Thesis Title Proteomics of Snake Venoms

Author Ms. Jiraporn Nawarak

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul	Chairperson
Prof. Dr. Shui-Tein Chen	Member
Lect. Dr. Dararat Tongkao	Member

ABSTRACT

Proteomics is currently introducing science with major goal of making inventory of all proteins expressed from the genome of a certain organism. In this experiment, proteomics analysis by a combination of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry in comparison with high performance liquid chromatography (HPLC) and conventional sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and a new lab-on-a-chip technology were used to study snake venoms from the *Elapidae* and *Viperidae* families. From HPLC analysis, snake venoms from the same species exhibited the same or different chromatograms. Snake venoms from different species exhibited different chromatograms which demonstrated different proteins compositions. From SDS-PAGE analysis, venoms from *Elapidae* family showed high concentration of proteins which had molecular weight lower than 30 kDa. The *Viperidae* snake venoms showed major protein bands in a wider molecular weight range. The result was according to lab-on-a-chip analysis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Venoms from the same and different species from both families were studied by wide and narrow range pH in two-dimensional electrophoresis. Venoms in the *Elapidae* family had high abundant proteins of low molecular weight with basic properties grouped together in the lower right region of the 2-DE gels. Venoms in the *Viperidae* family demonstrated more different proteins pattern between different species. Narrow pH range 2-DE revealed more protein spots which was allowed for better results of protein identification obtained from mass spectrometry. In multidimensional electrophoresis analysis of snake venoms, two protein peaks from HPLC of *V. russelli siamensis* were collected and analyzed by 2-DE. Two-dimensional electrophoretic gels showed many proteins spots with different p*I*s and molecular weights in one peak of protein. Many of the proteins were present as trains of spots.

About 140 spots were excised from 2-DE gels of eight species. The proteins were digested with trypsin and analysis by mass spectrometry. The peptides mass data were matched against theoretical peptide mass in NCBI and SwissProt databases with limited identification parameters. Many of identified proteins were enzymes. There were many proteins that bound to nucleic acid, heat shock proteins, protein kinases, dehydrogenases, protein disulfide isomerases and other proteins.

Lectins were used as a tool for studying glycoprotein in snake venoms. Lectin binding for glycoprotein screening in snake venoms found that proteins in one snake venoms could bind to many kinds of lectins. It was found that all venoms used in the experiment had glycoproteins bound to lectin specifically for sialic acids. Lectin-Sepharose affinity purifications of glycoproteins were done in *N. naja kaouthia*, *O. hannah* and *Tr. stejnegeri* venoms. The results demonstrated that large amount of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

proteins in snake venoms were glycoproteins. Some of glycoproteins in *N. naja kaouthia* venom were identified.

Snake venom microarray for future clinical diagnostics was studied. Snake venom's antibodies were labeled with fluorescence compounds FITC and Cy dyes. The antibodies' specificity and cross reactivity were tested. Since they were polyclonal antibodies, cross reactivity to other snake venoms in the same family were found. It was found that the antibodies could detect snake venom antigen at low concentration as 10 ng. Conditions for antibodies immobilization and antigen detection were tested on SuperAmine and SuperAldehyde chips. In this experiment glutaraldehyde was a good immobilizing agent for antibody immobilization on chips surface. In addition, proteins which had potential as protein markers for producing snake venoms microarray, in specific snake venoms, were identified.

Phosphodiesterase from *V. russelli siamensis* venom were selected for purification. The enzyme was glycoprotein and was purified by Con A- Sepharose affinity purification and ion exchange chromatography. The enzyme has molecular weight about 125 kDa. It had maximal activity at 60°C and was active at pH range 7-10. Various compounds such as DTT, Cysteine, AMP, PMSF and EDTA inhibited the enzyme's activity. Metal ions were important for the enzyme's activity so it was metalloenzyme. The enzyme had K_m of 1.2 mM and V_{max} of 12.5 U/ml/min.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ โปรติโอมิกส์ของพิษงู

ผู้เขียน นางสาวจิราพร นาวารักษ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล ประธานกรรมการ

