บทคัดย่อ

220776

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษารูปแบบโปรติโอมส์ของโปรตีนในน้ำพิษ ทำบริสุทธิ์ หาลำดับกรดอะมิโน และตรวจฤทธิ์ของ toxin ในพิษสัตว์ของสัตว์พิษที่พบในท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 5 ชนิด คือ (1) แมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*), (2) มดคันไฟไทย (*Solenopsis geminata*), (3) ต่อหัวเสือ (*Vespa affinis*), (4) ต่อหลุม (*Vespa tropica*), (5) ตะขาบ (*Scolopendra* sp.)

สำหรับแมงป่องช้าง จากการวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE แล้วทำการตัด major spot (HL1-HL7) ไปทำ peptide mass fingerprint แล้วค้นใน database พบว่าโปรตีนเหล่านั้น ไม่พบความเหมือนกับโปรตีนใดของ Arthropod คาดว่าอาจเป็นโปรตีนตัวใหม่ในพิษแมงป่องช้าง หรือโปรตีนไม่บริสุทธิ์พอ แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS พบว่า HL1 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ Imperatoxin ของแมงป่องจักรพรรดิ (*Pandinus* imperator) จากนั้นเพื่อให้แน่ใจ จึงได้นำน้ำพิษมาแยกด้วย 2D-PAGE อีก แล้วส่ง 17 spot ไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS พบเอนไซม์ Phospholipase และ Imperatoxin ดังนั้น จึงได้ทำบริสุทธิ์ Imperatoxin-like protein โดยนำน้ำพิษแมงป่องช้างมาผ่าน gel filtration column และ cationic column พบว่า ได้โปรตีนบริสุทธิ์ขนาด 14 kDa ทำการยืนยันด้วย 2D-PAGE และ LC-MS/MS ต่อไป นอกจากนี้แล้ว ยังได้หาลำดับกรดอะมิโนของ Heteroscorpine-2 (HS-2) และ HS-3 ในพิษแมงป่องช้างจากภาคเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย เมื่อเปรียบเทียบแล้วพบว่า HS-1, -2 และ -3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเล็กน้อย และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 100% และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ HS ไปสร้างโครงสร้างสามมิติ พบว่า domain ที่ประกอบขึ้นจากลำดับกรดอะมิโน ลำดับที่ 54 ถึง 89 เป็นบริเวณที่สำคัญต่อฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์ของ HS

ส่วนน้ำพิษมดคันไฟไทยนั้น จากการวิเคราะห์น้ำพิษด้วย 2D-PAGE แล้วตัดส่ง spot S1 ถึง S4 ไปหาลำดับกรดอะมิโนบางส่วนด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่า S1 และ S2 ไม่สามารถจำแนกชนิดของโปรตีนได้ ส่วน S3 คล้ายกับ Sol i 3 และ S4 คล้ายกับ Sol i 2 ซึ่งทั้งสองเป็น allergen ในน้ำพิษของ *S. invicta* (มดคันไฟในสหรัฐอเมริกา) ดังนั้น S4 ก็คือ Sol gem 2 เมื่อหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลายอะมิโนของ Sol gem 2 พบว่ามีลำดับคือ (A/D)NEEL(K/A/L)(I/V/Q)(I/T/L)RK คล้ายกับ Sol i 2 ถึง 80% จึงได้ออกแบบ primer จาก Sol i 2 แล้วใช้วิธี RT-PCR ได้ PCR product ขนาด 345 และ 418 bp จึงส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า Sol gem 2 คล้ายคลึงกับ Sol i 2 ถึงร้อยละ 71-85 ต่อมาภายหลังทำ RT-PCR แล้ว sequence ซ้ำอีก พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้แตกต่างจากที่เคยได้ถึงร้อยละ 21 ทำให้ยังสรุปลำดับกรดอะมิโนของ Sol gem 2 ไม่ได้ เมื่อทำการตรวจความจำเพาะของโปรตีนในน้ำพิษด้วย 2D-PAGE ด้วย anti-S3 antibody ด้วยวิธี Western immunoblotting กลับพบว่า แอนติบอดีจับได้กับ Sol gem 2 (มีขนาดราว 16 kDa) ซึ่งทำให้เกิดข้อสงสัยว่าโปรตีน S3 (ที่มีขนาด 30 kDa) อาจเป็น dimer ของ Sol gem 2 ก็เป็นได้ นอกจากนี้แล้วได้นำ

