrophoresis was carried out at constant current of 15 mA, on a Mini-Protein (Hoefer mini VE) from cathode toward anode. When the electrophoresis was completed, the gel was stained with Coomassie blue R-250.

2.4 Two-Dimensional Electrophoresis of Snake Venom [19]

The 2-D electrophoresis separation was performed as described in the manual of 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Immobiline DryStrips (7 cm; pH 3–10 and pH 4-7, Amersham) were rehydrated overnight with rehydration buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 2% IPG buffer pH 3-10 or 4-7, 0.2% DTT, 0.002% bromophenol blue) containing approximately 300 µg of the venom proteins. Running was performed in a Multiphor II Isoelectric focusing (IEF) system from Amersham Pharmacia Biotech. Electrical conditions were as described by the supplier. After the first-dimensional run, the IPG strip was equilibrated for 15 minutes in the

equilibration solution (50mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 1% DTT, 0.002% bromophenol blue), then equilibrated for 15 minutes in the equilibration solution that replaced DTT with 2.5% iodoacetamide. The second dimension electrophoresis was carried out on 15 %T acrylamide gel. The running condition was as follow: 10 mA/gel for 15 minute and 20 mA/gel until bromophenol blue dye front reached the bottom of the gel. Lastly, the each gel was strained by coomassie brilliant blue G stained.

2.5 In-gel digestion [20]

Protein bands or spots were manually excised from the polyacrylamide gels and transferred to a microcentrifuge tube. The gel pieces were washed with 100 µl of 100 mM ammonium bicarbonate/acetonitrile (1:1, vol/vol) and incubate with occasional vortexing for 30 min, depending on the staining intensity. After that add 500 µl of neat acetonitrile and incubate at room temperature with occasional vortexing, until gel pieces become white and shrink and then remove acetonitrile and dry gel pieces for saturate gel pieces process. When gel pieces were dried, add enough trypsin to cover the dry gel pieces and leave it in an ice bucket or a fridge. Leave gel pieces for another 90 min to saturate them with trypsin and then add 10-20 µl of ammonium bicarbonate buffer to cover the gel pieces and keep them wet during enzymatic cleavage. In digestion process, place tubes with gel pieces into an air circulation thermostat and incubate samples overnight at 37 °C. The peptides were extracted with extraction buffer (1:2 (vol/vol) 5% formic acid/acetonitrile) 100 µl and incubate for 15 min at 37 °C in a shaker and then collected supernatant. For samples with much larger (or smaller) volume of gel matrix, add the extraction buffer such that the approximate ration of 1:2 between volumes of the digest and extraction is achieved. These solutions were dried and kept at -20°C for further analysis.

2.6 High performance Liquids Chromatography (HPLC)

Analysis of venoms was performed using a reverse-phase HPLC column (4.6 x 250 mm, Nucleosil7 C18) attached to a L-4250, UV-VIS detector and L-7100 pump with a 20 µL sample injection loop. The separation was done by the gradient elution of two solvent systems. The two solvents used were HPLC-grade acetonitrile (solution A) and 0.1% TFA DI-water (solution B). Both solution A and B were filtered through 0.45 µm pore size filter paper. Before sample injection, the column

was equilibrated with solution B by flow the solution through the column at flow rate of 1 ml/min for at least 30 min. *O. hannah* venom (1 mg) was dissolved in 0.1 ml of distilled water. The solution was filtered through Millipore filter paper (0.45 µm pore size). The column was maintained at room temperature. A linear gradient of 0% ACN to 100% ACN (0-70% mobile phase B) in 60 min running times at a flow rate at 1 ml/min was used. Detection was done by UV detector set at 280 nm. The fractions collected were kept at 4 °C until need.

2.7 Protein Identification Methods

Mass spectra of protein and peptide were acquired using a MALDI/TOF mass spectrometer (MICROFLEX, Bruker, USA) operating in linear and reflecton modes. The dried samples were dissolved in 50% ACN/ 0.1% TFA and vortexed. The dried droplet method was used for MALDI-MS sample preparation. Cyano-4 hydroxycinnamic acid (CCA) was used as the matrix. For proteins, 1 µl of a sample solution was mixed with 1 µl of a matrix solution (saturated CCA in 50% ACN/ 0.1% TFA). Peptide mass mapping obtained from each digested protein were searched against protein database via the MASCOT program (www.matrixscience.com). Search parameters allowed for carbamidomethylation of cysteine, one missed trypsin cleavages, and 100 ppm mass accuracy. Peptides in the mass range of 800-3,500 Da were selected for database search.

2.8 Antioxidant activity

Prepared DPPH solution at 200 µM in absolute ethanol (freshly prepare) and kept in dark by covered with aluminium foil until use. 1 mg/ml of Crude sample and vitamin E (positive control) was the stock. The appropriate concentration of sample were added in vary concentration such as 200, 100, 80, 60, 40, 20, 0 µg/ml. Added 800 µl of DPPH into tube. The mixture was shaken and incubated at 37°C for 30 min. The absorbance was measured at 517 nm.

2.9 Measurement of cytotoxicity

Cytotoxicity of *O.hannah* venoms was tested against cell line by MTT assay, analyzed at Antibody Production, The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University.

2.10 Tandem MS

Tandem mass spectrometric analysis was performed on the ESI-Q-ToF mass spectrometer (Korea Basic Science Institute, Systems Biology Core Facility, Korea). The tandem MS spectra were searched against a protein sequence database using the MASCOT program (www.matrixscience.com).

3. Results and discussion

3.1 Strategy to comparison biological activity and protein composition of *O.hannah* venom

The experimental procedure is depicted in Scheme 4.1 and 4.2. Scheme 1 shown strategies for comparison of biological activity and protein composition of three crude *O.hannah* venoms (KV2, KV6 and KV9) which were collected from different regions of Thailand. Strategy for analyzed protein fractions of KV2 venom were shown in Scheme 2. From the report of the Queen Saovabha Memorial Institute shown KV2 have toxicity higher than other venom. They were interested proteins in KV2 venom that have neuromuscular block activity for improve to new drug.

4.2 Comparison of biochemical and biological activity of *O.hannah* venoms

The biochemical and biological activity of the three crudes *O.hannah* venom samples are shown in Table 1. Protein contents of the three freeze-dried venom samples are all approximately 40% and the IC_{50} values of the three venom samples are difference between KV2 and KV6. (In KV9, inhibition growth of cell line is lower 50%) That result indicated that KV2 has highest toxicity in venom samples in agreement with LD_{50} values. The cytotoxicity values are also the same with that reported earlier by Ahn, M.Y. *et al.* (1997) [17] who reported values 3 $\mu\text{g/ml}$ for human gastric carcinoma cell line (CRL 5971). The antioxidant values of three crude venoms have the EC_{50} lower than 50%, thus it cannot be calculate values of EC_{50} .

4.3 The analysis of venoms using SDS-PAGE

Protein pattern of the venom samples in SDS-PAGE is shown in Figure 1. The protein bands were distributed in the wide range molecular mass of between 97 kDa to 14.4 kDa. All venoms show a majority of protein bands with molecular masses higher than 45 kDa and lower than 20 kDa. The distribution patterns and the number of bands detected were similar for all samples, but differences were observed in intensity of several bands while amount of loading samples were same. Almost all of major bands in KV2 had higher intensity than in other samples except of the band at 66 kDa which its intensity is lower than sample KV9. KV6 and KV9 exhibited two components clearly visible as separate bands in the area at 29 and 26 kDa whereas the samples KV2 exhibited only one band at 29 kDa.

4.4 Comparison of 2-DE gel patterns of venom samples from *O.hannah*

After that all sample were subjected to analyze by 2-DE gel. The results were shown in Figure 2 A-C. The 2-DE gel images of three venoms are very similar. Almost of spots are located at molecular mass range between 97 kDa and 14.4 kDa. Each spot in 2-DE gel represents individual protein that was summarized in Table 2. Differences in pattern and number of spot from three venom samples are seen at molecular weight below 14.4 kDa, especially KV2 sample, which shown number protein spots more than other samples. KV2 sample have a lot of spots than KV6 and KV9 samples in all gel except a range of 45-30 kDa. This might be the reason why KV2 samples have a higher of the lethal toxicity and cytotoxicity than other samples that confirm with previous protein in *O.hannah* venom study, which suggested that the most of toxins in *O.hannah* venom have low molecular weight.