ศ. ดร. ส่วยเทียน เฉิน กรรมการ

อ. ดร. ดารารัตน์ ทองขาว กรรมการ

บทคัดย่อ

โปรติโอมิกส์เป็นวิทยาการทางวิทยาศาสตร์ที่เริ่มมีมาเมื่อไม่นานนี้ เป้าหมายสำคัญของกาวิเคราะห์ โดยวิธีนี้ คือการศึกษาและการค้นพบโปรตีนใหม่ๆ ซึ่งเป็นผลผลิตของพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ในการทดลองนี้โปรติโอมิกส์ซึ่งเป็นการนำเอาเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีสแบบสองมิติ (Two-dimensional electrophoresis) ร่วมกับเครื่องวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสาร (mass spectrometry) มาศึกษาโปรตีนในพิษงูในสกุลอิลาปิเด (*Elapidae*) และ วิเปอริเด (*Viperidae*) โดยเปรียบเทียบกับเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เทคนิคเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบหนึ่งมิติ (SDS-PAGE) และเทคนิค แลปบนชิป (lab-on-a-chip) ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ในการวิเคราะห์โปรตีน จากการวิเคราะห์โดยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าพิษงูที่มีผลการวิเคราะห์โครมาโตแกรมแบบเดียวกันคือพิษงูจากสายพันธุ์เดียวกันเช่น งูแมวเซา (*Vipera russelli*) พิษงูเห่าสายพันธุ์นิกริคอลิด (*Naja nigricollis*) และงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) ซึ่งมาจากงูคนละตัว พิษงูจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกันมีผลการวิเคราะห์โครมา-โตแกรมที่แตกต่างกันซึ่งแสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบของโปรตีนที่แตกต่างกันของพิษงู จากการศึกษาพิษงูโดยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบหนึ่งมิติพบว่าพิษงูจากสกุลอิลาปิเด มีองค์ประกอบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าสามสิบกิโลดาลตัล (kDa) อยู่ในความเข้มข้นที่สูง ส่วนพิษงูในสกุลวิเปอริเดนั้นมีความแตกต่างของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดแตกต่างกันมากกว่า ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยเทคนิคแลปบนชิป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ศึกษาพิษงูจากสายพันธุ์เดียวกันและต่างสายพันธุ์กันจากทั้งสองสกุลโดยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบสองมิติทั้งแบบพีเอชช่วงกว้างและช่วงแคบพบว่าพิษงูจากสกุลอิลาปิเดมีรูปแบบของโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน และพบว่าพิษงูในสกุลนี้มีโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่ำและมีความเป็นด่างสูงอยู่ในความเข้มข้นสูง พิษงูในสกุลวิเปอริเดมีความแตกต่างขององค์ประกอบโปรตีนที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์มากกว่า จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคเจลอีเลคโตรโฟริซีสสองมิติในช่วงพีเอชแคบพบว่าจำนวนของโปรตีนที่แยกได้มีจำนวนมากขึ้นซึ่งมีประโยชน์ในการวิเคราะห์โปรตีนโดยเครื่องวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสาร ในการวิเคราะห์พิษงูโดยอิเลคโตรโฟริซิสแบบหลายมิติ (multidimensional electrophoresis) นั้น โปรตีนจากการวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ถูกนำมาวิเคราะห์โดยเจลอิเลคโตรโฟริซิสแบบสองมิติพบว่าในหนึ่งพีคของโปรตีนประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ที่มีขนาดโมเลกุลและค่าไอโซอิเลคตริค (p*I*) ที่แตกต่างกันและพบว่ามีโปรตีนหลายจุดที่เรียงอยู่ในแนวเดียวกัน

จุดโปรตีนบนเจลจากการวิเคราะห์โดยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบสองมิติถูกตัดออกมาเพื่อย่อยโดยเอนไซม์ทริปซินและวิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์มวลโมเลกุล เนื่องจากความจำกัดทางฐานข้อ มูลโปรตีนสำหรับพิษงู ฐานข้อมูลโปรตีนที่ไม่จำกัดชนิดของสิ่งมีชีวิตจาก NCBI และ SwissProt ได้ถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลของโปรตีนจากพิษงูที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์มวลโมเลกุล พบว่าโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จำนวนมากเป็นเอนไซม์และมีโปรตีนจำนวนหนึ่งซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับสารพันธุกรรมได้ โปรตีนที่ถูกสร้างจากการผันแปรของอุณหภูมิ (heat shock protein) โปรตีนไคเนส (kinase) ดีไฮโดรจิเนส (dehydrogenase) โปรตีนไดซัลไฟไอโซเมอเรส (disulfide isomerase) และโปรตีนชนิดอื่นๆ

เลคติน (lectin) ถูกใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการศึกษาไกลโคโปรตีนในพิษงู จากการตรวจไกลโคโปรตีนในพิษงูโดยจับกับเลคตินหลายชนิดพบว่าพิษงูหนึ่งชนิดสามารถจับกับเลคตินได้หลายชนิดและพบว่าพิษงูที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดมีไกลโคโปรตีนที่จับกับเลคตินที่จับจำเพาะกับกรดเซียลิค (sialic acid) ในการทำไกลโคโปรตีนจากพิษงูให้บริสุทธิ์โดยใช้เลคตินที่จับกับตัวค้ำจุน (lectin-sepharose)ได้ทดลองกับพิษงูเห่าไทย งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) และงูเขียวไม้ไผ่ไต้หวัน (*Trimeresurus stejnegeri*) พบว่าโปรตีนจำนวนมากที่อยู่ในพิษงูเหล่านี้เป็นไกลโคโปรตีน

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นด้านไมโครอะเรย์ของพิษงู (snake venoms microarray) เพื่อใช้สำหรับการตรวจทางการแพทย์ในอนาคต ในการทดลอง แอนติบอดีของพิษงูจะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC และ Cy dye เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้เป็นโพลีโคลน (polyclonal antibody) พบว่าสามารถจับกับพิษงูอื่นๆในสกุลเดียวกันได้ แอนติบอดีของพิษงูที่ใช้สามารถตรวจจับโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในพิษงูที่ความเข้มข้นต่ำสุดสิบนาโนกรัม สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงแอนติบอดีบนผิวของชิป ได้รับการตรวจสอบโดยใช้ชิปทางการค้า ในการทดลองพบว่าสารกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เหมาะสำหรับเป็นตัวตรึงแอนติบอดีให้ติดอยู่บนผิวชิป นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนซึ่งเลือกมาจากเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบสองมิติเพื่อใช้ในการผลิตแอนติบอดีสำหรับผลิตไมโครอะเรย์ของพิษงูในอนาคต

เอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (phosphodiesterase) จากพิษงูแมวเซาไทย (*V. russelli siamensis*) ได้ถูกเลือกเพื่อทำการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้เป็นไกลโคโปรตีนและได้ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะกับ Con A ร่วมกับโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 125 กิโลดาลตัล มีแอคติวิตีสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียสและมีความไวในการทำปฏิกิริยาในช่วงพีเอช 7.5-10 สารบางอย่างเช่น DTT, Cysteine, AMP, PMSF และ EDTA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์ตัวนี้มีค่า K_m ประมาณ 1.2 mM และ V_{max} เท่ากับ 12.5 U/ml/min.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved