



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การหาลำดับกรดอะมิโนและการตรวจฤทธิ์
ของโปรตีนและเปปไทด์ในน้ำพิษของสัตว์ต่าง ๆ ในท้องถิ่น
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย

รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดา ดาดวง

30 พฤศจิกายน 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การหาลำดับกรดอะมิโนและการตรวจฤทธิ์
ของโปรตีนและเปปไทด์ในน้ำพิษของสัตว์ต่าง ๆ ในท้องถิ่น
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย

รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดา ดาดวง

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากแหล่งทุนดังต่อไปนี้ (1) ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปีงบประมาณ 2550-2552 (2) ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2550, 2551, 2552 และ 2553 (3) ทุนโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา หลักสูตรปริญญาเอกในประเทศ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปี 2550, 2551 (4) ทุนโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปี 2550 (5) ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)-สถาบันการศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (WINDOW II) ประจำปี 2551 (6) ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) รุ่นที่ 9 (7) โครงการอุตสาหกรรมสำหรับนักศึกษาปริญญาตรี (RPUS) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม ปี 2550

ทั้งนี้ ต้องขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ และต้องขอขอบคุณที่มวิจัย ซึ่งได้แก่ รศ.ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์ แห่งภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, รศ.ดร.อรุณรัตน์ จีวีราช แห่งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ผศ.ดร.วรรณดี บัญญัติรัชต แห่งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รวมทั้ง ผู้ช่วยวิจัยและผู้รับทุนวิจัย ได้แก่ ดร.นันทวัน เอื้อวงศ์กุล, นายปรุพท์ภรณ์ อินทร์คำน้อย, นางสาวโสภิตา สุขประเสริฐ, นายธีรวัฒน์ นามนไสย์, นางสาวประเพ็ญพัทธ์ศิริ รังษา และนางสาวมูจลินท์ เหมือนจันทร์

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU 5080013
โครงการ : การหาลำดับกรดอะมิโนและการตรวจฤทธิ์ของโปรตีน
และเปปไทด์ในน้ำพิษของสัตว์ต่าง ๆ ในท้องถิ่นภาค
ตะวันออกเฉียงเหนือของไทย
นักวิจัย และสถาบัน : รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดา ดาดวง
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ที่อยู่อีเมล : sakdad@kku.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 1 ธันวาคม 2549 ถึง 30 พฤศจิกายน 2552

น้ำพิษ (venom) เป็นแหล่งรวมของโมเลกุลที่มีฤทธิ์จำนวนมาก งานวิจัยทั่วโลกทำให้ทราบว่ายุงประกอบหลักอย่างหนึ่งในน้ำพิษนั้น คือโปรตีนหรือเปปไทด์และมีฤทธิ์หลากหลาย บางตัวถูกนำมาพัฒนาในเชิงพาณิชย์ สำหรับประเทศไทยของเรานั้น งานวิจัยด้านพิษสัตว์ในแง่ขององค์ประกอบ ฤทธิ์และโครงสร้างระดับโมเลกุลยังมีน้อยมาก ในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาองค์ประกอบของน้ำพิษที่เป็นโปรตีนและเปปไทด์ ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ รวมทั้งหาลำดับกรดอะมิโนของน้ำพิษของสัตว์พิษที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การศึกษากระทำกับน้ำพิษสัตว์หลายชนิดได้แก่ (1) น้ำพิษแมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*) ค้นพบ phospholipase เป็นองค์ประกอบหลัก ได้โปรตีน Heteroscorpine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด สามารถโคลนและเพิ่มจำนวนได้ในอีโคไล ส่วน Heteromtoxin มีฤทธิ์คล้าย Imperatoxin ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาเพื่อการรักษาโรคหัวใจได้ในอนาคต (2) น้ำพิษมดคันไฟ (*Solenopsis geminata*) โปรตีนในน้ำพิษเป็น allergen ได้ลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้นและได้โครงสร้างสามมิติของ Solgem 4 พบว่า แอนติบอดีต่อโปรตีนในน้ำพิษสามารถยับยั้งฤทธิ์ของน้ำพิษได้ดี แสดงว่า piperadine derivative ซึ่งเป็นตัวออกฤทธิ์หลักในน้ำพิษต้องอาศัยการทำงานของโปรตีนร่วมด้วย (3) น้ำพิษต่อหัวเสือและต่อหลุม (*Vespa affinis* และ *V. tropica*) พบโปรตีนหลัก 5 ชนิดคือ dipeptidylpeptidase IV, hyaluronidase, phospholipase, venom allergen 5 และ albumin คาดว่า hyaluronidase น่าจะเป็นตัวกำหนดความรุนแรงของน้ำพิษจากต่อทั้งสองชนิด (4) น้ำพิษของตะขาบ (*Scolopendra subspinipes dehaani*) ค้นพบ venom allergen protein, serine protease, trypsin และ hyaluronidase ซึ่งโปรตีนเหล่านี้หลายตัวเป็นที่น่าสนใจในแง่การประยุกต์ใช้

คำหลัก: น้ำพิษ, สัตว์พิษ, มดคันไฟ, แมงป่องช้าง, ต่อหัวเสือ, ต่อหลุม, ตะขาบ, *Heterometrus laoticus*, imperatoxin, *Solenopsis geminata*, *Vespa affinis*, *Vespa tropica*, *Scolopendra subspinipes dehaani* hyaluronidase, phospholipase

Abstract

Project Code : RMU 5080013

Project Title : Amino acid sequence determination and investigation of activity of proteins and peptides in venom from local animals in the Northeastern part of Thailand

Investigator : Associate Professor Dr. Sakda Daduang
Department of Biochemistry, Faculty of Science,
Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

E-mail Address : sakdad@kku.ac.th

Project Period : from 1 December 2006 until 30 November 2009

Venoms from venomous animals are rich sources of bioactive compounds. Peptides are compounds with a variety of actions. Many have been developed for therapeutic and commercial uses. For Thailand, especially those locally reside in the Northeastern, their details are still rare. In this study, venom components was characterized, identified and tested for biological activities. Full amino acid had been determined, as well. **(1)** For **giant scorpion** (*Heterometrus laoticus*) venom, it mainly composed of phospholipase. Heteroscorpine was found as anti-bacterial agent. It was cloned and bacterial expressed. Heteromtoxin showed high similarity to Imperatoxin, from African scorpion, *Pandinus imperator*. It is believed to be developed for cardiac disease therapy in the future. **(2)** For **red fire ant** (*Solenopsis geminata*) venom, Solgem 4 was clarified as an allergenic protein with full length amino acid and 3 dimensional structure determinations. Surprisingly, antibody against this group of proteins delayed functions of piperadine derivative, main component in the venom. **(3)** For **wasp** venom (*Vespa affinis* and *V. tropica*), major 5 was identified as dipeptidylpeptidase IV, hyaluronidase, phospholipase, venom allergen 5 and albumin. Hyaluronidase was predicted to be the key molecule of venom potency. **(4)** For **centipede** (*Scolopendra subspinipes dehaani*) venom, allergenic protein, serine protease, trypsin and hyaluronidase were identified. These may be developed for further applications in the near future.

Keywords : fire ant, *Heterometrus laoticus*, imperatoxin, scorpion, Solgem 4, *Solenopsis geminata*, venom, *Vespa affinis*, *Vespa tropica*, wasp, hyaluronidase, phospholipase

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 น้ำพิษของแมงป่องช้าง (<i>Heterometrus laoticus</i>)	5
2.2 น้ำพิษมดคันไฟไทย (<i>Solenopsis geminata</i>)	11
2.3 น้ำพิษของต่อและแตน	12
2.4 การใช้ประโยชน์โปรตีนจากน้ำพิษ	14
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง	30
4.1 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษแมงป่องช้าง (<i>Heterometrus laoticus</i>) การ ทำบริสุทธิ์, การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออก ฤทธิ์ในน้ำพิษ และการผลิตแอนติบอดีต้านพิษ	30
4.1.1 แมงป่องช้างและการรีดพิษ	30
4.1.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษแมงป่องช้าง	31
4.1.3 การหาลำดับกรดอะมิโนของ Heteroscorpine ในพิษแมงป่องช้างจาก ภาคเหนือ (<i>H. laoticus</i>) และ ภาคใต้ (<i>H. cimrmani</i>) ของประเทศไทย	38
4.1.4 การสร้างยีน recombinant Heteroscorpine-1 (recHS-1) และการผลิต และทำบริสุทธิ์โปรตีน recombinant HS-1 (recHS-1)	47
4.1.5 การทำบริสุทธิ์, หาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพ ของโปรตีน Heteromtoxin (HmTx) ในน้ำพิษแมงป่องช้าง	56
4.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษมดคันไฟ (<i>Solenopsis geminata</i>) การทำ บริสุทธิ์, การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออกฤทธิ์ ในน้ำพิษ และการผลิตแอนติบอดีต้านพิษ	78
4.2.1 มดคันไฟและการรีดพิษ	78
4.2.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษมดคันไฟ	79
4.2.3 การหาลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติของ Solgem 4 ในน้ำพิษ มดคันไฟไทย	84
4.2.4 การสร้างแอนติบอดีต้านต่อ Solgem 2	98
4.3 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสือ (<i>Vespa affinis</i>) การทำบริสุทธิ์, การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออกฤทธิ์ในน้ำพิษ และการผลิตแอนติบอดีต้านพิษ	101
4.3.1 ต่อหัวเสือ และการรีดพิษ	101
4.3.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสือ	102

4.3.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน และโครงสร้างสามมิติ ของ Vespapase-1 (VPase-1) ในน้ำพิษของต่อหัวเสือ	111
4.3.4 การหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Vespumin ในน้ำพิษต่อหัวเสือ	119
4.3.5 การตรวจฤทธิ์ของเอนไซม์ Hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหัวเสือ	123
4.4 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษต่อหลุม (<i>Vespa tropica</i>) การหาลำดับ กรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออกฤทธิ์ในน้ำพิษ และการ ผลิตแอนติบอดีเพื่อพัฒนาเซรุ่มต้านพิษ	124
4.4.1 ต่อหลุมและการรื้อพิษ	124
4.4.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษต่อหลุม	125
4.4.3 การทำบริสุทธิ์, การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทาง ชีวภาพของเอนไซม์ Hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหลุม และการสร้าง แอนติบอดีต้านพิษ	131
4.4.4 การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนไซม์ Phospholipase ในน้ำพิษต่อหลุม และการสร้างแอนติบอดีต้านพิษ	137
4.4.5 ข้อเปรียบเทียบระหว่างน้ำพิษของต่อหัวเสือ (<i>V. affinis</i>) และต่อหลุม (<i>V. tropica</i>)	142
4.5 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษตะขาบ (<i>Scolopendra subspinipes dehaani</i>) การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออก ฤทธิ์ในน้ำพิษ	144
4.5.1 ตะขาบและการรื้อพิษ	144
4.5.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษตะขาบ	145
4.5.3 การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนไซม์ Phospholipase ในน้ำพิษตะขาบ	161
4.6 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษผึ้งมัม (<i>Apis florea</i>)	166
บทที่ 5 สรุปและบทวิจารณ์	168
กิตติกรรมประกาศ	171
หนังสืออ้างอิง	171
ผลผลิต (Output) จากโครงการวิจัย	176

บทที่ 1 บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น มีความหลากหลายด้านชีวภาพติดอันดับ 1 ใน 10 ของโลก ดังนั้น จึงมีทรัพยากรทางชีวภาพไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์อยู่เป็นจำนวนมากมหาศาล ประมาณกันว่า มีจำนวนพืชอยู่ไม่น้อยกว่า 20,000 ชนิดและสัตว์อีกกว่า 87,500 ชนิด นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรีย รา และจุลินทรีย์ต่าง ๆ อีกมากมาย ปัจจุบัน การศึกษาสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ในแง่ของสัจจนาวิทยา กายวิภาคศาสตร์ ชีววิทยา และด้านสิ่งแวดล้อมมีอยู่ค่อนข้างมาก แต่กลับพบว่า การศึกษาด้านชีวเคมีและชีวเคมีเชิงลึก การศึกษาชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบ ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน เอนไซม์ คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก (ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ) ยังมีอยู่น้อยมาก กอปรทั้งทรัพยากรเหล่านี้ กำลังจะหมดไป สูญพันธุ์ หรือสูญหายไป จากการบริโภค การรุกรานที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ การเกษตรกรรม แผนใหม่ที่เน้นการส่งออกที่ต้องใช้พื้นที่มากและขาดความหลากหลายทางชีวภาพ การทำลายทิ้งโดยตรงด้วยคิดว่าไม่ก่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ หรือคิดว่าเป็นสิ่งที่มีอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์อื่น การเผาและตัดไม้ทำลายป่า การใช้ยาฆ่าแมลง สารเคมีกำจัดศัตรูพืช สารเคมีกำจัดวัชพืช เชื้อโรค เชื้อราต่าง ๆ รวมไปถึงการถูกชาวต่างชาตินำไปศึกษาแล้วจดสิทธิบัตร กลายเป็นสมบัติของต่างชาติไป ทำให้เราต้องสูญเสียสิ่งมีชีวิตมีค่าเหล่านี้ไปทั้ง ๆ ที่ยังไม่ได้รับการศึกษาเท่าที่ควร ทำให้ในที่สุดเราเองผู้เป็นเจ้าของทรัพยากร ต้องกลับกลายเป็นผู้ทอดทิ้งทรัพยากร และขาดโอกาสในการใช้ทรัพยากรนั้น หรือมีการใช้ทรัพยากรแต่ไม่คุ้มค่าและยั่งยืนนาน และปราศจากมูลค่า