4.5 Protein identification of protein spots

After the venoms were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and detected with Coomassie blue stained, some visible protein spot were excised and subjected to digestion with trypsin. The molecular weight of each tryptic fragment was analyzed by MALDI-TOF MS. The molecular mass results were used for performing of protein peptide mass mapping via MASCOT [21]. The search results are shown in Table 3 even though many searched results were not reasonable, they might be new proteins or the data set is not enough for protein identification. Therefore, the sequencing techniques are required for further protein identification. From the searching result, some of protein spots found in KV2 sample were higher score expect than the same protein which found in KV6 and KV9 sample such as spot No.1 which appears in all of samples were match to ophanin [22] from *O.hannah* venom. Spot No.7 of KV2, spot No.10 of KV6 and spot No.13 of KV9 were match to Chain A of an acidic phospholipaseA2. The gel of KV2 showed 11 individual protein spots. Some interested protein in this series as spot No.2 and spot No.4 which were match to protein in venom and expected score are significant. Spot No.2 and spot No.4 were match to phospholipaseA2 [13, 23] and phospholipaseA2 acidic 1 precursor [12] respectively, this protein is an acidic protein exhibiting cardiotoxicity, myotoxicity, and antiplatelet activity.

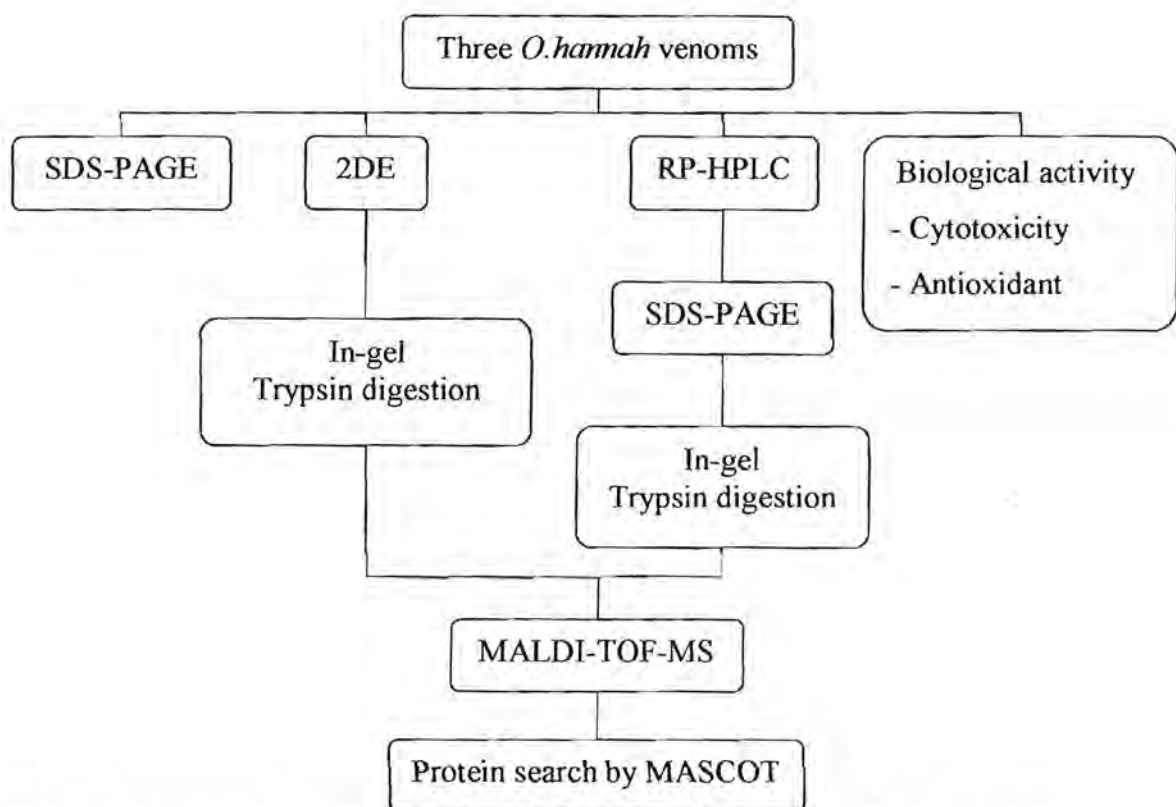
4.6 The analysis of venoms using RP-HPLC

The RP-HPLC chromatogram is shown in Figure 3. The concentration of proteins of each fraction is shown in Table 4. RP-HPLC chromatograms from three venoms showed concentration of major protein peaks in range of 10 – 60 % ACN indicating that the venoms varied in hydrophobic properties. KV6 and KV9 analyzed here have similarity pattern, the large protein peaks were eluted in the range 26-30 % ACN and small peaks were eluted in the range 31-50% ACN. The HPLC pattern of KV2 is different from other venom, the large protein peaks were eluted in the range 26-50 % ACN and small peaks were eluted at 10 and 18% ACN. The RP-HPLC results obtained also clearly confirmed that although the venoms had an overall similarity in their components, there were both qualitative and quantitative differences between the venoms from the three different regions. One of the most obvious differences between the venoms can be seen when the HPLC profiles for KV2 and other venom are compared in the region where the eluting gradient of acetonitrile has a concentration of 31–41%. It appears that the venom of KV2 contains higher concentration of the components which elute in this part of the gradient. The eluted fractions were analyzed further by SDS-PAGE to check separation efficiency. Band proteins from SDS-PAGE (Figure 4) were pooled for in-gel tryptic digestion. All digestion peptides were analyzed by MALDI-TOF MS. The searched results were not significant. Sometimes more than one candidate for identity of the protein can be found, whereupon additional information obtained by sequencing techniques is generally used to constrain the search.

4.9 Protein Identification of fractions from ion exchange chromatography and gel filtration chromatography

The four fractions were collected from ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography. The purity of fractions was identified by SDS-PAGE. The result was shown in Figure 5. The SDS-PAGE gel shows the band at molecular weight rang 30-20.1 kDa both of Fraction 1.2.2 and 1.2.3. Based upon results from SDS-PAGE bands were pooled for in-gel digestion. Digested peptides, obtained from the digestion of gel from SDS-PAGE, were analyzed by ESI-Q-TOF MS. (Korea Basic Science Institute, Systems Biology Core Facility, Korea). Peptide mass mapped and partial sequencing by ESI-Q-TOF MS of Fraction 1.2.2 and 1.2.3. From the result

of database searching, partial amino acid sequence of fraction 1.2.2 and 1.2.3 were nearly coincided with partial amino acid sequence of ophanin and Natrin.

