

การศึกษา แยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ

เพื่อการศึกษาทางเอนไซม์

Isolation, Purification and Enzymatic Studies

of Russell's Viper Venom

โดย



005367

นายสันต์ พนิชยกุล วท.บ. (จุฬา ๒๕๐๘)

วิทยานิพนธ์นี้

เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามระเบียบปริญญามหาบัณฑิต

ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนกวิชาเคมี (สาขาชีวเคมี)

พ.ศ. ๒๕๑๐

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามระเบียบปริญญามหาบัณฑิต

.....
.....
.....

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

.....
.....
.....
.....

อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย อาจารย์สรร เสริญ ทรัพย์โตชก

วันที่...?...เดือน...พฤษภาคม...พ.ศ. ๒๕๑๐.....

หัวข้อ วิทยานิพนธ์ เรื่อง การศึกษา แยกพิษงูแมวเซาออกเป็น ส่วน ๆ เพื่อการ
ศึกษาทางเอนไซม์

ชื่อ นายสันต์ พภิษกุล

แผนกวิชา เคมี (สาขาชีวเคมี) วันที่ ๘ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๑๐



บทคัดย่อ

การศึกษาคือความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา เริ่มมาตั้งแต่ต้นคริสต์ศตวรรษที่ ๑๘ แต่จนกระทั่งบัดนี้ก็ยังไม่ทราบแน่นอนว่า ความเป็นพิษของพิษงูชนิดนี้เกิดเนื่องจากสารอะไร และทำงานอย่างไร นอกจากนี้ยังพบว่าพิษงูชนิดเดียวกันอยู่ในที่มีดินฟ้าอากาศและสภาพภูมิศาสตร์ต่างกัน จะมีคุณสมบัติในการเป็นพิษต่างกันด้วย และการศึกษา ค้นคว้าเกี่ยวกับความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาในประเทศไทยยังไม่เคยมีมาก่อนเลย จึงน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการที่จะเริ่มต้นศึกษาถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูชนิดนี้ดูบ้าง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองแยกพิษงูแมวเซาออกเป็น ส่วน ๆ โดยผ่าน DEAE cellulose คอลัมน์และใช้สารละลาย buffer ที่มี pH ต่าง ๆ ล้างไล่ออกมาเป็น ส่วน ๆ ตามปริมาณของโปรตีน แล้วนำส่วนที่แยกได้เหล่านี้ไปศึกษาความเป็นพิษและวัด activity ของเอนไซม์ต่าง ๆ ตลอดจนคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยตรงและคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือด ทั้งนี้ได้ศึกษาคุณสมบัติเหล่านี้ในพิษงูที่ยังไม่ได้แยกด้วย จากผลการค้นคว้าได้พบว่าพิษงูแมวเซาถูกแยกออกโดยวิธีนี้ได้ ส่วนที่เป็นโปรตีน ๘ ส่วน ซึ่งใน ๘ ส่วนนี้จะมีอยู่ ๕ ส่วน ซึ่งเป็นพิษต่อหนูทดลอง โดยในโปรตีนส่วนที่ V จะมีความเป็นพิษสูงสุดรองลงมา คือ ส่วนที่ I และส่วนที่ VI phosphodiesterase activity มีค่าสูงในโปรตีนส่วนที่ I รองลงมาคือ ส่วนที่ V และโปรตีนส่วนที่ I จะมี activity ของ phosphomonoesterase สูงสุดและโปรตีนส่วนที่ III จะมีปริมาณมากเป็นรองจากส่วนที่ I สำหรับ adenosine triphosphatase จะมีในโปรตีนส่วนที่ I สูงที่สุดรองลงมา คือ โปรตีนส่วนที่ IV lecithinase activity ในโปรตีนส่วนที่ V จะมี activity สูงที่สุดตามด้วยโปรตีนส่วนที่ VI มีปริมาณเป็นรองลงมา ส่วนคุณสมบัติในการไปเร่งการแข็งตัวของเลือดพบว่า โปรตีนส่วนที่ VI จะมี activity สูงสุดในขณะที่ส่วนอื่น ๆ เกือบไม่พบคุณสมบัติอันนี้เลย นอกจากนี้ยังพบว่า activity ของ L-amino acid oxidase

ในพิษณุมีค่าต่ำมากและไม่พบคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยตรง ในพิษณุ
แมวเขาเลย จากผลการทดลองข้างต้น พอจะกล่าวได้ว่า การทำงานของพิษณุแมวเขา
ที่ยังไม่ได้แยกน่าจะเป็นผลจากการทำงานร่วมกันของส่วนที่เป็นพิษทั้ง ๕ ส่วนและใน
โปรตีนส่วนที่เป็นพิษทั้ง ๕ ส่วนนี้ จะมีอยู่ส่วนหนึ่ง (ส่วนที่ VI) ซึ่งความเป็นพิษน่า
จะเกิดจากคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือด อย่างไรก็ตาม ควรจะมีการศึกษา
ถึงคุณสมบัติอื่น ๆ ในพิษณุชนิดนี้ เช่นการศึกษาเอนไซม์อื่น ๆ นอกจากที่ศึกษามาแล้ว
เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อความเข้าใจถึงการทำงานของพิษณุชนิดนี้โดยถูกต้อง



คำขอบคุณ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีได้หากไม่ได้รับความกรุณาจากท่านผู้มีนามต่อไปนี้

อาจารย์ สรรเสริญ ทรัพย์ไธสง ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ ซึ่งได้กรุณาให้ความช่วยเหลือทุกสิ่งทุกอย่างด้วยดีตลอดมา

อาจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำชี้แจงวิธีทำการทดลองและให้กำลังใจด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ไชศรี อภรณ์รัตน์ ซึ่งได้กรุณาให้คำปรึกษาชี้แจงและให้ความคิดต่าง ๆ ในการทดลอง

Dr. Floyd W. Dunn คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งได้กรุณาให้ DEAE cellulose เพื่อใช้ในการทดลอง

นายแพทย์ เฉลิม บุรณะนนท์ ผู้อำนวยการ และแพทย์หญิง ศรีประไพ ผ่องอักษร รองผู้อำนวยการ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ซึ่งได้กรุณาให้พิษงูแมวเซาเพื่อใช้ในการทดลอง

แพทย์หญิง สมศรี การถาวร แห่งแผนกคึกคัก สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ซึ่งได้กรุณาช่วยทำการทดลองความเป็นพิษและให้รายละเอียดเกี่ยวกับคุณสมบัติบางประการของพิษงู

นายแพทย์ สง่า ภูตระกูล แผนกโลหิต โรงพยาบาลศิริราช ซึ่งได้กรุณาจัดหาเลือดคนให้ใช้ในการทดลอง ตลอดจนการทดลองครั้งนี้

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณท่านผู้มีนามดังกล่าวแล้วข้างต้นไว้ในที่นี้ และขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยเรื่องนี้บางส่วน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....	ก
คำขอบคุณ	ง
สารบัญ	จ
รายการตารางประกอบ	ข
รายการภาพประกอบ	ท
บทนำ	๑



การทดลอง

พิษงูแมวเซา	๑๒
เคมีภัณฑ์	๑๒
เครื่องมือ.....	๑๒
วิธีแยกพิษงู	๑๒
การวัดความเป็นพิษ	๑๒
การวัด activity ของ phosphodiesterase.....	๑๕
การวัด activity ของ phosphomonoesterase ...	๑๕
การวัด activity ของ adenosine triphosphatase	๑๖
การวัด activity ของ L-amino acid oxidase ..	๑๗
การศึกษาคณะสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก	๑๗
การวัด activity ของ lecithinase	๑๘
การศึกษาคณะสมบัติในการไปเร่งการแข่งขันตัวของเลือด ...	๑๘

ผลของการทดลอง

ผลของการแยกพิษงูแมวเซา	๒๐
------------------------------	----

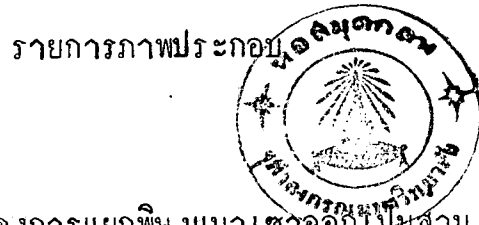
การศึกษาความเป็นพิษและทางเอนไซม์ในพิษงูแมวเซา

ผลของการศึกษาความเป็นพิษ	๒๓
ผลของการศึกษา phosphodiesterase	๒๕
ผลของการศึกษา phosphomonoesterase	๒๘
ผลของการศึกษา adenosine triphosphatase	๓๑
ผลของการศึกษา L-amino acid oxidase	๓๖
ผลของการศึกษาคูสมบัติของการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยตรง	๓๘
ผลของการศึกษา lecithinase	๓๙
ผลของการศึกษาคูสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือด ..	๔๑
วิจารณ์ผลของการทดลอง	๔๕
สรุปผลของการทดลอง	๕๑
บรรณานุกรม	๕๒

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ ๑ แสดงปริมาณโปรตีน แต่ละส่วนที่แยกจากพิษงู	๒๑
ตารางที่ ๒ แสดงความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาและโปรตีน แต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซา	๒๔
ตารางที่ ๓ phosphodiesterase activity ใน พิษงูแมวเซาและในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจาก พิษงูแมวเซา	๒๖
ตารางที่ ๔ phosphomonoesterase activity ในพิษงูแมวเซาและในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยก จากพิษงูแมวเซา	๒๘
ตารางที่ ๕ adenosine triphosphatase activity ในพิษงูแมวเซาและในโปรตีนแต่ละส่วนที่ แยกจากพิษงูแมวเซา	๓๒
ตารางที่ ๖ L-amino acid oxidase ในพิษงูแมวเซา และในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซา	๓๗
ตารางที่ ๗ activity ของ lecithinase ในพิษงูที่ ยังไม่ได้แยกและในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจาก พิษงูแมวเซา	๔๐
ตารางที่ ๘ activity ของคุณสมบัติในการ เร่งการแข็งตัว ของเลือดในพิษงูที่ยังไม่ได้แยกและในโปรตีน แต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซา	๔๒
ตารางที่ ๙ เปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ที่พบในพิษงูที่ยังไม่ ได้แยกและในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงู แมวเซา	๔๔



รูปที่ ๑ แสดงการแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ โดย DEAE cellulose	๒๒
รูปที่ ๒ ผลของ pH ต่อเอนไซม์ phosphodiesterase ในพิษงูแมวเซา	๒๓
รูปที่ ๓ ผลของ pH ต่อเอนไซม์ phosphomonoesterase ในพิษงูแมวเซา	๓๐
รูปที่ ๔ absorption curve ของ complex ที่ได้จากสารรีดิวซ์ ammonium phosphomolybdate ด้วย SnCl ₂	๓๓
รูปที่ ๕ กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ phosphorous	๓๔
รูปที่ ๖ ผลของ pH ต่อเอนไซม์ adenosine triphosphatase ในพิษงูแมวเซา	๓๕
รูปที่ ๗ กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณ activity ของคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดของโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูเทียบกับพิษงูที่ยังไม่ได้แยก	๔๓