ในอีกทางหนึ่ง ผลิตภัณฑ์ด้านชีวภาพ เช่น ยา สมุนไพร เอนไซม์ โปรตีน เชื้อจุลินทรีย์ และอื่น ๆ นั้น จำนวนมากได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ หรือดัดแปลงจากธรรมชาติ เช่น โปรตีนอัลบูมิน และไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ ยารักษาโรคกระเพาะจากต้นเปล่าน้อย ยารักษาโรคความดันโลหิตสูง และยาต้านการแข็งตัวของเลือดบางชนิดจากพิษงู เอนไซม์จำนวนมากจากเชื้อจุลินทรีย์ในดิน ประเทศของเรากลับนำเข้าผลิตภัณฑ์เหล่านี้มูลค่ามหาศาล ยาที่ใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ นั้นแทบไม่ต้องกล่าวว่าปริมาณการนำเข้ามีมูลค่ามหาศาลสักเพียงใด เอนไซม์ไลโซไซม์ เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ยาและงานวิจัย มีมูลค่าการนำเข้าหลายสิบล้านบาทต่อปี เอนไซม์อะไมเลส ซึ่งนำเข้ามาเพื่อการผลิตเอทานอลจากแป้งและมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียว ก็มีมูลค่าการนำเข้าถึงกว่า 100 ล้านบาทต่อปี (ตัวเลขจากคำกล่าวของ ศ.ดร.ยงยุทธ ยุทธวงศ์ อดีต รว.กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) เชื้อยีสต์เพื่อการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์และไวน์ ก็มีมูลค่ามหาศาล (ตัวเลขไม่เป็นที่เปิดเผย) และยังมีเอนไซม์ต่าง ๆ อีกมาก ทั้งที่จริงแล้วผลิตภัณฑ์หลายอย่างก็นำเข้าจากต่างประเทศนั้นสามารถหา ผลิตและพัฒนาได้เองในประเทศของเรา

จากเหตุผลดังกล่าว ทำให้มีความจำเป็นเร่งด่วนในการศึกษาทรัพยากรชีวภาพของเราด้านชีวเคมีให้ลึกซึ้งและถ่องแท้ ความรู้พื้นฐานที่ได้ จะสามารถนำไปพัฒนาให้มีการประยุกต์ใช้ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับทรัพยากร ให้มีการใช้ทรัพยากรได้อย่างคุ้มค่าและยั่งยืน อันเนื่องมาจากการขาดแคลนทรัพยากรธรรมชาติและความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อมโลก ทวีความรุนแรงตามการเพิ่มขึ้นของประชากรโลก และการพัฒนาเศรษฐกิจ การเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศ และอุณหภูมิโลกที่สูงขึ้นจาก

ภาวะเรือนกระจก การสูญเสียโอโซนในชั้นบรรยากาศ การขาดแคลนแหล่งน้ำเพื่อการผลิตและบริโภค การขยายพื้นที่เพาะปลูกเพื่อเป็นอาหารและพลังงาน ทำให้พื้นที่ป่าไม้ลดลง ระบบนิเวศน์เสียสมดุล สูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพ จนนำไปสู่ความร่วมมือในสนธิสัญญาหลาย ๆ ฉบับ ที่เร่งรัดให้มีการดูแลทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมในหลาย ๆ ด้าน เพื่อให้เกิดการพัฒนาอย่างยั่งยืน และประเทศไทยได้ร่วมลงนามรับรองสนธิสัญญาอันหนึ่งก็คือ “อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (Convention on Biological Diversity) เพื่ออนุรักษ์และใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพของประเทศ” ในระหว่างการประชุมสหประชาชาติ ว่าด้วยสิ่งแวดล้อมและการพัฒนา เมื่อเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2535 ณ กรุงริโอ เดอ จาเนโร ประเทศบราซิล

น้ำพิษ (venom) ของสัตว์ต่าง ๆ เช่น งู แมงป่อง ตะขาบ ผึ้ง ต่อ แตน ปลา มด เป็นต้น นั้น น้ำพิษเป็นแหล่งรวมของโมเลกุลที่มีฤทธิ์ (active molecule) จำนวนมาก งานวิจัยทั่วโลกทำให้ทราบองค์ประกอบ ฤทธิ์ สมบัติ ตลอดจนโครงสร้างระดับโมเลกุลขององค์ประกอบเหล่านี้ จากรายงานดังกล่าว พบว่า องค์ประกอบหลักอย่างหนึ่งในน้ำพิษนั้น มีโครงสร้างเป็นโปรตีน หรือเปปไทด์ (peptide) สายสั้น ๆ มักไม่เกิน 10 กิโลดาลตัน และมีฤทธิ์แตกต่างกันไป เช่น มีฤทธิ์เป็น neurotoxin, cardiotoxin, ion channel blocker, proteinase เป็นต้น โครงสร้างระดับยีนและระดับกรดอะมิโนของโปรตีนและเปปไทด์เหล่านี้ถูกรวบรวมไว้เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูลพันธุกรรม (Gene Bank) ต่าง ๆ ได้แก่ GenBank (USA), DDBJ (Japan) และ EMBL ซึ่งปัจจุบันเปิดกว้างและสามารถเข้าไปตรวจสอบได้โดยง่ายทาง internet โปรตีนและเปปไทด์เหล่านี้จำนวนหนึ่งถูกนำมาดัดแปลงด้านโครงสร้าง และบางตัวได้กลายมาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ หรือใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลาย เช่น captopril ดัดแปลงมาจาก Teprotide ซึ่งเป็นเปปไทด์ในน้ำพิษของงูอเมริกาใต้ชนิด *Bothrops jararaca* ซึ่ง captopril มีฤทธิ์เป็น angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor ใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง ตัวอย่างอื่น ได้แก่ eptifibatide เป็น integrin inhibitor ใช้ป้องกัน blood clot ในผู้ป่วยโรคหัวใจ, mellitin จากพิษผึ้งมีฤทธิ์ anti-inflammatory ใช้รักษาผู้ป่วย rheumatoid arthritis, charybdotoxin, margatoxin จากแมงป่องชนิดต่าง ๆ ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับ potassium ion channel จนทำให้ทราบโครงสร้างของ channel อย่างถ่องแท้ พิษของสัตว์หลายชนิดกำลังอยู่ในระหว่างการตรวจสอบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา รวมไปถึงเชื้อโปรโตซัว มาลาเรีย อะมีบา พยาธิ เป็นต้น ดังนั้น น้ำพิษจากสัตว์พิษก็ถือว่าเป็นทรัพยากรอย่างหนึ่งที่จำเป็นต้องเร่งได้รับการศึกษา

สำหรับในประเทศไทยของเรานั้น งานวิจัยด้านพิษสัตว์ มักจะเป็นในแง่ของการรักษาผู้ได้รับพิษ เช่น การดูแลผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมลงสัตว์กัดต่อย การพัฒนาแอนติบอดีเพื่อแก้พิษงู เป็นต้น ส่วนงานวิจัยด้านพิษสัตว์ ในแง่ขององค์ประกอบ ฤทธิ์และโครงสร้างระดับโมเลกุล รวมถึงการประยุกต์ใช้อาจมีอยู่บ้างสำหรับพิษงู และพิษผึ้ง แต่พิษของสัตว์อื่น ๆ ยังมีอยู่น้อยมาก ดังนั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาในแง่ขององค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและเปปไทด์ สมบัติและตรวจฤทธิ์ของน้ำพิษของสัตว์ต่าง ๆ ที่มีในท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ไม่ว่าจะเป็นพิษแมงป่องช้าง พิษมดคันไฟไทย ต่อหัวเสือ หรือว่าต่อหลุม และค้นพบสารออกฤทธิ์หลายตัว เช่น phospholipase, hyaluronidase,

Heteromtoxin albumin เป็นต้น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการศึกษาเชิงลึกของโปรตีนเหล่านี้ พร้อมกับศึกษาความเป็นไปได้ของการนำโปรตีนเหล่านี้ไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า

นอกจากนี้แล้ว งานด้านการพัฒนาเซรุ่มสำหรับพิษสัตว์เหล่านี้ ยังมีน้อยมาก ในต่างประเทศ มีเซรุ่มสำหรับแมงป่องบางชนิดที่มีพิษร้ายแรง รวมทั้งแมงมุมบางชนิด แต่ในประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น ที่มีสัตว์เหล่านี้อยู่อย่างหลากหลาย แม้ว่าจะมีผู้ได้รับพิษจากสัตว์เหล่านี้เป็นจำนวนมากทุกปี และพิษสัตว์บางชนิดก็มีอันตรายถึงชีวิตซึ่งจะปรากฏเป็นข่าวทางด้านสื่อมวลชนอยู่บ่อย ๆ แต่ก็ยังไม่มีการพัฒนาเซรุ่มขึ้นมาใช้ ดังนั้น การพัฒนาเซรุ่มต้านต่อพิษสัตว์จึงน่าจะยังมีความสำคัญและจำเป็นต่อคุณภาพชีวิตประชาชน

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

น้ำพิษ (venom) ของสัตว์ต่าง ๆ เป็นแหล่งรวมของโมเลกุลที่มีฤทธิ์ (active molecule) จำนวนมาก งานวิจัยทั่วโลก รายงานถึงองค์ประกอบ ฤทธิ์ สมบัติ ตลอดจนโครงสร้างระดับโมเลกุลขององค์ประกอบเหล่านั้น พบว่า องค์ประกอบหลักอย่างหนึ่งในน้ำพิษนั้น มีโครงสร้างเป็นโปรตีนหรือโพลีเปปไทด์ (polypeptide) สายสั้น ๆ มักมีจำนวนกรดอะมิโนไม่เกิน 100 ตัว หรือมีน้ำหนักไม่เกิน 10 กิโลดาลตัน และมีฤทธิ์แตกต่างกัน เช่น มีฤทธิ์เป็น neurotoxin, cardiotoxin, ion channel blocker, proteinase เป็นต้น (Lewis และ Garcia, 2003) โครงสร้างระดับยีนและระดับกรดอะมิโนของโปรตีนและเปปไทด์เหล่านี้ถูกรวบรวมไว้เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูลพันธุกรรม (Gene Bank) ต่าง ๆ ได้แก่ GenBank (USA), DDBJ (Japan) และ EMBL ซึ่งปัจจุบันเปิดกว้างและสามารถเข้าไปตรวจสอบได้โดยง่ายทาง internet พบว่า โปรตีนและโพลีเปปไทด์เหล่านี้จำนวนหนึ่งถูกนำมาดัดแปลงด้านโครงสร้าง และบางตัวได้กลายมาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ หรือทางการค้า หรือใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลาย ตามตาราง

ตารางที่ 2.1 แสดงโปรตีนในพิษงูที่มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการแพทย์ (Koh และคณะ, 2006)

Drug/trade name®	Target and function/treatment	Source
Captopril; enalapril	ACE inhibitor/high blood pressure	<i>Bothrops jaracusa</i> (Brazilian arrowhead viper)
Integrilin (eptifibatide)	platelet aggregation inhibitor/acute coronary syndrome	<i>Sistrurus mliarius barbouri</i> (south-eastern pigmy rattlesnake)
Aggrastat (tirofiban)	GPIIb-IIIa inhibitor/myocardial infarct, refractory ischaemia	<i>Echis carinatus</i> (African saw-scaled viper)
Ancrod (Viprinex)	Fibrinogen inhibitor/stroke	<i>Agkistrodon rhodostoma</i> (Malayan pit viper)
Defibrase	thrombin and prothrombin inhibitor/acute cerebral infarction, unspecific angina pectoris	<i>Bothrops moojeni</i>
Hemocoagulase	thrombin-like effect and thromboplastin activity/prevention and treatment of haemorrhage	<i>Bothrops atrox</i>
Protac/protein C activator	protein C activator/clinical diagnosis of haemostatic disorder	<i>Agkistrodon contortix contortix</i> (American copperhead)
Reptilase	diagnosis of blood coagulation disorder	<i>Bothrops jaraca</i> (South American lance adder)
Ecarin	prothrombin activator/diagnostic	<i>E. carinatus</i>
Exanta; ximelagatran	blood thinner/anti-coagulant, thrombin inhibitor	Cobra

จากตาราง ก็ขอยกตัวอย่างเช่น captopril ดัดแปลงมาจาก Teprotide (เป็นเปปไทด์ในน้ำพิษของงูอเมริกาใต้ชนิด *Bothrops jararaca*) captopril มีฤทธิ์เป็น angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor ใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง (Lewis และ Garcia, 2003), eptifibatide เป็น integrin inhibitor ใช้ป้องกัน blood clot ในผู้ป่วยโรคหัวใจ (Hartman และคณะ, 1992), mellitin จากพิษผึ้ง มีฤทธิ์ antiinflammatory ใช้รักษาผู้ป่วย rheumatoid arthritis (Hartman และคณะ, 1991), charybdotoxin, margatoxin จากแมงป่องชนิดต่าง ๆ ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับ potassium ion channel จนทำให้ทราบโครงสร้างของ channel อย่างถ่องแท้ (Garcia และคณะ, 1999) เป็นต้น

2.1 น้ำพิษของแมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*)

แมงป่องเป็นสัตว์มีพิษที่อาศัยกระจายอยู่ทั่วไป คาดว่ามีไม่น้อยกว่า 1500 สปีชีส์ทั่วโลก ยกเว้นเขตขั้วโลก (Srinivasan และคณะ, 2002) มีเพียงราว 20 สปีชีส์ที่มีอันตรายถึงชีวิต สำหรับพิษของแมงป่องนั้น มีงานวิจัยจำนวนมากทั่วโลกเกี่ยวกับฤทธิ์ของโปรตีนและเปปไทด์ ในน้ำพิษ เช่น anti-ion channel, anti-bacterial, anti-fungal, anti-malarial, insecticide, analgesic, anti-nociceptive, anti-depression เป็นต้น (Guan และคณะ, 2001; Possani และคณะ, 1999, 2000, 2002; Rodriguez de la Vega และ Possani, 2004; Turkov และคณะ, 1997; Zhu และ Tytgat, 2004; นันทวัน เอื้อวงศ์กุล และศักดิ์ดา ดาดวง, 2552) โมเลกุลเหล่านี้มีขนาดเล็ก มักไม่เกิน 10 กิโลดาลตัน บางตัวถูกนำไปวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า เช่น toxin ชนิด AaIT ได้จากแมงป่อง *Androctonus australis* กำลังถูกพัฒนาเพื่อใช้เป็น insecticide (Zlotkin และคณะ, 2000) เนื่องจากเป็น toxin ที่มีความจำเพาะต่อ ion channel ของแมลง ดังนั้นในอนาคต อาจได้ยากำจัดแมลง) insecticide (ที่มีความปลอดภัยสูง และไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมภายนอก เนื่องจากเป็นโปรตีนจึงสลายตัวไม่ยาก และจากการศึกษาในภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ พบว่า แมลงชนิดต่าง ๆ มีความไวต่อพิษแมงป่องช้างแตกต่างกัน ปลวก (*Captotermes* sp.) มีความไวต่อพิษมากที่สุด โดยได้ค่า lethal dose 50 (LD₅₀) ต่ำที่สุด ดังนั้น หากมีการพัฒนาต่อไป อาจได้ insecticide ที่มีความจำเพาะต่อปลวก แต่มีพิษต่ำต่อมนุษย์และแมลงอื่น ๆ นอกจากนี้ ยังมี toxin ในกลุ่ม Scorpine (สคอร์ไพน์) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Panscorpine ซึ่งได้จากแมงป่องชนิด *Pandinus imperatus* ของแอฟริกา แมงป่องชนิดนี้มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก มีสีดำสนิท วัดจากปลายหัวถึงปลายหางได้ราว 1 ฟุต จึงมีชื่อเรียกทั่วไปว่า Emperor scorpion มีพิษไม่รุนแรงนัก จากรายงานการวิจัยพบว่า Scorpine มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (anti-malarial) (Conde และคณะ, 2000) และกำลังอยู่ในขั้นของการทดลองเตรียม transgenic mosquito ที่มีจีนของ scorpine หากยุงดังกล่าวมีการผสมพันธุ์และแพร่พันธุ์ออกไป ก็อาจจะได้ลูกหลานยุงที่เชื้อมาลาเรียเข้าไปพักอาศัยไม่ได้ (Possani และคณะ, 2002)

ส่วนการศึกษาน้ำพิษแมงป่องในประเทศไทยนั้นยังไม่มีมากนัก แม้ว่าในประเทศไทยพบแมงป่องไม่น้อยกว่า 18 ชนิด แมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*) ก็เป็นชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดี (รูปที่ 2.1) แมงป่องช้างเป็นสัตว์พื้นเมืองที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย, ลาว, กัมพูชา และเวียดนาม ดังนั้น จึงหาได้ไม่ยากนักในท้องถิ่น และสามารถรีดพิษได้เพียงพอสำหรับการทำงาน แมงป่องชนิดนี้มีขนาด 10-15 เซนติเมตร มีสีดำสนิท มีชื่อเรียกทั่วไปว่า Giant scorpion หรือ Asian Forest Scorpion หรือ Black Scorpion หรือ “แมงป่องช้าง” ในภาษาไทย หรือ “แมงเงา” ในภาษาถิ่น มีน้ำพิษอยู่ในต่อมพิษที่ปล้องหาง (รูปที่ 2.2) พิษไม่มีความรุนแรง หากถูกต่อยอาจมีอาการปวดอยู่สัก 2-3 ชั่วโมง ถึง 1 สัปดาห์ ขึ้นกับสภาพของร่างกาย แมงป่องชนิดนี้เป็น genus เดียวกันกับที่มีการเลี้ยงเพื่อตั้งดูตนักท่องเที่ยวในสวนสัตว์บางแห่ง (ศักดิ์ดา ดาดวง และนันทวัน เอื้อวงศ์กุล, 2547) งานวิจัยเรื่องแมงป่องช้างนี้ได้เริ่มมาตั้งแต่ปลายปี 2545 ตรวจสอบแล้ว พบว่า มีฤทธิ์เป็น potassium ion channel blocker และมีฤทธิ์ defensin ในงานวิจัยดังกล่าว เริ่มจากแมงป่องช้างที่รับซื้อมาจากชาวบ้านในละแวกใกล้เคียงกับมหาวิทยาลัย ขอนแก่น จะถูกนำมาเลี้ยงไว้ในตู้กระจกในห้องเลี้ยงสัตว์

ของภาควิชา ซึ่งปรับอุณหภูมิไว้ที่ราว 28°C ให้จิ้งหรีดและตั๊กแตนเป็นอาหาร ทำการรีดน้ำพิษโดยการช็อกด้วยกระแสไฟฟ้าต่ำ ๆ จากนั้น นำน้ำพิษมาทำบริสุทธิ์ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชา โดยใช้ gel filtration (รูปที่ 2.3A) และ cationic column chromatography (รูปที่ 2.3B) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย Tris-Tricine SDS-PAGE (รูปที่ 2.3C) ได้แถบเปปไทด์บริสุทธิ์ขึ้นหนึ่งขนาดราว 7 กิโลดาลตัน ให้ชื่อว่า Heteroscorpine-1 (HS-1) ยีนของ HS-1 ประกอบขึ้นจาก 1440 นิวคลีโอไทด์ มี intron คั่นกลางยาวกว่า 1 กิโลเบส เมื่อแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 95 ตัว ที่ปลาย N มี leading sequence ยาว 19 กรดอะมิโน โพลีเปปไทด์ที่ได้คล้ายคลึงกับ Scorpine ถึง 80% เปปไทด์นี้มีฤทธิ์ทำให้แมลงเป็นอัมพาต จากนั้น เมื่อนำไปหาฤทธิ์ต้านต่อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ หลังจากทำการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion พบว่า HS-1 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* และเมื่อทำการตรวจ morphology ของเชื้อเหล่านี้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดสแกนนิ่ง (scanning electron microscope, รูปที่ 2.4) พบว่า ผิวนอกโดยรอบของเซลล์แบคทีเรียไม่เรียบ เกิดขรุขระ แต่ไม่พบว่ามีออร์แกเนลล์ (organelle) ต่าง ๆ ภายในเซลล์ทะลักออกมา จึงคาดว่า toxin คงเข้าทำลายที่ cell wall หรือ cell membrane ทำให้เสียรูปไป แต่ไม่ทำให้เกิดรู จากนั้น จึงนำเปปไทด์ไปหาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry ชนิด tandem mass spectrometry (MS/MS) ที่ประเทศญี่ปุ่น ได้ลำดับกรดอะมิโนเบื้องต้นมา 21 ตัว (รูปที่ 2.5) เมื่อนำมาทำ alignment กับโปรตีนที่มีใน Gene Bank ด้วยโปรแกรม FASTA พบว่า มี homology สูงกับ Scorpine ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ดังได้กล่าวข้างต้น และยังมี homology สูงกับ Opiscorpine จากแมงป่องแอฟริกาชนิด *Opisthophthalmus carinatus* ซึ่งมีฤทธิ์ anti-fungal ต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคในพืช (Zhu และ Tytgat, 2004) และได้ให้ชื่อเปปไทด์ที่ได้จาก *H. laoticus* ว่า Heteroscorpine-1 (HS-1) ต่อมาได้หาลำดับกรดอะมิโนจนครบทั้งเส้น 95 ตัว (นับรวมเอา leading sequence ยาว 19 ตัวไว้ด้วย) โดยใช้วิธี PCR ในห้องปฏิบัติการที่ประเทศญี่ปุ่นนั่นเอง (รูปที่ 2.6) เมื่อนำไปเทียบลำดับกรดอะมิโนกับ Panscorpine และ Opiscorpine พบว่ามีความเหมือนสูงถึงราว 80% (รูปที่ 2.7) มีความใกล้เคียงกันทางด้านวิวัฒนาการ เมื่อวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree และมีลำดับเหมือนกับ potassium channel blocker อื่น ถึง 40% จึงสามารถกล่าวได้อย่างแน่ชัดว่า HS-1 มีฤทธิ์เป็น potassium ion channel blocker ซึ่งมี defensin activity (Uawonggul และคณะ, 2007)

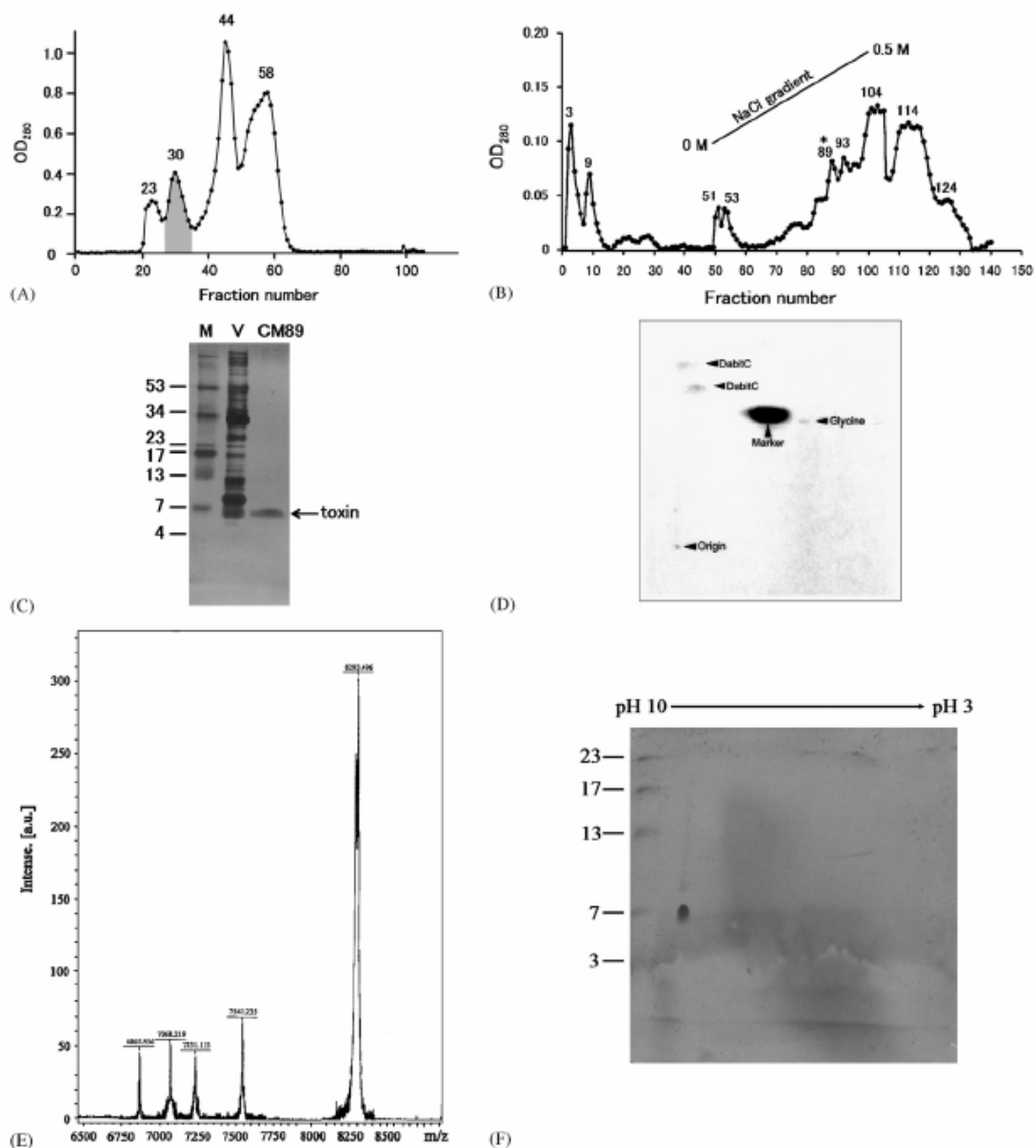


รูปที่ 2.1 แม่แมงป่องช้างพร้อมลูกน้อยอายุ 1 วันบนหลัง (ศักดิ์ดา ดาดวง และนันทวัน เอื้อวงศ์กุล, 2547)