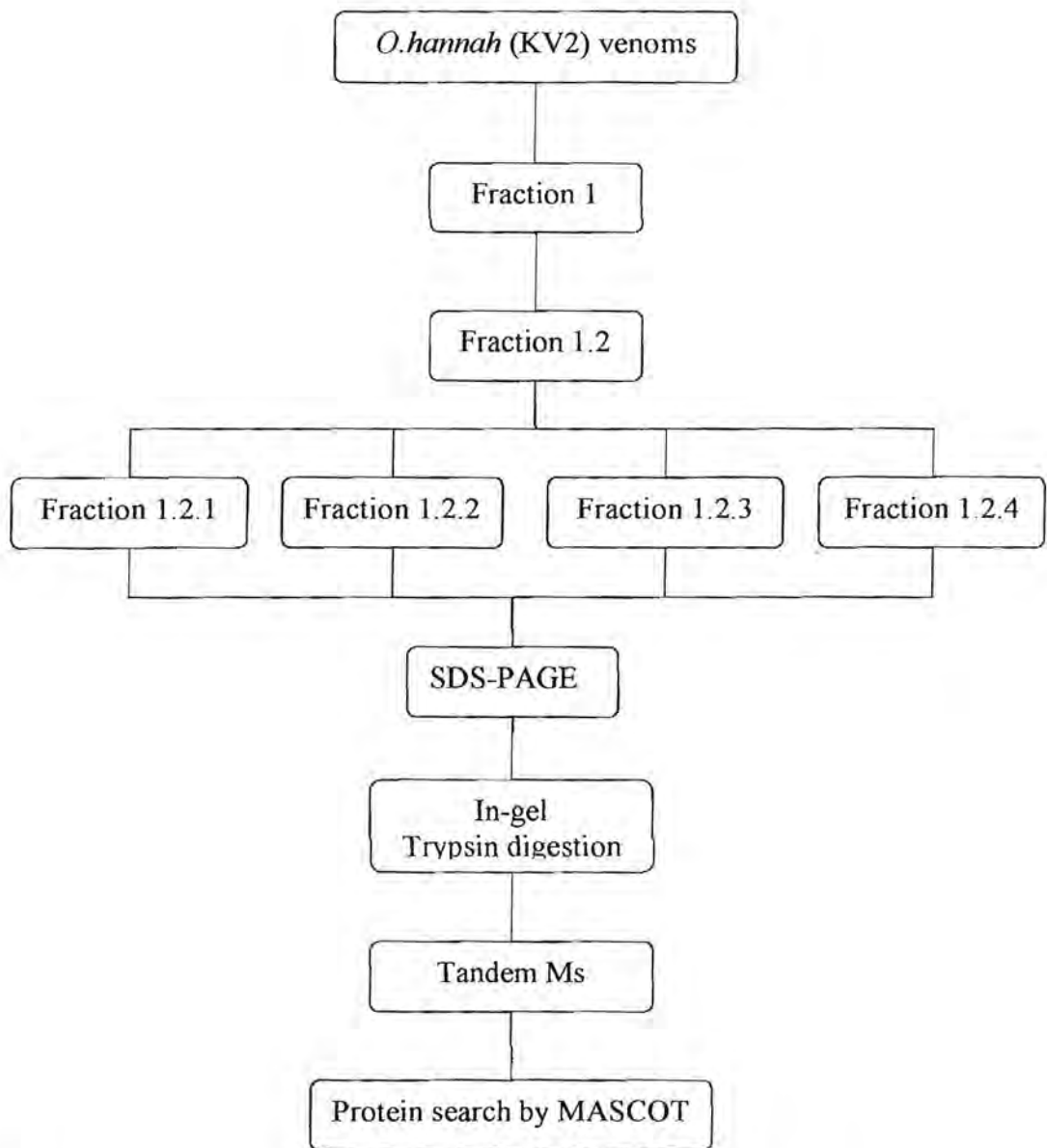


Scheme 1 Schematic of the combination strategy for comparison three venoms

Table 1 The biochemical and biological activity of *O. hannah* venom

Biochemical and biological activity	KV2	KV6	KV9
Protein concentration (mg/ml)	0.39	0.36	0.38
(% of crude venom protein)	(39)	(36)	(38)
Cytotoxicity (IC ₅₀) (μg/ml)	2.99	6.11	-
LD ₅₀ † (μ/mouse)	32.96	88.29	77.82

† Data from Queen Saovabha Memorial Institute.



Scheme 2 Schematic overview of strategy for analyzed protein of KV2 venom

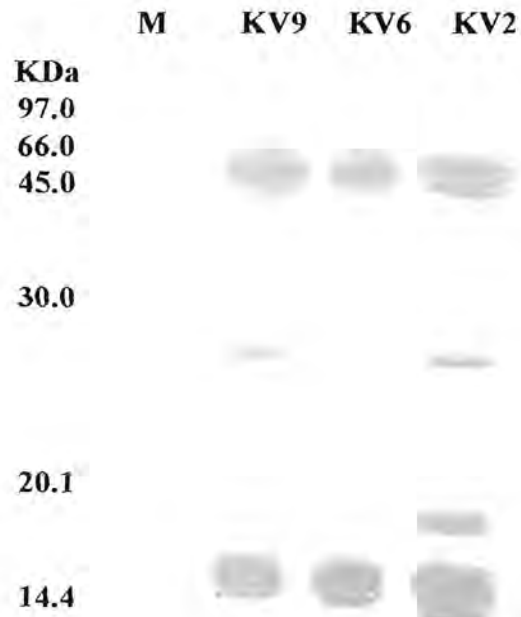


Figure 1 SDS-PAGE of three venoms. Lane1: KV9, Lane2: KV6 and Lane3: KV2.

Table 2 Comparison number of spot protein from 2-DE gel of venom samples

Molecular mass range (kDa)	Number of spot protein		
	KV2	KV6	KV9
97-66	8	5	9
66-45	3	-	4
45-30	-	1	2
30-20	1	3	5
20-14	7	6	10
<14	7	1	1

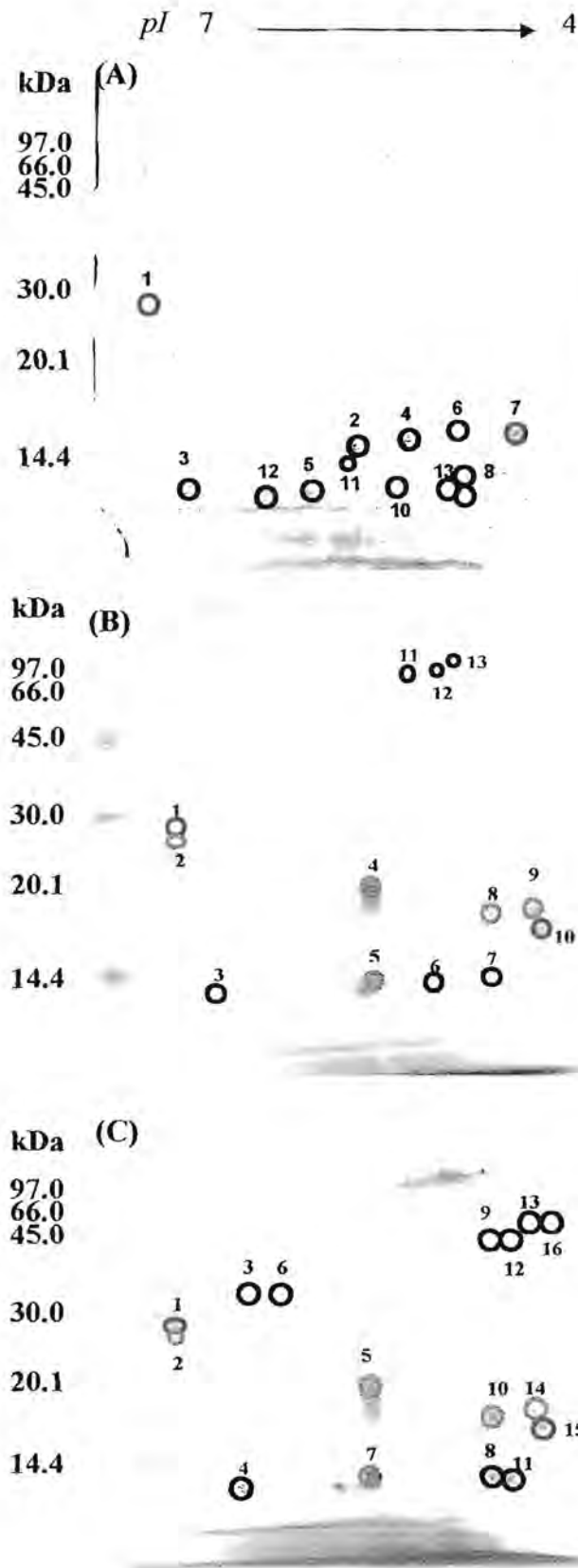


Figure 2 2-DE gel images of three venoms. Shown 2-DE for the same venom at pI 4-7. (A): KV2, (B): KV6 and (C): KV9

Table 3 Protein identification in three *O. hannah* venoms

Spot No.	App.mass/pl	Theor.mass/pl	No.of peptides matched	Sequence coverage (%)	score	Protein
<i>O.hamah</i> (KV2)						
1	31,945/6.9	26,851/6.90	5	21	60	Ophanin precursor (Ophanin)
2	13,139/5.5	13,447/4.47	5	58	74	phospholipase A2
3	9,904/6.3	9,463/9.19	2	66	40	mCG147719
4	13,960/5.2	16,433/5.67	5	37	81	Phospholipase A2, acidic 1 precursor
5	9,904/5.7	7,072/5.83	2	45	40	ring finger protein 185
6	14,832/4.9	15,150/4.7	3	25	47	receptor activity modifying protein 3
7	14,832/4.5	13,182/4.41	5	43	85	Chain A, Structure Of An Acidic Phospholipase A2
8	11,179/4.8	9,946/6.08	3	55	43	MHC class II beta chain
9	9,904/4.9	14,063/5.56	4	47	63	adenylate kinase 1
10	9,904/5.8	9,703/5.63	3	42	45	unnamed protein product
11	12,120/5.5	10,824/5.02	3	47	37	BI-Beta II protein
12	9,904/6	19,064/7.85	3	30	48	Rabphilin3a
13	10,312/5	15,728/5.13	2	27	30	Phospholipase A2 precursor
<i>O.hamah</i> (KV6)						
1	36,925/6.9	26,851/6.90	4	20	39	opharin precursor (Ophanin)
2	35,562/6.9	42,768/9.67	7	32	52	hypothetical protein
3	16,764/6.7	14,279/6.81	3	55	42	hypothetical protein
5	17,406/5.6	13,730/4.32	3	69	52	MGC16385 protein
6	18,073/5.2	19,193/4.75	4	18	56	Translationally-controlled tumor
7	17,406/4.8	12,331/5.6	4	58	49	insulin 2
8	24,416/4.8	13,122/7.99	4	57	55	gonadotrophin alpha 1 subunit
9	24,416/4.5	27,219/6.52	3	16	46	rCG54731
10	21,812/4.5	13,182/4.41	3	31	46	Chain A, Structure Of An Acidic Phospholipase A2
11	69,976/5.3	60,132/5.87	6	12	45	titin
13	71,658/4.9	76,422/6.40	5	12	40	hypothetical protein
<i>O.hamah</i> (KV9)						
1	35,914/6.9	26,851/6.90	4	21	41	opharin precursor (Ophanin)
2	34,735/6.9	42,768/9.67	7	32	55	hypothetical protein
3	39,039/6.4	46,645/6.43	5	17	49	isocitrate dehydrogenase
4	14,585/6.5	13,560/4.8	2	47	37	EG545052 protein
6	39,039/6.2	33,729/6.16	5	38	67	cyclin-dependent kinase 4
7	15,080/5.6	13,730/4.32	2	53	34	MGC16385 protein
8	15,592/4.9	11,560/6.07	4	76	65	immunoglobulin heavy chain
9	51,845/4.8	43,344/6.64	6	27	54	leucine zipper
10	21,055/4.9	13,122/7.99	4	57	55	gonadotrophin alpha 1 subunit
11	15,592/4.8	12,305/8.62	3	73	55	immunoglobulin heavy chain
12	51,845/4.7	50,490/9.13	5	25	46	WDR40A protein
13	57,305/4.5	69,965/5.51	5	22	46	Prothrombin precursor
14	22,508/4.5	27,219/6.52	3	16	46	rCG54731
15	19,695/4.5	13,182/4.41	3	31	44	Chain A, Structure Of An Acidic Phospholipase A2
16	57,305/4.7	67,076/6.73	6	23	59	6-glucosidase

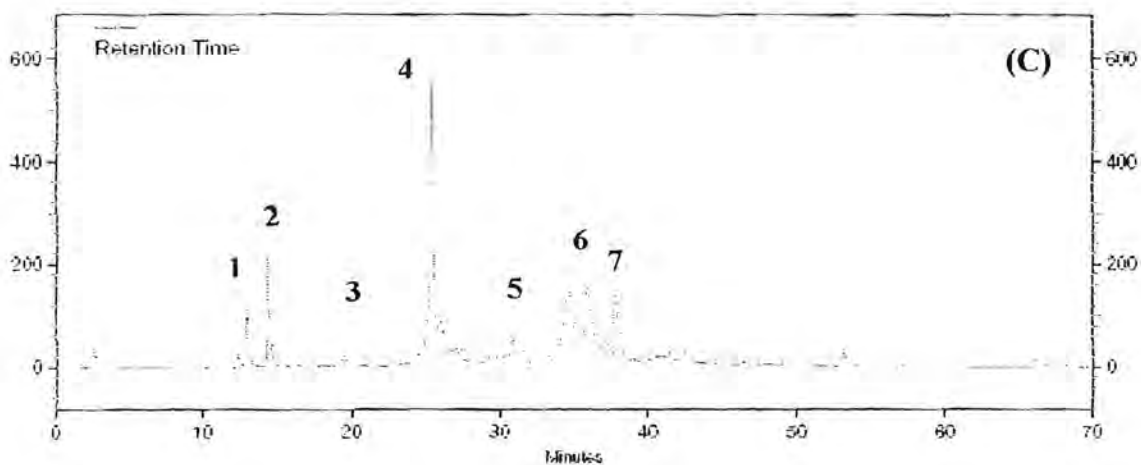
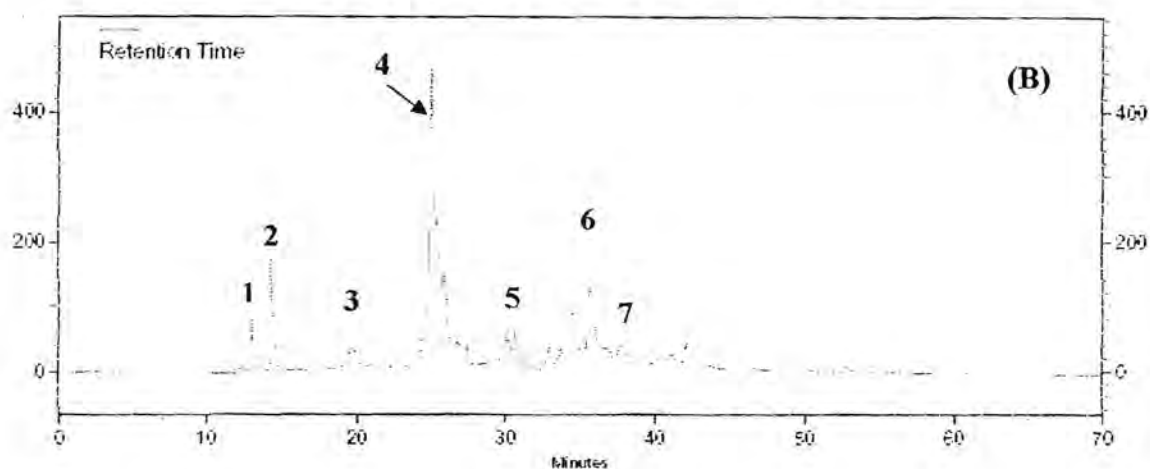
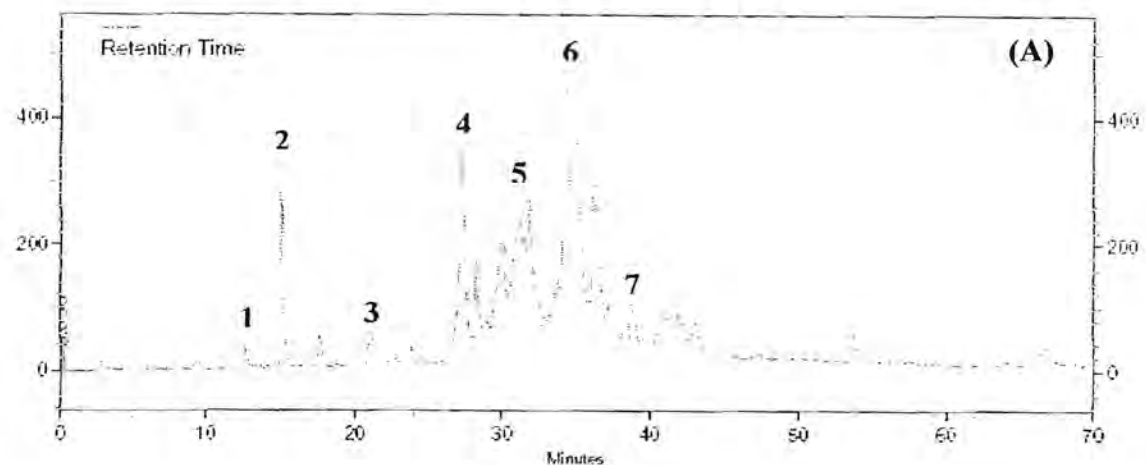