S3 ไปกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูถีบจักร ได้แอนติบอดีที่มีค่าไตเตอร์ราว 1:2500 ถึง 1:12500 (ด้วยวิธี ELISA) หรือ 1:1000 (ด้วยวิธี Western immunoblotting) และมีความจำเพาะสูง และ anti-S3 antibody ลบล้างพิษของมดคันไฟ โดยเพิ่มค่า PD_{50} ของน้ำพิษในจิ้งหรีดได้ถึง 5 เท่า

สำหรับต่อหัวเสือ ต่อมพิษและน้ำพิษของต่อหัวเสือ ถูกแยกด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าต่อมพิษให้แถบโปรตีน 7 แถบหลัก ส่วนน้ำพิษให้ 4 แถบหลัก จากนั้น นำไปแยกบริสุทธิ์โปรตีนในน้ำพิษด้วยวิธี 2D-PAGE พบว่า spot ของโปรตีนในน้ำพิษมีสิ้นราว 20 spot ส่ง spot ทำ peptide mass fingerprint ด้วย MALDI-TOF และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Mascot ได้ผลเพียง 1 spot คือ VA2 คล้ายกับ ovalbumin ของไข่ไก่ จากนั้น ส่งวิเคราะห์ต่อด้วย LC-MS/MS พบว่า VA12 น่าจะเป็น allergen 5 และจะได้ศึกษาโปรตีนที่น่าสนใจเช่น phospholipase, albumin-like protein ต่อไป

สำหรับต่อหลุม นำน้ำพิษที่ได้มาแยกด้วยวิธี 2D-PAGE พบว่าได้โปรตีน 21 spot ส่งวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS แล้วนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาค้นในฐานข้อมูล พบว่า โปรตีนที่จำแนกได้จำนวนหนึ่งคล้ายกับเอนไซม์ hyaluronidase, phospholipase, antigen 5, dipeptidylpeptidase จากต่อและแตนสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานไว้ และยังพบ albumin อีกด้วย ดังนั้น จึงเลือกศึกษาโปรตีนเหล่านี้ในน้ำพิษ ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนโปรตีนด้วยวิธี RT-PCR รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ และการสร้างแอนติบอดีต้านต่อโปรตีนเหล่านี้

สำหรับตะขาบ ตะขาบที่รับซื้อไว้จะถูกนำมาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ น้ำพิษตะขาบรีดได้ด้วยการช็อคตะขาบด้วยความเย็นเพื่อให้อยู่นิ่ง แล้วกระตุ้นให้หลั่งน้ำพิษด้วยไฟฟ้า จากนั้นวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบแถบโปรตีนราว 10 แถบหลัก และเมื่อวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE พบราว 57 spot ได้ทำการตัด spot ส่งหาลำดับกรดอะมิโนบางส่วน ด้วยวิธี LC-MS/MS ที่สถาบันจีโนม สวทช. ต่อไปแล้ว

Abstract

220776

This study was trying to find out proteomic patterns of venoms from venomous animals locally found in the Northeastern part of Thailand. Purification, amino acid sequence determination and characterization of biological activity of main protein components had been performed, as well. Five venomous species were used. They were giant scorpion (*Heterometrus laoticus*), fire ant (*Solenopsis geminata*), dead hornets (*Vespa affinis*), great banded, dead hornet (*Vespa tropica*) and centipede (*Scolopendra* sp.)