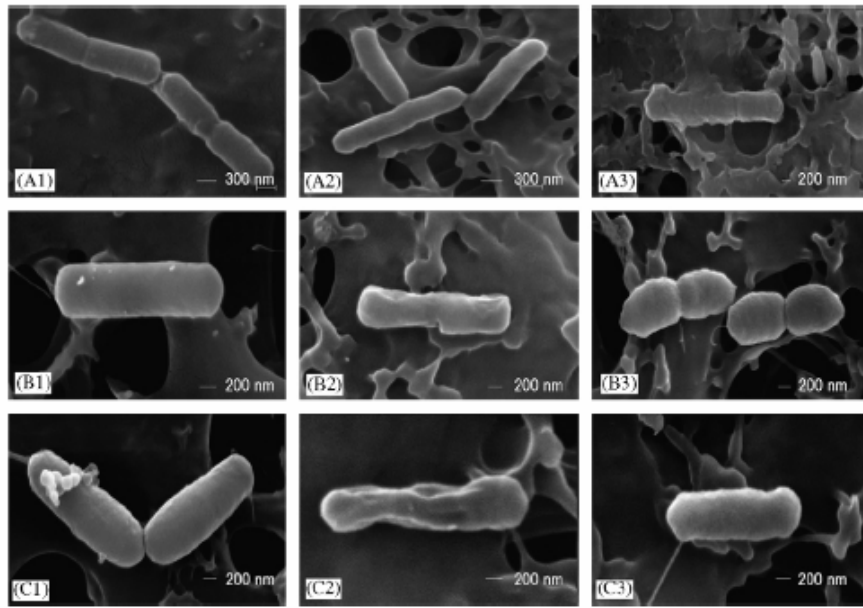


ปล้องพิษ

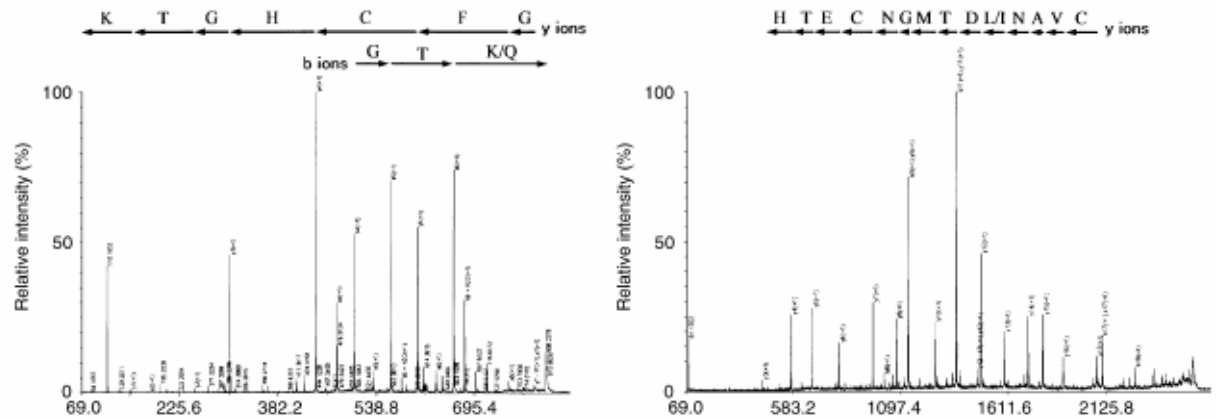
รูปที่ 2.2 แสดงปล้องพิษที่ปลายหางของแมงป่องช้าง (ศักดิ์ดา ดาดวง และนันทวัน เอื้อวงศ์กุล, 2547)



รูปที่ 2.3 การทำบริสุทธิ์ Heteroscopine-1 (HS-1) จากน้ำพิษแมงป่องช้าง (A) ผ่าน gel filtration column, (B) นำมาผ่าน cationic column chromatography, (C) ผลการวิเคราะห์ด้วย Tris-Tricine SDS-PAGE พบแถบโปรตีนแถบเดียว (lane CM89), (D) ผล manual Edman degradation พบ spot เดียว คือ glycine (E) น้ำหนักโมเลกุลของ HS-1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF Mass spectroscopy (F) ผลการวิเคราะห์ด้วย two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) พบ spot เดียว จึงคาดว่า โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง



รูปที่ 2.4 แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (A), *Klebsiella pneumoniae* (B) และ *Pseudomonas aeruginosa* (C) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในสภาพปกติ (1), เมื่อผ่านการบ่มด้วยน้ำพืชมะม่วงป้องกัน (2) หรือ HS-1 (3)

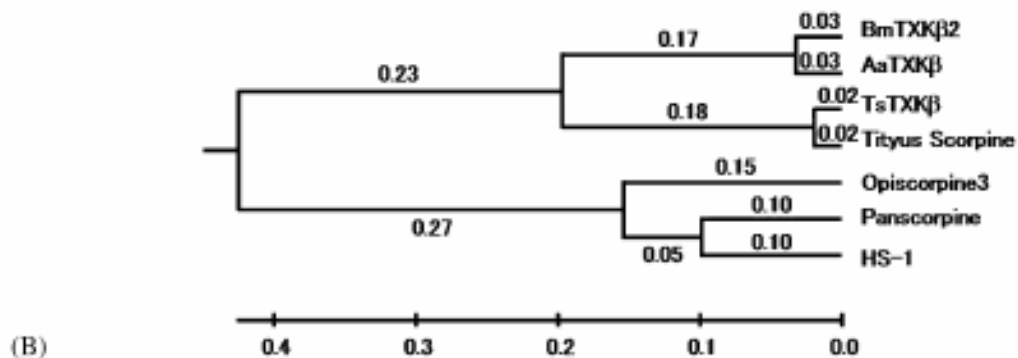


รูปที่ 2.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ HS-1 ด้วย liquid chromatography tandem mass spectrometry (LS-MS/MS) ได้เปปไทด์ที่ทราบลำดับกรดอะมิโน 2 เส้น คือ GFCHGTK และ CVAN(L/I)DTMGNCETH

atatagaactaaatacaacacccctccgaatccgtaaatgcatatTTTTTcagGTTGATTGATTCTCTGCTCCAAAACAAG 85
 HSF3
 ATGAACAGTAAGCTTACTGCTCTTATCTTCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGGGATGAGTAAGtaagtaaaatTTTTTgttattgatcgagcctttccgagagtttccgcatt 205
 HSF4 HSF7
 M N S K L T A L I F L G L V A I A S C G W I N 23
 gaaaagtgctcgagtttaagaacattcaaccaccaagtttaggtacttgacgaactgcctcatatactgaacgaagccagatatttagacactatttggtgagttcgtatggcgaactg 325
 catcggttagcatgaacgaataaggtaatgtttataccagtcgatataatttacgtatcgaatctgagggcttaataataagccagtcgatttccgtagcagtcagcgataccgcctaag 445
 HSF12
 agtcacacggattctgtgattaataatagagcacctaaacaaattatccctcattgaaatgaatttattaattgtcacatccctagcagtagcttattatcttcatctaaaaagtt 565
 tcatgaacacggatttatttattgttacgaataataataatacttcgcatgacgttgcgaatcacaacgttaagtaggtattggtatataTTTTTctgaacattgattacagc 685
 cagtgaaaagttccgaatttaataataattgaaacttcttactttttatatacagcagattatgtatagtagaattcgccttcgtgccagagacggaatttaataagactgctctcc 805
 gctottaaggaattaatgtagcaatcagtcgccattttaccgacgccaactctatagatactattctggaacgttttggcttttttgaattaaactctgtgcacttttaattttgcac 925
 aatttcagaatcttacaataaagaagaatgggaatggaccgccggagggcataaaacagaataattcttaaggaatatacagccatgcccgctggcgatatttgataaacgggttacaaa 1045
 aaaaaaaaagacgtacttatcgattattacttttaataaacaacttccaatttcacgttgcctccgctcctccgggaacttcttctttacgagctttttacgcctcggttcccttgc 1165
 HSR12 HSF11
 tattataggtctattttatagtcgaacaacaccggagttactaatgttttctcttttcag ATGAAGAGAAGATACAAAAGAAAATTGACGAAAAATAGGAAATATATCCTCGGAGGGA 1285
 E E K I Q K K I D E K I G N N I L G G M 43
 TGCGTAAGGCCGTGCTCCACAACTGGCGAAGGGCGAATTCCAATGCGTGGCAAAATATTGATACGATGGGAAATTGCGAGACTCACTGCCAAAAACCTCAGGTGAAAAGGGATCTGCC 1405
 HSF2 HSR3
 A K A V V H K L A K G E F Q C V A N I D T M G N C E T H C Q K T S G E K G F C H 83
 ACGGAACCAATGCAAGTGTTGAAAACCATATCTACTAA 1446
 HSR2 HSR6
 G T K C K C G K P L S Y end 95

รูปที่ 2.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ HS-1 โดยที่ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่สีดำ คือ exon, ส่วน intron แสดงไว้ด้วยตัวอักษรพิมพ์เล็กสีน้ำเงิน, untranslated region แสดงไว้ด้วยตัวอักษรสีเขียว, ตำแหน่งการจับของ primer แสดงไว้ด้วยลูกศรเส้นประสีม่วง, ลำดับกรดอะมิโนที่ deduce มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ด้วยตัวอักษรพิมพ์ใหญ่สีแดง ชนิดของกรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้เส้นเดียวเป็นชนิดที่ได้มาจากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF Mass spectroscopy ส่วนชนิดของกรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้สองเส้นเป็นลำดับของ leading sequence ลำดับที่เป็น Cys pattern ของ invertebrate defensin (Froy และ Gurevitz, 2003) คือลำดับ CX₄₋₁₆CX₂HCX₆₋₉GX₁CX₄₋₉CX₁C จะป้ายไว้ด้วยแถบสีเหลือง

HS-1	MNSKLTALIFLGLVAIASCGWINEEKIQKKIDEKIGNNILGGMAKAVVHKLAKGEFQCYA 60	
Panscorpine	MNSKLTALIFLGLIAIAYCGWINEEKIQKKIDERMGNTVLGGMAKAIVHKMAKNEFQCYA 60	
Opiscorpine3	MNNKLTALIFLGLIAIASCKWLNEKSIQNKIDEKIGKFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCYA 60	
Tityus Scorpine	MERKLALLFLGNVTLASCG-LREKHVQKLVA-LIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPA 58	
TsTXKβ	—RKLALLFLGNVTLASCG-LREKHVQKLVA-LIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPA 56	
BmTXKβ2	MQRNLVVLFLGNVALSSCG-LREKHFQKLVKYAVPEGLRTIIQTAVHKLKGTQFGCPA 59	
AaTXKβ	MQRNLVVLFLGNVALSSCG-LREKHVQKLVKYAVPVGLRTILQTVVHKVKGKTQFGCPA 59	
	* ** ***** *	
	* *	
HS-1	NIDTMGNCETHCQKTSGEKGFGCHGKCKCGKPLSY 95	100%
Panscorpine	NMDMLGNCEKHCQ-TSGEKGYCHGKCKCGTPLSY 94	82%
Opiscorpine3	NVDMTKSCDTHCQKASGEKGYCHGKCKCGVPLSY 95	78%
Tityus Scorpine	—YEGYCNNHCQDIERKDGECHGFKCKCAKD— 87	49%
TsTXKβ	—YEGYCNDHCNDIERKDGECHGFKCKCAKD— 79	47%
BmTXKβ2	—YQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIFMGF 82	42%
AaTXKβ	—YQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF 82	43%
(A)	** ** *	
	* ** *	



รูปที่ 2.7 (A) แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม Scorpine และ potassium channel blocker หลายชนิดกับ HS-1 และ (B) แสดง phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างปฐมภูมิ Opiscorpine3 เป็น Scorpione มาจาก *Opisthophthalmus carinatus* (Zhu และ Tytgat, 2004). Panscorpine มาจาก *Pandinus imperator* (Conde และคณะ, 2000). Tityus Scorpine มาจาก *Tityus costatus* Karsch (Diego-Garcia และคณะ, 2005). TsTXKβ มาจาก *Tityus serrulatus* (Legros และคณะ, 1998), BmTXKβ2 มาจาก *Buthus matensii* (Zhu และคณะ, 1999) and AaTXKβ มาจาก *Androctonus australis* (Legros และคณะ, 1998) ลำดับที่เหมือนกันจะแสดงไว้ด้วยเครื่องหมายสองดอกจัน (*) ลำดับที่คล้ายกันจะแสดงไว้ด้วยเครื่องหมายหนึ่งดอกจัน (*) ส่วน leading sequences คือบริเวณที่ขีดเส้นใต้

2.2 น้ำพิษมดคันไฟไทย (*Solenopsis geminata*)

มด (ants) เป็นแมลงใน Phylum Arthropoda, Order Hymenoptera เช่นเดียวกับ ต่อ (hornet), แตน (wasp) และผึ้ง (bees) จัดเป็นแมลงที่มีพิษ พบทั่วไปในบ้านเรือนหรือชุมชนและบางชนิดเกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตประจำวัน โดยสัตว์ในกลุ่มนี้จะมีเหล็กใน (stinger) สำหรับต่อยเหยื่อและฉีดพิษออกมาเข้าเนื้อ ถึงแม้ว่าพิษของแมลงในกลุ่มนี้จะไม่รุนแรงถึงขนาดที่ทำให้ผู้ถูกต่อยถึงกับเสียชีวิต แต่ก็สร้างความเจ็บปวดทุกข์ทรมานให้กับผู้ถูกต่อย ส่วนการรักษาเป็นการรักษาตามอาการ ยังไม่มีการรักษาที่จำเพาะต่อพิษ พิษของสัตว์เหล่านี้ประกอบขึ้นจาก toxin, enzyme และโปรตีนต่างๆ

มดคันไฟ (*Solenopsis sp.*) เป็นมดแดงขนาด 3-5 มิลลิเมตร และมีพิษ จัดอยู่ใน Order Hymenoptera, Suborder Apocrita และ Family Formicidae พบในหลายส่วนโดยเฉพาะดินแดนแถบร้อนของโลก น้ำพิษจะถูกปล่อยออกมาจากเหล็กในซึ่งอยู่ที่ส่วนก้น (gaster) ปริมาณครั้งละราว 0.01 ไมโครลิตร พิษมีความรุนแรงมาก คนที่ถูกมดชนิดนี้กัดจะรู้สึกแสบร้อนและคันเหมือนถูกไฟไหม้ พบว่าน้ำพิษของมดคันไฟชนิด *Solenopsis invicta* ในประเทศสหรัฐอเมริกา มี piperidine derivatives ได้แก่ trans-2-methyl-6-n-undecylpiperidine, trans-2-methyl-6-n-tridecylpiperidine, trans-2-methyl-6-n-pentadecylpiperidine และ trans-2-methyl-6-(cis-6-pentadecenyl)piperidine เป็นองค์ประกอบหลัก (Jouvenaz และคณะ, 1972) piperidine ในน้ำพิษของ *S. invicta* มีฤทธิ์ต้าน

ต่อแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Streptococcus salivarius*, *S. pyogenes*, *S. equisimilis*, *S. faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus pulvifacienis*, *B. thuringiensis*, *Shigella flexneri* และ *Salmonella typhimurium* (Jouvenaz และคณะ, 1972) น้ำพิษยังประกอบไปด้วย โปรตีนหลายชนิดที่ทำให้เกิดอาการแพ้ (allergen) ในผู้ที่ถูกมดคันไฟกัด (Hoffmann และคณะ, 1988) ได้แก่ Sol i I, Sol i II, Sol i III และ Sol i IV โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Sol i I นั้น ประกอบขึ้นจาก 346 กรดอะมิโน มีฤทธิ์เป็นเอนไซม์ phospholipase อีกด้วย เอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งการทำลาย cell membrane ทำให้พิษกระจายตัวไปอย่างรวดเร็ว เซลล์จะถูกทำลายและอาการแพ้รุนแรงขึ้น

2.3 น้ำพิษของต่อและแตน

องค์ประกอบของน้ำพิษก็มักจะ ได้แก่ peptides, acylpolyamines, และ alkaloids มีรายงานถึงเปปไทด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในน้ำพิษของแตนว่า ประกอบด้วย β -pompilidotoxin และ α -pompilidotoxin ทั้งคู่เป็น neurotoxic protein จับกับ sodium-potassium channel แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระบบการเปิด-ปิด channel โดย α -pompilidotoxin เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้ (Konno และคณะ, 1998, 2000) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งและกระตุ้น ion channel, receptor และ transporter ชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของเส้นประสาทในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และเซลล์แมลง (de O Belebony และคณะ, 2004) นอกจากนี้ ยังพบว่า toxin ในพิษของแตน *Vespa magnifica* มีฤทธิ์ต้านต่อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และเชื้อรา *C. albicans* อีกด้วย (Xu และคณะ, 2006a)

เมื่อกล่าวแล้ว พิษของต่อประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก ดังต่อไปนี้

1. biogenic amines เป็นสารที่สร้างขึ้นในร่างกายสิ่งมีชีวิตที่มีหมู่ฟังก์ชันคือหมูเอมีน มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เช่น acetylcholine, histamine, serotonin, noradrenaline, dopamine เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารสัญญาณประสาท

2. kinins หรือ vespakinins ปัจจุบันพบจำนวน 17 ชนิด เป็นสารที่ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจ็บปวด ยกตัวอย่างเช่น vespakinin 1 ซึ่งแยกได้จากต่อสายพันธุ์ *Paravespula maculifrons* (Ho และคณะ, 1999)

3. phospholipase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายฟอสโฟลิปิดไปเป็นกรดไขมัน มีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ Phospholipase A₁, Phospholipase A₂, Phospholipase B, Phospholipase C และ Phospholipase D ซึ่งแต่ละชนิดจะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะแตกต่างกันไป (Abe และคณะ, 2000)

4. protease หรือ proteolytic enzyme เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนได้แก่ serine protease ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสลายโปรตีนที่มี serine จับกับ active site ของเอนไซม์ (Haim และคณะ, 1999; Han และคณะ, 2008)

5. mastoparan เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 19 kDa เป็นโมเลกุลทางชีวภาพที่นำไปใช้ในทางเภสัชกรรม มีสารตั้งต้นคือ mastoparanogen เป็นเปปไทด์ที่ทำให้เกิดการหลั่ง

histamine ชักนำให้เกิดการสูญเสียสมบัติเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น mastoparan B มีขนาดประมาณ 16 kDa ซึ่งแยกได้จาก *Vespa basalis* (Higashijima และคณะ, 1988; Xu และคณะ, 2006b)

6. hyaluronidase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย hyaluronid acid ซึ่งเป็นกรดที่พบในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เป็นต้น ซึ่งจะทำให้สมบัติเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียไป (de Oliverira และ Palma., 1998)

7. antigen 5 เป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ทางชีวภาพที่แน่ชัด ทราบเพียงว่าเป็น allergen protein (Pantera และคณะ, 2003)

8. neurotoxin เป็นเพปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต่อ ion channel ของเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น α -pompilidotoxin (α -PMTX) ที่แยกได้จากต่อสายพันธุ์ *Anoplius samariensis* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15 kDa (Konno และคณะ, 2000), AvTx8 ที่แยกได้จากต่อสายพันธุ์ *Agelaia vicina* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15 kDa (de Oliverira และคณะ, 2005)

การศึกษาโปรตีนในน้ำพิษของต่อ จะกล่าวเป็นโปรตีนที่แต่ละชนิด ดังนี้

Haim และคณะ (1999) ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ protease ในพิษต่อสายพันธุ์ *Vespa orientalis* พบว่า เอนไซม์มีขนาด 42 และ 44 kDa เมื่อทำการแยกด้วย SDS-PAGE โปรตีนทั้งสองแถบดังกล่าวมีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของ bovine factor IX (BFIK), factor X (BFX) และ prothrombin

Ho และคณะ (1999) ทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีนในน้ำพิษของต่อ *Vespa verutina* ที่พบในประเทศไทยได้หวั่น ซึ่งมีค่า LD₅₀ ในหนูทดลองเท่ากับ 0.02 μ g/g ด้วย gel filtration และ cation-exchange chromatography ได้โปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ verutoxin 1, 2a และ 2b มีขนาดประมาณ 34, 33 และ 33 kDa ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบฤทธิ์แล้วพบว่าเป็น Phospholipase โดยมีสมบัติที่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกและมีความเป็นพิษสูงมาก มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 3.61, 0.87 และ 0.87 μ g/g ตามลำดับ

Higashijima และคณะ (1988) ทำการศึกษา mastoparan ในน้ำพิษต่อซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคือ Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH₂ ต่อการทำงานของ GTPase พบว่าโครงสร้างของ mastoparan ภายในเยื่อหุ้มเซลล์คล้ายคลึงกับ cationic intracellular loop ของ G protein coupled receptor

de Oliveira และ Palma (1998) ทำการศึกษาแยกบริสุทธิ์ polybitoxin ซึ่งมีสมบัติเป็นเอนไซม์ phospholipase จากต่อ *Polybia paulista* ในประเทศบราซิล โดยทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีนด้วย gel filtration G-200 และ DEAE-Cellulose ion exchange chromatography ได้โปรตีนที่มีขนาด 115-132 kDa แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ polybitoxin I, II, III และ IV เป็น glycoprotein ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 22-43% มี catalytic activity อยู่ในช่วง 18-771 μ moles/mg/min

Pantera และคณะ (2003) ได้ทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในต่อ *Pollistes gallicus* ในทวีปยุโรปพบว่า มีองค์ประกอบดังนี้ คือ phospholipase, antigen 5,

hyaluronidase และ protease แล้วทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้ของโปรตีน antigen 5 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Pollistes annularis* ที่พบในทวีปอเมริกาถึง 85 %

Xu และคณะ (2006) ได้ทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษที่ได้จากต่อสายพันธุ์ *Vespa magnifica* พบว่ามีสมบัติเป็น Antimicrobial peptide สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Candida albicans* และมีคุณสมบัติที่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างระดับปฐมภูมิพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ mastoparan ที่พบในน้ำพิษของต่อชนิดอื่น ๆ อีกทั้งยังคล้ายคลึงกับ Antimicrobial peptide ที่แยกได้จากผิวหนังของกบสายพันธุ์ *Rana boylii* ด้วย

2.4 การใช้ประโยชน์โปรตีนจากน้ำพิษ

2.4.1 Heteroscorpine และการใช้ประโยชน์

Heteroscorpine เป็นเปปไทด์ลูกผสม ลำดับกรดอะมิโนทางด้าน N-terminus ของ Heteroscorpine มีความคล้ายกับ เปปไทด์ cecropin และทางด้าน C-terminus มีความคล้ายกับเปปไทด์ defensin ซึ่งเปปไทด์ทั้งสองตัวดังกล่าวอยู่ในระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติของแมลงเพื่อต่อต้านจุลินทรีย์แปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย ด้วยความเป็นลูกผสมของ Heteroscorpine ทำให้คาดว่าหากศึกษาคุณสมบัติของส่วน N-terminus และ C-terminus ของ Heteroscorpine โดยใช้วิธีการตัดต่อยีนและโคลนทั้งสองส่วนแยกกันลงในเวกเตอร์ เพื่อให้ทำการแสดงออกและเพิ่มปริมาณในระบบของแบคทีเรีย จากนั้นจึงทำบริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณสมบัติเชิงโครงสร้าง คือ ลักษณะของโครงสร้างทั้งสามระดับ (ทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ) ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์และการเข้าทำลายเมมเบรนโดยใช้แบบจำลองจากเมมเบรนสังเคราะห์ ด้วยคาดหวังว่าการเข้าใจโครงสร้างและการทำงานของ Heteroscorpine ในระดับองค์ประกอบย่อยของโครงสร้าง จะช่วยให้เข้าใจระบบการป้องกันตัวเองของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติได้ดียิ่งขึ้น และการทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของทางด้าน N-terminus และ C-terminus ของ Heteroscorpine อาจนำไปสู่การสร้างเปปไทด์สังเคราะห์ตัวใหม่ที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดดั้งเดิมของ Heteroscorpine และนำไปใช้ประโยชน์เฉพาะด้านยิ่งขึ้น อาทิ การใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์หรืออาจประยุกต์ใช้เป็นสารชีวภาพที่ใช้ในการฆ่าแมลงได้

2.4.2 Heterotomxin และการใช้ประโยชน์

เนื่องจาก Heterotomxin (HmTx) มีโครงสร้างคล้าย Imperatoxin (IpTx) ดังนั้น ในครั้งนี้จะขอกล่าวถึงประโยชน์ของ IpTx

Imperatoxin I (IpTx) เป็นโปรตีนในน้ำพิษของแมงป่องช้างจักรพรรดิ *Pandinus imperator* ในแอฟริกา ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็น 2 แบบ คือ

- Imperatoxin A (activator): เป็น IpTx ชนิดกระตุ้นการผ่านเข้าออกของ Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum ไปยังเซลล์

- Imperatoxin I (inhibitor): เป็น IpTx ชนิดยับยั้งการผ่านเข้าออกของ Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum ไปยังเซลล์ ทำงานตรงกันข้ามกับแบบแรก

Imperatoxin A (IpTx_A) ประกอบขึ้นจากการดอะมิโน 33 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลราว 3.7 kDa มีโครงสร้างคล้าย dihydropyridine receptor (DHPR) ซึ่งเป็น receptor ของ dihydropyridine มี 3 cysteine residues ซึ่งจะสร้าง disulfide bridges เพื่อรักษาโครงสร้างสามมิติให้คงสภาพไว้ได้ IpTx_A ออกฤทธิ์ต่อ Ryanodine receptors (RyR), ซึ่งเป็นช่องทางผ่านของ Ca^{2+} และเป็นที่ยอมรับกันดีว่ามีบทบาทสำคัญในการควบคุมการปลดปล่อย Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum ของกล้ามเนื้อลาย (Franzini/Armstrong และ Protasi, 1997) IpTx_A ออกฤทธิ์ต่อ RyR type 1 ได้ดีกว่า type 3 และดูเหมือนว่า RyR 2 ไม่ตอบสนองต่อ IpTx_A เลย (Simeoni และคณะ, 2001) ส่วนที่คล้าย II-III loop ของ DHPR จะจับโดยตรงกับ RyR เพื่อเร่งการจับของ ryanodine ในการกระตุ้นการปลดปล่อย Ca^{2+}

Imperatoxin I (IpTx_I) ประกอบขึ้นจาก 2 หน่วยย่อย คือ Large subunit ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโน 104 ตัว และ Small subunit ประกอบด้วยกรดอะมิโน 27 ตัว ขนาดของ IpTx_I ราว 15 kDa ทั้งสอง subunit เชื่อมต่อกันด้วย disulfide bond พบว่า Large subunit มีฤทธิ์ phospholipase A2 (PLA2) อีกด้วย IpTx_I ออกฤทธิ์ต่อ Ryanodine receptors (RyR) (Franzini/Armstrong และ Protasi, 1997) เมื่อมี action potential มาถึงกล้ามเนื้อ RyR channels จะเปิดออกเพื่อปลดปล่อยให้ Ca^{2+} ออกมาเหนี่ยวนำให้มีการหดตัวของกล้ามเนื้อ พบว่า Ca^{2+} ช่วยเหนี่ยวนำให้ Large subunit ของ IpTx_I ไปไฮโดรเลซ Sn2 fatty acyl bond จาก membrane ของ sarcoplasmic reticulum วิธีการนี้ต้องการฤทธิ์ PLA2 ของ Large subunit จากนั้น free fatty acids จะจับกับ RyR ผลของการจับจะเหนี่ยวนำให้ Ryanodine receptors (RyR) ปิดตัวเองลดการผ่านเข้าออกของ Ca^{2+} ต่อเมื่อความเข้มข้นของ free fatty acids ลดลง RyR ก็จะเผยออก เริ่มให้มีการผ่านเข้าออกของ Ca^{2+} (Zamudio และคณะ, 1997)

การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ของ Imperatoxin

การทำงานของ IpTx_I ต่อ RyR channels ของ the heart muscles ช่วยให้มีการนำมามีการประยุกต์ใช้เป็นยาต้านการเกิดภาวะหัวใจเต้นผิดปกติ (arrhythmia) ขณะนี้ยังอยู่ในขั้นการทดลอง *in vivo* (Santonastasi และ Wherens, 2007) และ Ryanodine receptors ทำหน้าที่เป็น pharmacological targets ในโรคหัวใจ พบว่า toxins หลายชนิดที่แยกได้จากน้ำพิษของแมงป่องสามารถเปลี่ยน RyR ได้ ซึ่งทำให้คาดเดาได้ว่าน้ำพิษของสัตว์หลายชนิดอาจจะเป็นแหล่งของ selective modulators ของ intracellular Ca^{2+} release channels (Gurrola และคณะ, 2005) พบว่า IpTx_A และ IpTx_I จำเพาะต่อ RyR สูงมาก และไม่แสดงฤทธิ์ต่อ ion channels หรือ transporters อื่นเลย (Valdivia และคณะ, 1992) ซึ่ง IpTx_A ก่อนข้างจะจำเพาะกับ RyR₁ และ RyR₃ แต่มีฤทธิ์ต่ำมากกับ RyR₂ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปถึงว่า IpTx สามารถเพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจในขณะมีหัวใจวายได้หรือไม่

2.4.3 Hyaluronidase และการใช้ประโยชน์

Hyaluronidase เป็นกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งเร่งการทำลาย hyaluronic acid (HA) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะกลไกการออกฤทธิ์ คือ (1) testicular-type hyaluronidase (hyaluronoglucosaminidase; hyaluronate 4-glycanohydrolase, EC 3.2.1.35), (2) leech hyaluronidase (hyaluronate glycanohydrolase, EC 3.2.1.36) และ (3) bacterial hyaluronidase (hyaluronate lyase, EC 4.2.99.1) แหล่งที่พบเอนไซม์นี้ได้แก่ น้ำตา น้ำอสุจิ รก มดลูก ตับ ไต ผิวหนัง ไต อวัยวะของมนุษย์ และยังพบในน้ำลายของปลิงด้วย เอนไซม์ชนิดนี้ยังผลิตได้จากเซลล์แบคทีเรีย และเซลล์มะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก ปอด และมดลูก นอกจากนี้ยังพบในน้ำพิษของสัตว์หลายชนิดเพราะมีสมบัติช่วยในการกระจายตัวของน้ำพิษไปยังเซลล์และเนื้อเยื่อข้างเคียง หรือเรียกว่าเป็น spreading factor (Kudo และ Tu , 2001) ใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

1. ใช้ร่วมกับยารักษาโรคมะเร็ง เอนไซม์ชนิดนี้มีการใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งมานานแล้ว โดยเฉพาะประเทศในยุโรป มะเร็งหลายชนิดที่ต่อต่อยา แต่กลับมารักษาได้ด้วยยาเดิมเพียงแค่เติมไฮยาลูโรนเดส เหตุผลน่าจะมาจากเอนไซม์ช่วยทำลาย hyaluronic acid ที่อยู่บนเยื่อเซลล์มะเร็ง ช่วยให้ยาผ่านเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ง่ายขึ้น แต่ก็มีรายงานบางชิ้นกล่าวว่า ตัวเอนไซม์เองก็มีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วย (Stern, 2008)

2. ใช้กำจัดการก่อกวนของ hyaluronic acid ส่วนเกิน ซึ่งทำให้ผิวหนังหนาตัวหรือมีแผลเป็น

3. การใช้เพื่อรักษา scleroderma (Popkin, 1952).

4. การใช้ในงานผ่าตัดตา (Eberhart และคณะ, 2004)

5. การใช้ในการให้ยาชาเฉพาะที่ พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์นี้กับการให้ lignocaine ทางใต้ผิวหนัง บริเวณที่เกิดอาการชา มีพื้นที่กว้างเป็นสองเท่าของชุดที่ให้แต่ยาชาแต่ไม่ให้เอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้เอนไซม์นี้ในการผ่าตัดเล็ก และได้ผลดีในการยับยั้งความรู้สึกของปลายประสาท (Lewis-Smith, 1986)

6. การใช้ hyaluronidase เพื่อลดผลกระทบจากการสะสมของสารพวก *Vinca alkaloids* การใช้ *Vinca alkaloids* เช่น vinblastine, vincristine, vindesine and vinorelbine เพื่อรักษามะเร็ง อาจเกิดการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีด พบว่าการใช้ hyaluronidase ช่วยเพิ่มการกระจายตัวของตัวยาและลดการเน่าตายของเซลล์และเนื้อเยื่อดังกล่าว

7. hyaluronidase ลดอาการบวมของหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศชาย (paraphimosis)

(<http://www.cirp.org/library/treatment/phimosis/devries/>)

2.4.4 Phospholipase และการใช้ประโยชน์

Phospholipase เป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เร่งการสลายฟอสโฟไลปิด ให้ได้กรดไขมันและองค์ประกอบต่าง ๆ เอนไซม์นี้แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย แล้วแต่ตำแหน่งของการตัดบนฟอสโฟไลปิด และมีการประยุกต์เอนไซม์นี้มากมายในทางด้านอุตสาหกรรม เอนไซม์นี้นิยมใช้ในการเตรียมโมเลกุลที่มีสมบัติเป็น emulsifier เช่น lysolecithin, monoglycerides เป็นต้น โดยช่วยเร่งไฮโดรไลซิสของ phospholipids ที่มีในตัวอย่าง ซึ่งนิยมใช้กันในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการใช้ไขแดง การทำขนม

ปัจจุบัน การเตรียมมายองเนส และซอสปรุงรส นอกจากนี้อาจใช้ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในอุตสาหกรรมน้ำมันพืช หลังจากที่เตรียมน้ำมันพืชได้ใหม่ ๆ และยังมีการนำ Phospholipase A₁ ไปใช้ปรับปรุงการผลิตชีส yogurt, milk และ ice cream ในอีกด้านหนึ่ง phospholipase A₂ ที่ได้จากพิษงู มีฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) จึงใช้ในการสลายลิ่มเลือดที่ก่อตัว (Kini, 2006) และยังมีรายงานของการทดลองใช้ phospholipase A₂ ต่อสู้กับก้อนเนื้อมะเร็ง เช่น จากน้ำพิษของ *Bothrops newweidii* ต่อ melanoma cells และน้ำพิษของ *Naja naja* ต่อ ascites tumour cells เป็นต้น

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

สัตว์พิษ

แมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*) และตะขาบ (*Scolopendra subspinipes dehaani*) รับซื้อจากชาวบ้านที่อยู่ละแวกใกล้เคียงมหาวิทยาลัยขอนแก่น จะถูกนำมาเลี้ยงไว้ในตู้กระจกในห้องเลี้ยงสัตว์ของภาควิชาฯ ซึ่งปรับอุณหภูมิไว้ที่ราว 28°C ให้จิ้งหรีดเป็นอาหารหลัก การจำแนก species นั้น ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อรุณรัตน์ จีวีราช แห่งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ อ. โกวิท น้อยโคตร แห่งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ต่อหัวเสือ (*Vespa affinis*) และต่อหลุม (*Vespa tropica*) นั้นซื้อจากคณะของคณพงษ์ศักดิ์ ลานนท์ แห่งหมู่บ้านเชียงเซา ตำบลบ้านเอื้อง อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม ซื้อมาในท้องถิ่นก่อนนำมาฉีดพิษ ส่วนการจำแนก species ของต่อนั้นได้รับความกรุณาจาก คุณศิริณี พูนไชยศรี แห่งกองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร มดคันไฟ (*Solenopsis geminata*) มีอยู่ทั่วไปสามารถหาได้เอง จำแนก species โดยความกรุณาของ รศ.ดร.ทัศนีย์ แจ่มจรรยา แห่งภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หรือ รศ.ดร.เดชา วิวัฒน์วิทยา แห่งพิพิธภัณฑน์มด ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การฉีดพิษ

นำพิษจากแมงป่อง และตะขาบ ทำการฉีดพิษโดยการ fix ตัวสัตว์ให้อยู่หนึ่ง แล้วช็อกด้วยไฟฟ้า 100 V duration 1-msec ที่ความถี่ 10 Hz ด้วยเครื่อง Grass stimulator model S88 ซึ่งได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร.ธารินี อัครวิเชียร แห่งภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ตะขาบจะช็อกด้วยความเย็นเสียก่อน เพื่อลดความดุร้าย) ส่วนพิษผึ้ง จะฉีดด้วย milking device ที่ประดิษฐ์ขึ้น ต่อ และแต่น จะใช้วิธีดึงเหล็กในและต่อมพิษออกมาแล้วบีบเอาน้ำพิษ ส่วนมดใช้วิธีการกระตุ้นให้ปล่อยน้ำพิษด้วยที่คืบ เก็บน้ำพิษใน microtube ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อใช้งานต่อไป

SDS-PAGE

เริ่มจากการเตรียม separating gel และ stacking gel จากนั้น เตรียมตัวอย่างผสมกับ 2x solubilizing buffer (125 mM Tris pH 6.8, 25% glycerol, 4% SDS, 0.008% BPB, 10% 2-mercaptoethanol) ในอัตราส่วน 1:1 นำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 2-5 นาที แล้ว load ตัวอย่าง และให้กระแสไฟฟ้าจนกระทั่ง dry font เคลื่อนมาจนเกือบสุดแผ่นเจล จากนั้นแกะแผ่นเจลออกแล้วย้อมใน staining solution

Tris-Tricine SDS-PAGE

Tris-Tricine SDS-PAGE ทำตามขั้นตอนของ Schagger และ Jagow (1987) อธิบายโดยย่อ ดังนี้ เตรียมตัวอย่างโดยผสมกับ 2xSDS sample buffer (125 mM Tris pH 6.8, 25% glycerol, 4% SDS, 0.008% BPB, 10% 2-mercaptoethanol) ปริมาณเท่ากัน จากนั้น นำไป load ลงบน Tris-tricine acrylamide gel ที่มี cathode buffer pH 8.5 (100 mM Tris, 100 mM Tricine, 0.1% SDS) เติมน้ำไว้ที่ reservoir ด้านบน ส่วนด้านล่างเติม anode buffer (200 mM Tris pH 8.8) จากนั้นให้ไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์คงที่ที่ 80 โวลต์ แล้วย้อม gel ด้วย Silver Stain

Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

ตัวอย่าง 20-100 µg แยกด้วย first dimension โดยใช้ immobilized pH gradient strip pH 3-10 ยาว 7 ซม. จากนั้น strip ถูก rehydrate นาน 12 ชม. แล้ว run ด้วยความต่างศักย์รวม 9,250 Vh จากนั้น นำไปแช่ใน equilibration buffer ที่มี 2% DTT และ buffer ที่มี 5% iodoacetamide แล้วนำไป run second dimension โดยใช้ SDS-PAGE จากนั้น ย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R 250 หรือ silver staining.

การทำบริสุทธิ์โปรตีน หรือ polypeptide ในน้ำพิษด้วย gel filtration chromatography

เตรียม Sephadex G50 ด้วยการแขวนลอยใน 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 ปลอຍให้พองตัวในอ่างน้ำอุณหภูมิ 50 °C หลังจากกำจัดเศษเจลที่แตกละเอียด นำเจลที่ได้ไป pack กับ column ทำการ equilibrate ด้วย 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 แล้วจึง load น้ำพิษซึ่งเจือจางใน buffer เดียวกัน จากนั้นชะด้วย 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 ด้วยความเร็ว 18 ml/hr แล้วนำ fraction ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ด้วย UV spectrophotometer นำ peak fraction ไปตรวจความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย Tris-Tricine SDS-PAGE

การทำบริสุทธิ์โปรตีน หรือ polypeptide ในน้ำพิษด้วย CM Toyopearl cationic column chromatography

เริ่มจากการ activate เรซิน ใน 0.5 M HCl เป็นเวลา 30 นาที ล้างจนกระทั่งได้ pH 7 แล้ว activate ต่อด้วย 0.5 M NaOH เป็นเวลา 30 นาที ล้างจนกระทั่งได้ pH 7 และ 0.5 M HCl เป็นเวลา 30 นาที ล้างจนกระทั่งได้ pH 7 จากนั้น pack ใน column แล้ว load ตัวอย่าง ล้าง column ด้วย 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 แล้วชะด้วย 0 to 0.5 M sodium chloride gradient ใน 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 เก็บ fraction แล้วนำ fraction ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ด้วย UV spectrophotometer นำ peak fraction ไปตรวจความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย Tris-Tricine SDS-PAGE

Anti-microorganism assay และ scanning electron microscopy

Anti-microbial activity ใช้วิธี disc diffusion method สำหรับ bacteria ใช้ Mueller-Hinton agar plate เลี้ยงที่ 37°C ส่วน fungi ใช้ potato dextrose agar plate เลี้ยงที่ 30°C วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zones สำหรับ bacteria นำ cell จาก inhibition zone มา fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde ข้ามคืน ก่อนจะ coat ด้วย gold และสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope) LEO 1450VP (LEO Electron Microscopy, UK).

Hyaluronidase activity ด้วย hyaluronic acid (HA)-gel zymography

เริ่มจากการเตรียม gel สำหรับ electrophoresis โดยที่ต้องเติม 0.4 mg/ml HA solution ลงใน separating gel ด้วย ภายหลังการ load ตัวอย่างลงบน gel ให้กระแสไฟฟ้าที่ 15mA ต่อ gel จากนั้น บ่ม gel ใน 3% Triton-X 100 ใน 50 mM Hepes, pH 7.4 นาน 1 h เพื่อกำจัด SDS จากนั้นย้ายเจลไปแช่ใน hyaluronidase assay buffer pH 3.7 (0.15 M NaCl ใน 0.1 M formate buffer) หรือ hyaluronidase assay buffer pH 7.4 (0.15 M NaCl ใน 50 mM Hepes) ล้างเจลสองครั้งด้วย assay buffer แล้วบ่มต่อพร้อมเขย่านาน 16 ชม. ที่ 37°C ล้างเจลด้วยน้ำสองครั้งแล้วย้อมด้วย 0.5% Alcian blue staining solution ใน 3% acetic acid solution นาน 1 ชม. ล้างสีออกด้วย destaining solution (7% acetic acid) เปลี่ยนทุกชั่วโมงจนกระทั่งเห็นแถบ hyaluronidase ชัดเจน (ราว 2-3 ชม.) ล้างเจลด้วยน้ำสองครั้งแล้วล้างด้วย 50% methanol / 10% acetic acid เพื่อเพิ่ม resolution ต้องย้อมซ้ำด้วย Coomassie blue solution (50 mg of Coomassie brilliant blue R, 50 ml of methanol, 10 ml of glacial acetic acid และ 40 ml of H₂O) นาน 30 นาที แล้วล้างสีออกด้วยสารละลาย destaining (50% methanol และ 10% glacial acetic acid) หากมี Hyaluronidase activity จะปรากฏ clear band บนเจลที่มี background สีน้ำเงิน

การตรวจฤทธิ์ Phospholipase

Titrimetric method นำตัวอย่างมาผสมกับ PBS buffer, pH 7.4 15 µl และ reaction solution (100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 7 mM Triton X-100, 0.265% soybean lecithin, 98.8 µM phenol red, pH 7.6) ใน cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 558 นาโนเมตร ทำการคำนวณค่า activity ของเอนไซม์ phospholipase จากค่าการดูดกลืนแสง โดย 1 Unit (U) เท่ากับการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง 0.001 หน่วย/นาที/mg โปรตีน

Zymographic detection เตรียม 13% separating gel และ 4% stacking gel แบบ native-PAGE ที่มี 5 mg/ml phosphatidylcholine ผสมใน separating gel ด้วย เตรียมใน solubilizing buffer (1 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10% v/v glycerol, 2 mM EDTA, 0.01% bromophenol blue) แล้วโหลดลงบนเจลที่เตรียมไว้ ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 25 mA อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งแถบสีเคลื่อนไปสู่ปลายเจล นำเจลที่ผ่านการแยกโปรตีนมาแช่ในสารละลาย 0.1 M Tris-HCl, pH

7.4 ที่มี 20 mM CaCl_2 และ 0.12% Rhodamine 6G ที่ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วสังเกตแถบใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น หรือย้อมด้วย 0.1% coomassie brilliant blue R250

การตรวจฤทธิ์ Anti-bacteria

ตรวจฤทธิ์กับเชื้อก่อโรคไม่ต่ำกว่า 5 ชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Klebsiella pneumoniae* เป็นต้น ด้วยวิธี disk diffusion method ของ Bauer-Kirby โดยการ swab เชื้อบน bacterial plate จากนั้น นำ filter paper ขนาด 6 mm ที่ชุบด้วยสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ หรือ antibiotics เพื่อเป็น positive control จากนั้น นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone รอบ ๆ disk ที่วางลงไปบน bacterial plate หากได้เกิน 7 mm จึงจะถือว่ามียุทธในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ

การตรวจฤทธิ์ insecticide

กระทำโดยการหาค่า Lethal dose 50 (LD_{50}) ในแมลงชนิดต่าง ๆ โดยนำแมลงทดลองมาชั่งน้ำหนัก (ต่างกันไม่เกินร้อยละ 10) แล้วฉีดพิษสัตว์ที่เจือจางใน PBS (135 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM KCl และ 8.0 mM Na_2HPO_4) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าที่ช่องท้อง (intra-abdominal) ปริมาณไม่เกิน 20 ไมโครลิตร ทั้งนี้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นับจำนวนสัตว์ทดลองที่รอดชีวิต แล้วหาค่า LD_{50}

การสกัด genomic DNA โดยใช้เทคนิค phenol chloroform

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 25 mg นำมาเติมสารละลาย lysis buffer ที่มีสารละลาย proteinase K ใน TE buffer vortex แล้วบ่มที่ 56°C 3 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูด supernatant เติมฟีนอลที่อิมพัลใน HMW buffer ปริมาตรเท่ากัน vortex ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 5 นาที นำ supernatant มาเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1 v/v) ที่อิมพัลด้วย HMW buffer ปริมาตรเท่ากัน vortex ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 5 นาที นำ supernatant มาเติม RNase A vortex บ่มที่ 37°C 1 ชั่วโมง เติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1 v/v) ที่อิมพัลด้วย HMW buffer อีกครั้งที่ปริมาตรเท่ากัน vortex แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 5 นาที นำ supernatant มาเติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1 v/v) ปริมาตรเท่ากัน vortex แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 5 นาที นำ supernatant มาเติม 3 M โซเดียมอะซิเตต ปริมาตร 0.1 เท่า แช่ในถังน้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติมเอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 2 เท่า เก็บที่ -20°C 10-20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 5 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอล้างด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ทำให้แห้งด้วย air dry 1-2 ชม. ละลาย genomic DNA กลับด้วย 0.1 TE buffer pH 8.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

Agarose gel electrophoresis

ชั่ง Agarose gel ชนิดผง 0.36 กรัม ใส่ลงใน flask ขนาด 250 mL เติมน้ำละลาย 1X TAE buffer ปริมาตร 30 mL (สำหรับ 1.2 % Agarose gel) ทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันในไมโครเวฟ เติมน้ำละลาย Agarose gel ลงบนถาดเตรียมเจล (Tray) ที่มีหวี (comb) เสียบบนถาดเจล ทิ้งไว้ให้น้ำเจล แข็งตัวดี จึงถอดหวีออกและนำถาดที่มีเจลอยู่ไปวางบนเครื่อง electrophoresis เติมน้ำละลาย 1X TAE buffer ลงจนท่วมแผ่นเจล ตูดสารละลายที่ได้จากการสกัด genomic DNA ปริมาตร 5 μ L นำมาผสมกับ loading dry 2 μ L โหลดตัวอย่างลงบนแผ่นเจล ให้กระแสไฟฟ้า 40 นาที่ ย้อมเจลด้วย Ethidium Bromide 5-10 นาที่ นำไปอ่านผลด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV (UV transilluminator)

Polymerase chain reaction (PCR)

ปฏิกิริยา PCR กระทำที่ 94 °C, 5 min สำหรับ initial denaturing temperature ตามด้วย 30 cycles ของ denaturation ที่ 94 °C 30 วินาที, annealing ที่ 45-55 °C 30 วินาที-1 นาที และ elongation ที่ 72 °C 30 วินาที ปิดท้ายด้วย elongations ที่ 72 °C 7 นาที

การสกัด mRNA ด้วยวิธีดั้งเดิม

ตัดเอาเนื้อเยื่อของต่อมพิษมาประมาณ 1-5 mg แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวหรือแช่ที่ -70 °C แล้วเติมน้ำละลาย lysis buffer ปริมาตร 300 μ L ที่มี 50 μ g/ μ L proteinase K 1 μ L ลงในตัวอย่าง จากนั้นทำการ homogenate ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 65 °C 15 นาที และทำการ vortex ทุกๆ 5 นาที นำไปเก็บที่ถ่วงน้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาที จากนั้นเติม 150 μ L MPC Protein Precipitation Reagent นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g 10 นาที แล้วเก็บเอา supernatant เติมน้ำ 500 μ L isopropanol และกลับหลอดไปมา 30-40 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g ที่ 4 °C 10 นาทีเก็บตะกอน ล้างด้วย 75% ethanol 2 ครั้ง ละลายกลับด้วย TE buffer เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การสกัด Total RNA ด้วย illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare Bioscience)

นำเนื้อเยื่อมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 30 mg ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ ทำให้เซลล์แตกโดยการเติมน้ำ RA1 (350 μ L lysis buffer และ 3.5 μ L B-mercaptoethanol) บดตัวอย่างด้วย grinder ทำการ inverted tube ประมาณ 5 ครั้ง หลังจากนั้นจึงดูดผ่านเข็มฉีดยา ขนาด 0.9 mm ประมาณ 2-3 ครั้ง ดูดเฉพาะสารละลายส่วนใสใส่ใน RNA Mini Filter units จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000g เป็นเวลา 1 -5 นาที จนกว่าสารละลายจะผ่าน RNA Mini Filter หมด ทั้ง filter spin เติมน้ำ 70% ethanol 350 μ L vortex 2-5 วินาที ดูดสารละลายที่ได้ผ่าน RNA Mini Filter column จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g 1 -5 นาที จนกว่าสารละลายจะผ่าน RNA Mini Filter หมด ย้าย

RNA Mini Filter ใส่ ไมโครทิวบ์อันใหม่ เติม MBD 350 μ L จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000g 1 -5 นาที เติม 10 μ L DNase I เตรียมใน 90 μ L DNase reaction buffer 95 μ L ผ่าน RNA Mini Filter บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ล้างด้วย RA2 buffer 200 μ L จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 g 1 -5 นาที ย้าย RNA Mini Filter ใส่ไมโครทิวบ์อันใหม่ ล้างด้วย RA3 buffer 600 μ L จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000g 1 -5 นาที ย้าย RNA Mini Filter ใส่ไมโครทิวบ์อันใหม่ ล้างด้วย RA3 buffer 250 μ L จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000g เป็นเวลา 1 -5 นาที หรือจนกว่าจะแน่ใจว่าแห้งแล้ว ย้าย RNA Mini Filter ใส่ไมโครทิวบ์อันใหม่ ผ่าน membrane ด้วยน้ำ DEPC 40-100 μ L ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g 1 นาที จะได้ RNA นำไปตรวจสอบคุณภาพด้วย agarose gel electrophoresis