Figure 3 RP-HPLC separations for three *O. hannah* venom. (A): *O. hannah* venom from phetchabun Thailand (KV2), (B): *O. hannah* venom from south of Thailand (KV6) and (C): *O. hannah* venom from south of Thailand (KV9)

Table 4 Summarized %ACN to elute each of fractions and concentration of protein of each fraction

Fraction	% ACN	Concentration (mg/ml)		
		KV2	KV6	KV9
1	10	0.0450	0.0161	0.0588
2	12	0.0538	0.0089	0.0467
3	18	0.0250	0.0097	0.0153
4	26-30	0.4434	0.1965	0.2014
5	31-35	1.0322	0.2401	0.2642
6	37-41	1.7826	1.0931	1.1970
7	47-50	0.2332	0.1530	0.6364

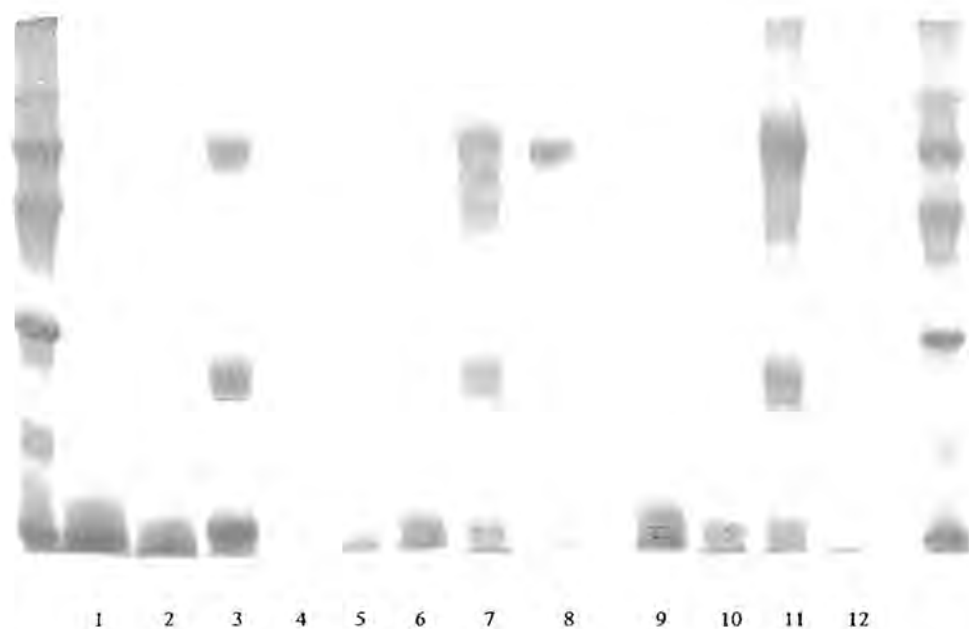


Figure 4 SDS-PAGE of HPLC fractions from three venoms: Lane 1 No.4 of KV2, lane 2 No.5 of KV2, lane 3 No.6 of KV2, lane 4 No.7 of KV2, Lane 5 No.4 of KV6, Lane 6 No.5 of KV6, Lane 7 No.6 of KV6, Lane 8 No.7 of KV6, Lane 9 No.4 of KV9, lane 10 No.5 of KV9, lane 11 No.6 of KV9, lane 12 No.7 of KV9

M 1 2



Figure 5 SDS-PAGE of the ion exchange and gel filtration fractions.

Lane1: Fraction 1.2.2 Lane2: Fraction 1.2.3 Lane

M: molecular mass standards.

References

- [1] Joubert, F. J., The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom. *Biochim. biophys. Acta* 317 (1973): 85-98.
- [2] Lin, N.Q., Zhang, Y.S., Mu, J.F., Wang, W.Y., Yang, C.J., Xiong, Y.L., Amino-acid sequence of the neurotoxin (CM-9) from the snake venom of Quangxi king cobra, *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* 16 (1984): 592-596.
- [3] Chang, C. C., Huang, T. Y., Kuo, K. W., Chen, S. W., Huang, K. F., Chiou, S. H., Sequence characterisation of a novel α -neurotoxin from the king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom, *Biochem, biophys. Res. Commun.* 191 (1993): 214-223.
- [4] Song, J., Chung, M.C.M., Xiong, Y., Wang, W., Pu, X., Purification sequence and pharmacological studies of a new alpha-neurotoxin from *Ophiophagus hannah* venom, *Toxicon* 32 (1994): 537-538.
- [5] Lin, S.-R., Leu, L.-F., Chang, L.-S., Chang, C.-C., Amino acid sequence and chemical modification of a novel alpha-neurotoxin (Oh-5) from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom, *J. Biochem.* 121 (1997):690-695.
- [6] Lin, S.-R., Chang, L.-S., Chang, C.-C., Disulfide isomers of alpha-neurotoxins from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 254 (1999): 104-108.
- [7] He, Y.-Y., Lee, W.-H., Zhang, Y., Cloning and purification of α -neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*), *Toxicon* 44 (2004): 295-303.
- [8] Li, J., Zhang, H., Liu, J., Xu, K., Novel genes encoding six kinds of three finger toxins in *Ophiophagus hannah* (king cobra) and function characterization of two recombinant long-chain neurotoxins, *Biochem. J.* 398 (2006): 233-242.

- [9] Rajagopalan, N., Pung, Y.F., Zhu, Y.Z., Wong, P.T.H., Kumar, P.P., Kini, R.M., Beta-cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with beta-blocker activity, *FASEB J.* 21 (2007): 3685-3695.
- [10] Chang, L.S., Liou, J.C., Lin, S.R., Huang, H.-B., Purification and characterization of a neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hannah*, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 294 (2002): 574-578.
- [11] Joubert, F.J., Snake venoms. The amino-acid sequence of polypeptide DE-1 from *Ophiophagus hannah* (King cobra) venom, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 358 (1977): 565-574.
- [12] Huang, M.Z., Gopalakrishnakone, P., Chung, M.C.M., Kini, R.M., Complete amino acid sequence of an acidic, cardiotoxic phospholipase A2 from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra): a novel cobra venom enzyme with 'pancreatic loop', *Arch. Biochem. Biophys* 338 (1997): 150-156.
- [13] Lee, W., Zhang, Y., Molecular cloning and sequence analysis of a phospholipase A2 from king cobra (*Ophiophagus hannah*), Submitted (AUG-2000) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- [14] Wang, Q.Y., Shu, Y.Y., Cloning and characterization of cDNAs encoding two acidic isoforms of phospholipase A2 in Guangxi King Cobra (*Ophiophagus hannah*), Submitted (SEP-2000) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- [15] Yamazaki, Y., Hyodo, F., Morita, T., Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins, *Arch. Biochem. Biophys* 412 (2003): 133-141.

- [16] Chang, L.-S., Chung, C., Huang, H.-B., Lin, S.-R., Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra), *Biochem. Biophys. Res. Commun* 283 (2001): 862-867.
- [17] Ahn, M.-Y., Lee, B.M., Kim, Y.S., Characterization and cytotoxicity of L amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*), *Int. J. Biochem. Cell Biol* 29 (1997): 911-919.
- [18] Pung, Y.F., Wong, P.T.H., Kumar, P.P., Hodgson, W.C., Kini, R.M., Ohanin, a novel protein from king cobra venom, induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice, *J. Biol. Chem* 280 (2005): 13137-13147.
- [19] Berkelman, T., Stenstedt, T., *2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients: Principle and Methods*, Sweden: Amersham Biosciences AB, 1998 pp.1-71
- [20] Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M., In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nature Protocols* 1 (2006): 2856-2860.
- [21] <http://www.matrixscience.com>
- [22] Yamazaki, Y., Hyodo, F., Morita, T., Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: Isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins, *Arch. Biochem. Biophys* 412 (2003): 133-141.
- [23] Chiou, J.Y., Chang, L.S., Chen, L.N., Chang, C.C., Purification and characterization of a novel phospholipase A2 from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom, *J. Protein Chem.* 14 (1995): 451-456.