For giant scorpion (*H. laoticus*), after analysis by 2D-PAGE, major spots, HL1-HL7, were cut for peptide mass fingerprint analysis and searched in database. Unfortunately, no matching to any arthropod proteins was obtained suggesting of no data availability. Otherwise, spot from 2D-PAGE profiles were contaminated with other proteins. However, after partial amino acid sequence with LC-MS/MS analysis, HL1 showed similarity to Imperatoxin, toxin in the venom of emperor scorpion (*Pandinus* imperator) in Africa. For confirmation, crude venom was separated again with 2D-PAGE. Total of 17 spots were analyzed with LC-MS/MS. Enzymes phospholipase and imperatoxin were identified. To purify imperatoxin-like protein, crude venom was loaded on gel filtration column and cationic column. The protein has to be further purity checked with 2D-PAGE and LC-MS/MS later. Heteroscorpine-2 (HS-2) and HS-3, from venom of Heterometrus from the North and South of Thailand, had been nucleotide sequence determined. After comparing, HS-1, -2 and -3 showed nearly the same nucleotide sequence whereas amino acid sequences were exactly similar. After HS was analyzed for 3 dimensional structures, domain composing of amino acid residue number 54 until 89 was clearly shown to be very important for anti-bacterial activity of HS.

For venom of fire ants (*S. geminata*), spots of crude venom, S1 to S4, after separated by 2D-PAGE was furthered analyzed for partial amino acid by LC-MS/MS. S1 and S2 were unidentified whereas S3 and S4 showed high similarity to Sol i 3 and Sol i 2, respectively. Sol i 2 and Sol i 3, are allergens in venom of *S. invicta* (American imported red fire ant). After N terminal analysis by Edman degradation, amino acid sequence at amino terminus of Sol gem 2 was identified as (A/D)NEEL(K/A/L)(I/V/Q)(I/T/L)RK, similar to Sol i 2. Thus S4 might be Sol gem 2. For determination of full length of Sol gem 2, RT-PCR had been performed using primer designed from sequences of Sol i 2 and Sol r 2. PCR product with 345 and 418 bp in

size were obtained. After nucleotide sequencing and amino acid deducing, Sol gem 2 showed 71-85% similarity to Sol i 2. However, after repeating, amino acid sequence was 21% different. Thus, sequence of Sol gem 2 still unclear. However, after Western immunoblotting analysis of venom separated by 2D-PAGE with anti-S3 antibody, the antibody was able to detect Sol gem 2 (a 16-kDa protein) suggesting that S3 (a 30-kDa protein) may be a dimer of Sol gem 2. Anti-S3 antibody was produced in mice. It showed titer between 1:2500 to 1:12500 (by ELISA) or 1:1000 (by Western immunoblotting) with high specificity. The antibody was able to neutralize toxicity of crude venom by increasing PD_{50} in cricket (Gryllus sp.) about 5 times.

For dead hornets (*V. affinis*), 7 and 4 major proteins were found in gland extract and crude venom, respectively, after resolving by SDS-PAGE. There are 20 spots after crude venom was analyzed by 2D-PAGE. These spots were furthered analyzed for peptide mass fingerprint by MALDI-TOF. After Mascot analysis, only 1 spot (VA2) was identified with high similarity to ovalbumin from chicken eggs. Further analysis with LC-MS/MS showed that VA12 was allergen 5. Phospholipase and albumin-like protein are under investigation.

For great banded, dead hornets (*V. tropica*), 2D-PAGE analysis of crude venom revealed 21 spots. After LC-MS/MS analysis, they are identified as hyaluronidase, phospholipase, antigen 5, dipeptidylpeptidase and albumin. More information is under studied.

For centipede (*Scolopendra* sp.), they were cold shocked first, and then venom was collected by electrical shock. SDS-PAGE analysis revealed 10 major bands in crude venom. About 57 spots were obtained from 2D-PAGE profile. These spots are under investigation by LC-MS/MS.