Cloning of the neuromuscular blocking compound of king cobra venom

Thaweesak Tirawatnpong¹, Sunutcha Suntrarachun², Suchitra Khunsap², Orawan Khow², Pannipa Chulasugandha², Jureeporn Noiphorm², and Sopit Thamaree¹

¹ Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok, Thailand

² Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, Patumwan, Bangkok, Thailand

Corresponding author: Thaweesak Tirawatnpong

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,
Patumwan, Bangkok, 10330, Thailand

E-mail address: fmed1w@md2.md.chula.ac.th

Abstract

Eighteen protein spots were found distributed between pH 4.5-6 when two dimensional gel electrophoresis of Fraction 1.2.2 (from "Fractionation of the neuromuscular blocking compound from the venom of King cobra") was carried out. Analysis of protein spots by Mass spectrometer and "Mascot" showed that protein spot no. 1, 2, 3 and 4 were similar to opharin precursor (ophanin) and spot no. 7 and 8 were similar to long chain neurotoxin of king cobra venom.

Primers were designed for these two proteins. DNA of opharin precursor, 720 bp, and long chain neurotoxin, 276 bp, were obtained from RT PCR of mRNA extracted from the venom gland of king cobra. These cDNA were inserted into PCR® 2.1 TOPO vector and pGEX2T expression vector. Inserted vectors were checked by restriction enzyme EcoRI. Sequencing of DNA showed that opharin precursor was inserted correctly in size and direction in the vector while insertion of long chain neurotoxin was incorrect. New primer was designed to have restriction site EcoRI and BamHI connected to the 5' primer of long chain neurotoxin for insertion into pGEX-2T. The process is ongoing. Opharin precursor in pGEX-2T was stimulated with IPTG at different concentration, temperature and time. The optimum conditions were 0.1mM IPTG at 37°C for 3-4 h. Protein concentration of the obtained product was 0.35 mg/ml.

Key words: opharin precursor, long chain neurotoxin, neuromuscular blocking

Introduction

King cobra (*Ophiophagus hannah*), which belongs to the Elapid family, is the world largest venomous snake thus injection of large amount of venom can be expected (Jintakune and Chanhome, 1996). Other than neurotoxins, the major components of the venom, it also contains large molecular weight proteins targeted at blood coagulation system, such as factor X activator and fibrinolytic enzyme. Neurotoxins bind specifically and tightly to nicotinic acetylcholine receptor at skeletal muscle neuromuscular junction, producing blockade of neuromuscular transmission at the postsynaptic membrane, leading to paralysis and quick death of the prey (Pu *et al.*, 1995; Phui *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006).

From the previous studies, king cobra venom has been purified and several fractions were obtained. The fractions were characterized as L-amino acid oxidase, phospholipase A2, phosphodiesterase, 5' nucleotidase, acetylcholinesterase, protease and neuromuscular blocker (He *et al.*, 2004). Opharin precursor (ophanin) and long chain neurotoxin were observed in the further study of the neuromuscular blocking fraction with two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.

Primers were then designed based on opharin precursor (ophanin) and long chain neurotoxin reported in NCBI GenBank. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using mRNA from king cobra venom gland as a template. PCR products were cloned, sequenced and expressed for the recombinant proteins.

Material and Methods

1. RNA preparation

Poly (A)⁺ RNA was isolated from king cobra venom glands which were immediately stored in liquid nitrogen after sacrificed. Two frozen glands from one snake were homogenized to extract RNA using Oligotex Direct mRNA Microkit (QIAGEN, USA).

2. Oligonucleotide primers

Based on the sequences deposited in the GenBank Nucleotide Sequence Database under the accession number AY299475 (*Ophiophagus hannah* opharin precursor, mRNA, complete cds) and DQ273568 (*Ophiophagus hannah* isolate Intx3 long chain neurotoxin precursor, mRNA, complete cds), the primer sequences for PCR amplification of opharin precursor and long chain neurotoxin genes were selected. The primer sequences of opharin precursor were 5' ATGATTGCCTTCACCTTGCTAAGTC 3' (forward primer) and 5' TTATATTATTITATIGTGGCAGAAGC 3' (reverse primer) which corresponded to encoding residues 1-720. The sequences of long chain neurotoxin for forward and reverse were 5' ATGAAAACCTCTGCTGCTGACCTT 3' and 5' TCAAGGTCTCAATTCGGATGTG 3' which corresponded to the residues 1-276.

3. RT-PCR and PCR

RT-PCR was carried out with 30 µl reaction buffer containing 5x1st strand synthesis buffer, each dNTP of 100 mM, 25 mM MgCl₂, 100 U MMLV reverse transcriptase, 50 pmol/µl antisense primer and 1 µg RNA template. The amplification

was preceded on a Primus Thermal Cyclers (MWG Biotech, USA) at 37°C 30 min and 95°C 5 min. Then, the first PCR reaction 20 µl was added to the RT reaction which consisted of 10xbuffer, each dNTP of 100 mM, 25 mM MgCl₂, 50 pmol/µl sense primer and DNA polymerase 5 U/µl. The reaction was carried out at 94°C/55°C/72°C each with 1 min interval, for a total of 35 cycles.

4. Generation of cDNA encoding alpha- and beta-neurotoxins

The amplified DNA fragments were excised from 2% agarose gel with a clean, sharp razor blade then purified using QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, USA). The products were cloned into pCR® 2.1 TOPO vector according to the TA cloning procedures (Invitrogen, San Diego, USA).

5. Subcloning of cDNA

Inserted opharin precursor and long chain neurotoxin genes and pGEX2T vector (Pharmacia, USA) were digested with 5 units of EcoRI restriction enzyme. After the incubation of reaction with calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) for 1 hr at 50°C, the DNA was ligated with pGEX2T and transformed into competent DH5α *E. coli* cell. Recombinant plasmids were isolated by QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA).

6. DNA sequencing and sequence analysis

Cycle sequencing was performed using Perkin-Elmer Big Dye Terminator 3.1 reaction (Applied Biosystems, USA). The PCR reaction was carried out in a 20 µl reaction containing 4 µl of terminator ready reaction mix, 5 pmol sequencing primer and 250 ng DNA template. Cycle parameters were: 25 cycles of 96°C 10 sec/ 50°C 5

sec and 60°C 4 min. The unincorporated dye terminators were removed by DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN, USA). The solution was dried in a vacuum centrifuge for 10-15 min. The pellet was resuspended in 10 µl Template Suppression Reagent (Perkin-Elmer) and loaded to the ABI PRISM sequencer. The nucleotide sequences obtained from the clones of interest were compared against online database of nucleotide sequences using BLAST N (Basic Local Alignment Search Tool) program. The sequences, which possess significant homology to those of opharin precursor and long chain neurotoxin genes, were further analyzed. Alignments of the sequences were made using CLUSTAL X multiple alignment program.

7. Expression and purification of fusion protein

DH5α *E.coli* containing recombinant pGEX-2T expression vector was inoculated into 2 ml LB containing 100 µg/ml ampicillin and grown at 37°C overnight with 230 rpm shaking. On the next day, the culture was measured at 600 nm to obtain an OD of 1-2, then the culture was spun down and supernatant discarded. The pellet was resuspended with LB containing 100 µg/ml ampicillin and 100 µl of the suspension was added to each of 4 flasks of 10 ml LB containing 100 µg/ml ampicillin. The culture was shaken at 37°C with 230 rpm until the OD of 0.6-0.7 at 600 nm of the late log phase was obtained. One milliliter was removed from each flask, spun down, and supernatant aspirated. The pellet was then stored at -20 °C as a zero time point sample. Then 0.05-2 mM of IPTG was added to each of the 4 flasks at 37°C with shaking for 4, 6 and 24 hrs. At each time point, 1 ml of each sample was taken to spin down and the pellet was kept at -20°C. The pellet was washed with PBS pH 8.0 and lysed by ultrasonicator (Ultrasonic Processor, Sonics, USA) for 30 sec 3 times. After 14,000 rpm centrifugation at 4°C for 1 hr, the supernatant and pellet were

separately resuspended in 1XSDS-PAGE sample buffer, heated for 5 min at 70°C and 10 µl was loaded on 12% SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie Blue to identify, with increasing intensity, the size range of the fusion proteins.

8. Immunoblotting

The proteins on SDS-PAGE were transferred to nitrocellulose membrane. The gel and membrane were sandwiched between sheets of transfer buffer-soaked thick filter papers and placed into Trans-Blot machine. The gel sandwich was transferred at 250 mA for 2.5 hrs. Two lanes of MW marker and sample were cut to stain with Coomassie Brilliant Blue for 30 min and destained with destaining solution until bands of marker were visualized. The rest of membrane was incubated in blocking buffer (5% w/v BSA in TBST 30 ml) at 37°C for 1 hr, washed 3 times with TBST buffer for 5 min each, and incubated overnight with 3% BSA plus *Ophiophagus hannah* antibody. On the next day, the membrane was washed 4 times with TBST 7 min each and incubated in 1:1000 dilutions in TBST of rabbit Anti-horse IgG Peroxidase Conjugate Antibody (Sigma, Missouri, USA) at room temperature for 1 hr. The membrane was washed 4 time for 6 min each with TBST and soaked in substrate solution containing 4 ml of 4-chloro in methanol (1 tablet of 4-chloro, 10 ml methanol), 20 ml PBS, and 10 µl 35% H₂O₂, the membrane was kept from light until the bands were developed.

9. Protein purification

Purification was performed using GStrap FF prepacked 1 ml column (GE Healthcare, USA). The column was connected to the syringe and binding buffer pH 7.3 was filled (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) to

equilibrate the column. The expressed protein was applied and washed with binding buffer. Thrombin solution (1U/ μ l) was loaded onto the column. The top and the bottom were sealed with the plugs supplied. The column was incubated at RT for 4 hr. Then, the column was eluted with elution buffer. After protein concentration was measured at 280 nm, protein was concentrated using Vivaspin 2 (Sartorius, USA).

10. Neuromuscular blocking activity

The purified protein was tested for neuromuscular blocking activity using Mouse Phrenic Nerve - Hemi-diaphragm Preparation.

Results

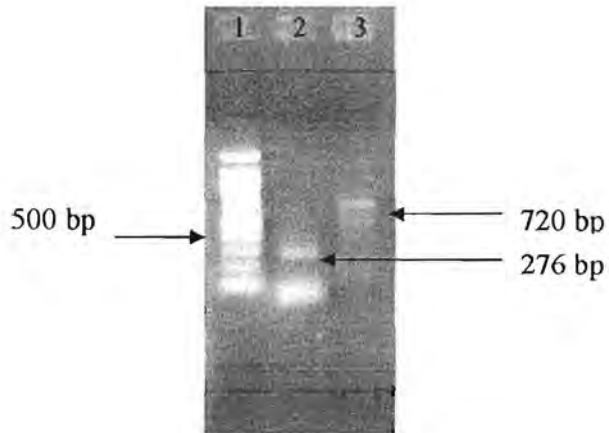


Fig 1. PCR products of opharin precursor (720 bp) and long chain neurotoxin (276 bp) from *Ophiophagus hannah*. Lane1: MW marker 100 bp ladder; Lane 2: long chain neurotoxin (276 bp) lane 3: opharin precursor (720 bp).

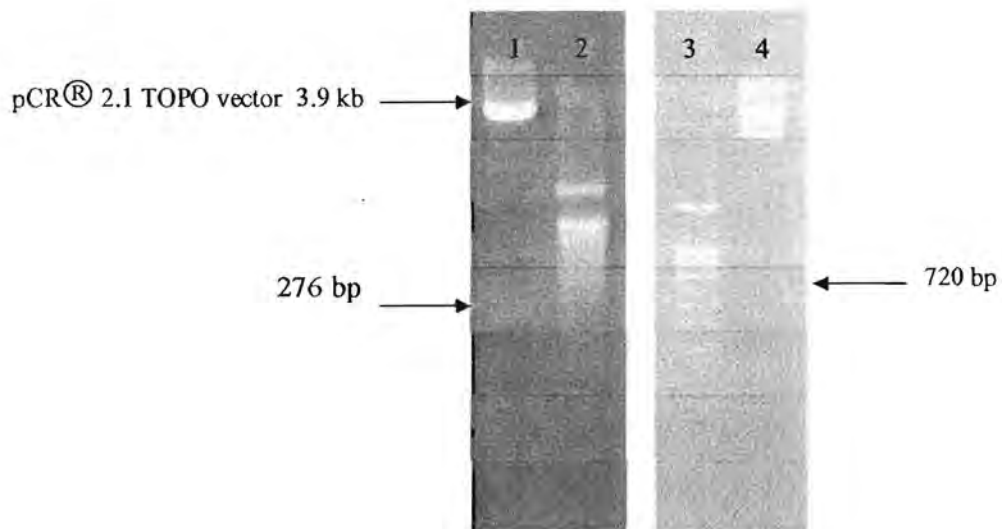


Fig 2. pCR® 2.1 TOPO vector 3.9 kb cut with restriction enzyme EcoRI. Lane 1: pCR® 2.1 TOPO vector 3.9 Kb and long chain neurotoxin 276 bp; lane 2: MW marker 100 bp ladder; lane 3: pCR® 2.1 TOPO vector 3.9 Kb and opharin precursor 720 bp; lane 4: MW marker 100 bp ladder.



Fig 3. Multiple sequence alignment of deduced amino acid sequences from the positive clones compared with opharin precursor (AY299475) and opharin (AY181984).

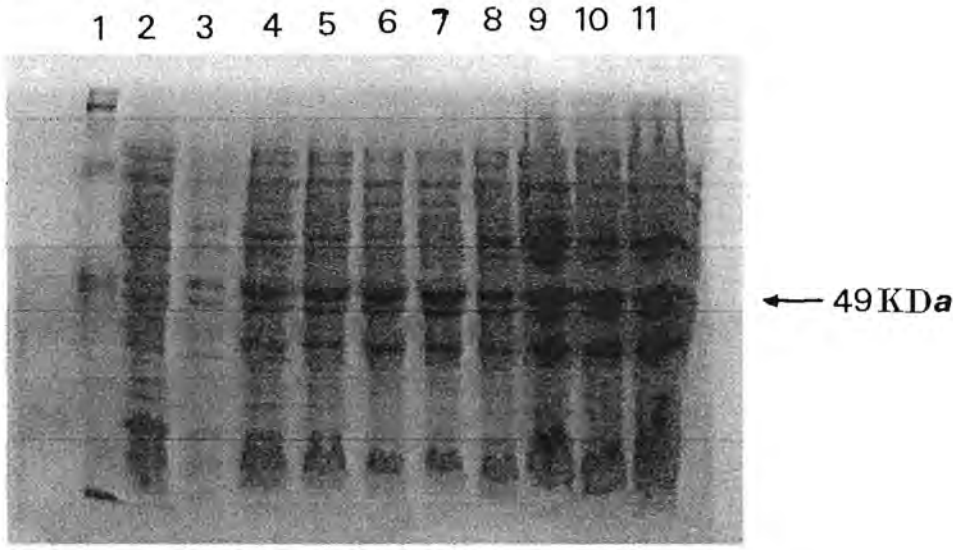


Fig 4. SDS-PAGE analysis of opharin precursor fusion protein 0.05 – 1 mM IPTG induction. Lane 1: Kaleidoscope Prestained Standards; lane 2: non-insertion without IPTG induction; lane 3: non-IPTG induction; lane 4-7: pellet 3-4 hr at 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM IPTG; lane 8-11: pellet 5-6 hr at 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM IPTG.

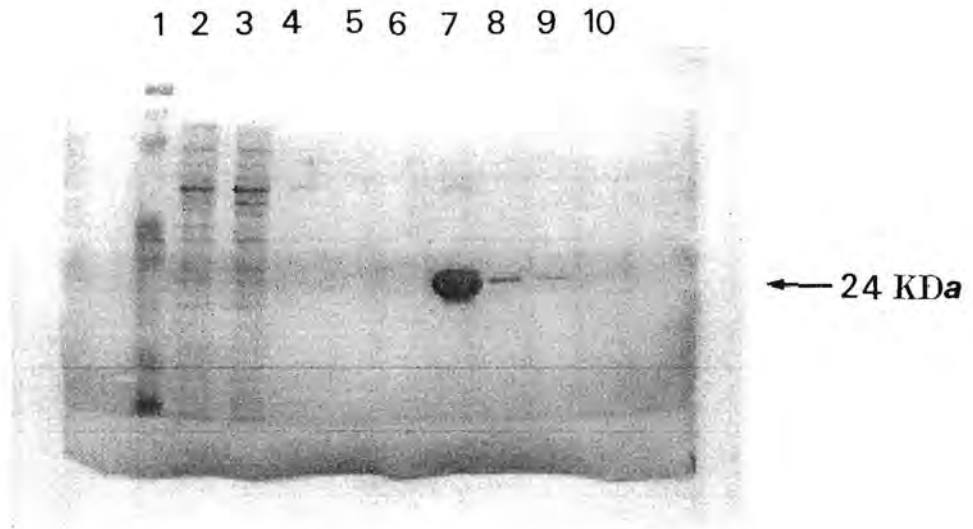


Fig 5. Protein purification using GSTrap FF prepacked 1 ml column. 1: Kaleidoscope Prestained Standards; lane 2-10: purified fractions.

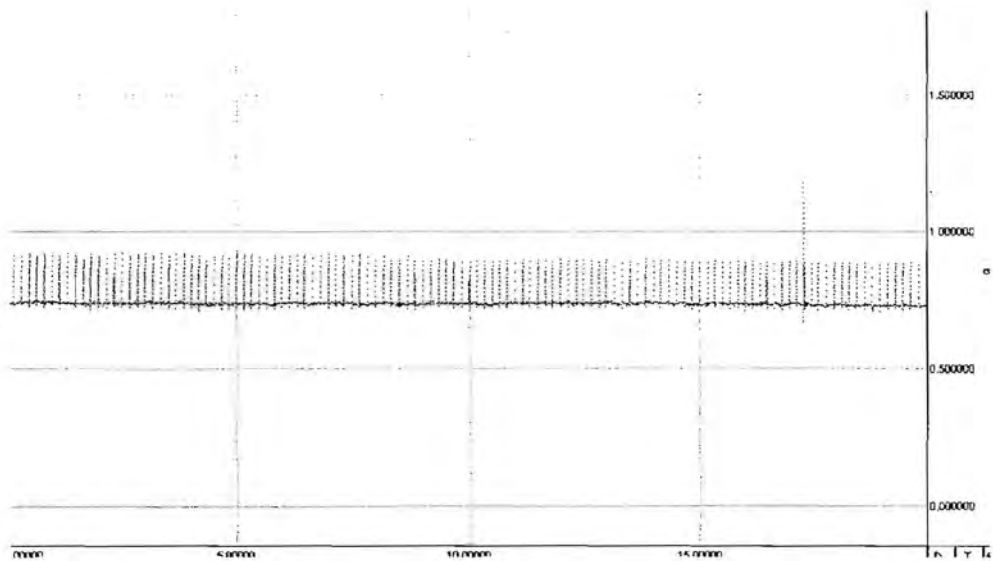


Fig 6. Neuromuscular blocking activity on Mouse Phrenic Nerve - Hemi-diaphragm Preparation after adding purified protein.

Discussion

Two deduced amino acid sequences of opharin precursor from 4 positive clones were missing. Some of the sequences were not homology to opharin precursor and ophanin reported in NCBI GenBank (Fig 3). Nucleotide and deduced amino acid sequences of opharin precursor from our study were submitted to the GenBank under the accession number FJ767755. The different of deduced amino acid sequence could lead to different structures, characteristics and properties of opharin precursor. The concentration of purified protein used to test neuromuscular blocking activity was 0.35 mg/ml. The results showed that recombinant protein was not good at blocking of neuromuscular junction as compared to the purified fraction of snake venom. The reason is previously mentioned as the different structure of recombinant opharin precursor obtained. In addition, heterologous expression system for heterologous protein depends on the host cell. Bacteria expression system using *E. coli* is simple and fast. However, many studies report non-function product of eukaryotic cell using bacteria expression system. It is possible that it has no post translation modification compared with yeast or mammalian expression systems. Yeast expression system has been developed to improve folding but still less effective than mammalian expression system (Mujacic *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2003). There are reports that heterologous protein produced from mammalian expression system possesses the characteristic similar to natural components but the techniques are more expensive and time-consuming. Many studies (Yamazaki *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2004, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q7ZT98>) reported the function of opharin precursor as weakly blocks smooth muscle contraction elicited by high potassium-induced depolarization but do not block caffeine-stimulated contraction. Opharin precursor is

a member of Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) which widely distributed in snake venoms. CRISPs inhibit smooth muscle contraction and cyclic nucleotide-gated ion channels, the same as natrin from *Naja atra*, kaouthin from *Naja kaouthia*, and bucarin from *B. candidus* (Jin *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2004). Smooth muscle contraction study could be performed using Guinea pig ileum according to the method of Schweitz *et al.*, (1990). KCl solution was used to induce contraction of the isolated ileum.

In the first experiment on long chain neurotoxin, unexpected nucleotide sequences were observed at the step of insertion into pGEX-2T expression vector. This could be the result of incomplete cut of inserted long chain neurotoxin precursor from pCR® 2.1 TOPO vector with EcoRI. To solve this problem, restriction enzyme BamHI and EcoRI were added to 5' end of primers. PCR was performed and the product was cut with these enzymes. Cloning of the PCR product into pGEX-2T expression vector is on going.

Acknowledgements

This work was supported by research budgets of the Thai government fiscal year 2006 to 2008.

References

1. Berkelman T. and Stenstedt T. 1998. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Amersham Biosciences.
2. He, Y. Y. Wei, H. L., and Zhang, Y. 2004. Cloning and purification of α -neurotoxins from King cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon* 44; 295-303.
3. Jin. Y., Lu, Q., Zhou, X., Zhu, S., Li, R., Wang, W., and Xiong, Y. 2003. Purification and cloning of cystein-rich protens from *Trimeresurus jerdonii* and *Naja atra* venoms. *Toxicon* 42; 539-547.
4. Jintakune, P., and Chanhom, L. 1996. Snake in Thailand. Bangkok. Prachachon Publishing Company; 117-137.
5. Li, J., Zhang, H., Liu, J., and Xu, K. 2006. Novel genes encoding six kinds of three-finger toxins in *Ophiophagus hannah* (King cobra) and function characterization of two recombinant long-chain neurotoxins. *Biochem J.* 398; 233-242.
6. Mujacic, M., Cooper, K. W., and Baneyx, F. 1999. Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene* 238; 325-332.
7. Peng, L. S., Zhong, X. F., Huang, Y. S. Zhang, Y., Zheng, S. L. Wei, J. W. Wu, W. Y., and Xu, A. L. 2003. Molecular cloning, expression and characterization of three short chain α -neurotoxins from the venom of sea snake-Hydrophiinae *Hydrophis cyanocinctus* Daudin. *Toxicon* 42, 753-761.
8. Phui, Y. JS., Nanling, G., Afifiyan, F., Donghui, M., Lay, P. S., Armugam, A., and Jeyaseelan, K 2004. Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. *Biochimie*, 86; 137-149.

9. Pu, X. C., Wong, P. T. H., Gopalakrishnakone, P. 1995. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of King cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon* 33; 1425-1431.
10. Schweitz, H., Bidard, J. N., Lazdunski, M. 1990. Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom. *Toxicon* 28; 847-856.
11. Yamazaki, Y., Hyodo, F., and Morita, T. 2003. Wide distribution of cysteine-rich proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Arch Biochem Biophys* 412; 133-141.
12. Yamazaki, Y., and Morita, T. 2004. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* 44; 227-231.
13. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q7ZT98>.