Reverse Transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำ RNA ที่สกัดได้มา 0.1-5 μ g ผสมกับ oligo (dT) primer 0.1-5 μ g/ μ L และ DEPC-treated water ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่ 70 °C 5 นาที นำไปเก็บที่ถังน้ำแข็งเป็นเวลา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วเติม 5x reaction buffer, Ribolock™ Ribonuclease inhibition (20 unit/ μ L) และ 10 mM dNTP ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 37°C 5 นาที เติม RevertAid™ M-MuLV Reverse transcriptase (200 ug/ μ L) หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในถังน้ำแข็ง นำไปบ่มที่ 42 °C 60 นาที เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ในขณะเดียวกันก็ออกแบบ Forward และ Reverse degenerate primer จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้ ด้วยโปรแกรม Fast PCR ซึ่ง download ได้จาก http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/oligos.htm แล้วสั่งสังเคราะห์ primer จากนั้นเตรียม mixture ที่มี cDNA, Forward primer, Reverse primer, 10 mM dNTPs, PCR buffer, 50mM MgCl₂ และ Taq DNA polymerase นำ mixture เข้าเครื่อง Thermal Cycler ตั้งโปรแกรมให้มี initial denaturation 1 รอบที่ 94 °C 5 นาที แล้วต่อด้วย 25-35 รอบของ denaturation ที่ 94 °C 1-2 นาที, annealing ที่ 45-65 °C 0.5 ถึง 1 นาที และ elongation 72 °C 1-2 นาที และจบด้วย final extension 1 รอบ ที่ 72 °C 7 นาที ตรวจ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis ตัด DNA band เพื่อนำไปทำ cloning ต่อไป

Cloning and sequencing

1. Elute PCR product จาก agarose gel ด้วยขั้นตอนตามวิธีของ QIAEX II Gel Extraction Kit ของ Qiagen โดยนำ gel ที่ตัดเอาไว้มาเติม solubilizing buffer และ QIAEX II silica-bead จากนั้น heat ที่ 50 °C 10 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 10000g, 2-3 วินาที แล้วล้างด้วย wash buffer 2 ครั้ง ทิ้ง bead ไว้ให้แห้งสัก 5 นาที แล้ว elute ด้วยน้ำที่ pre-warm ที่ 50 °C
2. นำเข้า pDrive cloning vector ด้วยขั้นตอนตามวิธีของ Qiagen โดยนำ vector มาผสมกับ PCR product ใน ligation mixture solution จากนั้น ligate ที่ 16 °C 30 นาที จากนั้นเติม competent

cell แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C 30 นาที จากนั้น นำไป streak บน bacteria agar plate ที่มี ampicillin, IPTG และ X-gal นำเข้าตู้บ่มที่ 37 °C ข้ามคืน

3. เลือก colony สีขาว ไปเพิ่มจำนวนใน LB broth ที่มี ampicillin ที่งัวข้ามคืน จากนั้นนำมาสกัด plasmid ด้วยการใช้ Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems ของ Promega เริ่มจากโดยนำเชื้อที่เลี้ยงได้มาปั่นที่ 12000g, 2-3 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ cell pellet มา resuspend ด้วย Cell Resuspension solution เขย่าอย่างแรงจน cell กระจายตัวดี จากนั้นเติม Cell lysis solution พลิก tube กลับไปมาสัก 2-3 ครั้ง จึงเติม Neutralization solution พลิก tube กลับไปมาสัก 2-3 ครั้ง นำไปปั่นที่ 12000g, 10-15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ supernatant ไปผสมกับ Minipreps DNA Purification resin นำ resin ไป pack column แล้วล้างด้วย Washing solution ที่งัวให้แห้ง จากนั้น ชะด้วยน้ำกลั่นซึ่ง prewarm เอาไว้ที่ 50°C เก็บ eluate ที่มี plasmid นำไปวัด concentration ด้วย Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA) และส่งทำ nucleotide sequencing

4. ตรวจสอบ vector ที่มี gene ที่สนใจ ด้วยการตัดด้วย restriction enzyme เช่น EcoRI แล้วตรวจขนาดที่ตัดได้ด้วย agarose gel electrophoresis หรือด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะ

Nucleotide sequencing และโครงสร้างสามมิติ

นำส่งสถาบันจีโนม สวทช. หรือภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อ sequence ลำดับยีนด้วย nucleotide automated sequencer ด้วยวิธีของ Sanger โดยใช้ M13 forward และ reverse primer จากนั้นแปลงลำดับยีนให้เป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วนำไปหาโครงสร้างทุติยภูมิ ตติยภูมิ และ/หรือ จตุรภูมิ และสร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับโมเลกุลอื่นด้วย phylogenetic tree หรือตำแหน่งของ disulfide bridges โดยอนุมานด้วยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่สามารถ download จาก website ต่าง ๆ เช่น Crustal, MEGA, PHYLIP, Molmol เป็นต้น

การหาโครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรม online ด้วยวิธี Homology modeling โดยใช้ DeepView program (<http://www.expasy.ch/spdbv>) (Schwede และคณะ, 2003) โดยนำ sequence ที่ได้ไป align กับ sequence ที่ทราบแน่ชัดแล้วมาใช้เป็นแม่แบบ

Gene construction และ expression

Fusion gene สร้างขึ้นด้วยการใช้ expression vector pGEX-6P-3 (4900 bp) และ GST Gene Fusion System (Pharmacia Biotech) จากนั้น PCR product จากการทำ PCR จะถูกชะออกจาก gel และถูกแทรกเข้าไปใน cloning region ของ pGEX-6P-3 vector จากนั้นนำ construction ที่เตรียมได้ transform เข้าสู่ *E. coli* strain JM109 แล้วคัดเลือกบน medium ด้วย ampicillin จากนั้นทำการ pick colony และ inoculate เชื้อลงใน broth แล้ว induce ให้มี protein expression ด้วย isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ภายหลังจากเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ OD ตามต้องการแล้ว บั่นเซลล์แล้ว resuspended ใน pre-cooled buffer ที่ประกอบด้วย 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 2% NP-40 จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วย sonication ในน้ำแข็ง

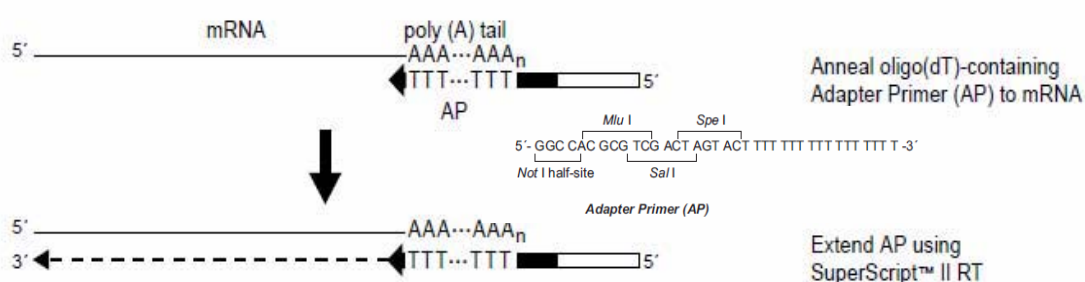
จากนั้นปั่น แล้วเก็บ supernatant กรองผ่าน 0.45 mm Millipore membrane แล้ว incubated กับ glutathione–sepharose 4B bead (Amersham-Pharmacia) ซึ่ง equilibrated กับ buffer ข้างต้นที่ 4 °C พร้อมกับเขย่า จากนั้นทำการล้าง bead แล้ว equilibrated ด้วย cleavage buffer (50 mM Tris–HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT) ปลาย GST ถูกตัดออก ไปจาก fusion protein ด้วยเอนไซม์ PreScission Protease (Amersham Biosciences) ปั่นเบา ๆ จากนั้นเก็บ supernatant แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนใน supernatant ที่ได้ด้วย SDS-PAGE

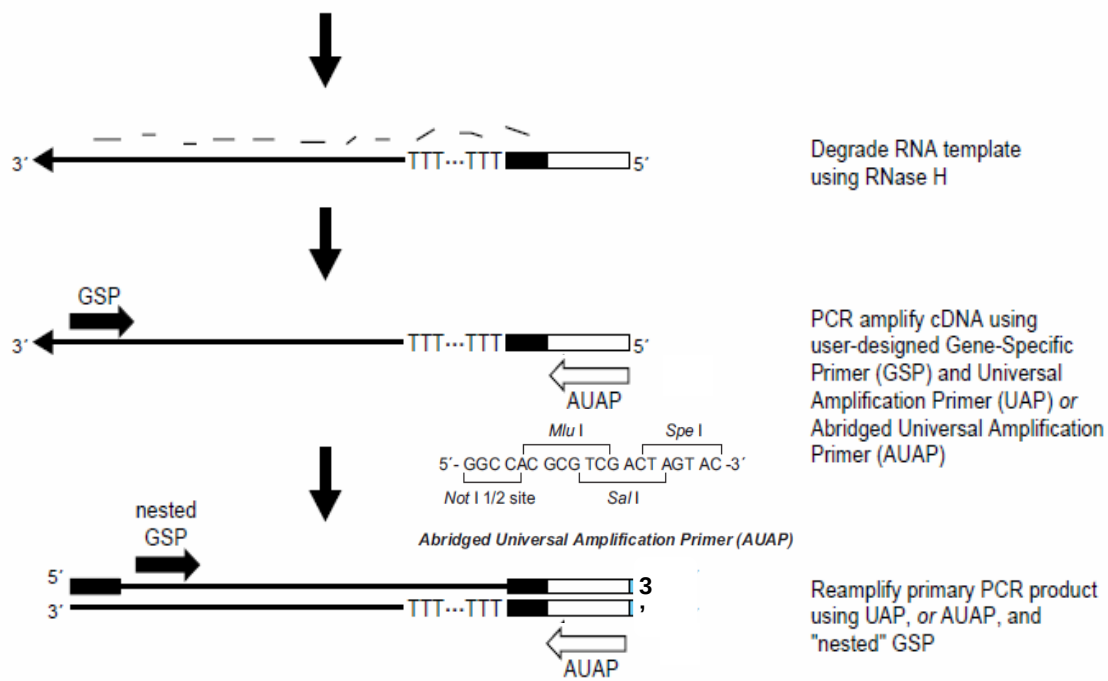
Refolding process (ดัดแปลงจาก Junn และคณะ, 2005)

นำตัวอย่างมาละลายใน denaturation buffer (50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 5 M guanidine–HCl และ 5 mM EDTA) แล้วบ่มที่ 4 °C 1 ชม. จากนั้นค่อย ๆ เจือจางสารละลายดังกล่าว 10 เท่า ปริมาตรด้วย renaturation buffer (50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 1% Triton X-100, 8 mM reduced glutathione (GSH), 1 mM oxidized glutathione (GSSG), 0.5 mM PMSF และ 0.3 M arginine) จากนั้น dialyze ใน dialysis buffer (50mM Tris–HCl, pH 8.0, 0.1% Triton X-100) ทั้งไว้ข้ามคืน แล้ว dialyze ต่อด้วย storage buffer (50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, and 50% glycerol) และท้ายที่สุด dialyze ด้วย PBS buffer (1.5 mM KH₂PO₄, 8.0 mM Na₂HPO₄, 135 mM NaCl, and 2.5 mM KCl, pH 7.4) หรือ desalt ด้วย PD-10 Desalting column (GE Healthcare, UK) และตรวจสอบโปรตีนด้วย 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE

Rapid Amplification of 3' cDNA Ends (3' RACE)

หลักการ 3' RACE เริ่มจากการสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (RT) มีเบส T สายสั้นๆต่ออยู่กับ anchor base เป็นไพรเมอร์ (anchor base คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมีลำดับเบสที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2-3 ชนิด เพื่อใช้ในการต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับเวกเตอร์ภายหลัง) หรือเรียกว่า adapter primer เมื่อได้ cDNA สายแรกแล้วจึงย่อยอาร์เอ็นเอต้นแบบออกไปโดยใช้เอนไซม์ RNase H แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA สายเดียวที่ได้ด้วยวิธี PCR ใช้ไพรเมอร์สองชนิด คือ adapter primer (AP) กับ internal sense primer (ในที่นี้คือ F₁) ผลผลิตที่ได้คือ บริเวณปลาย 3' ของยีนที่ต้องการ





วิธีทำ

ขั้นที่ 1 สังเคราะห์สาย cDNA สายแรกจาก total RNA

เริ่มจากปิเปต total RNA (1-5 µg) รวมกับน้ำ DECP ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 11 µl ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 0.5 ml แล้วเติม 10 µM AP 1 µl, เขย่าเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงสั้น ๆ 5 วินาทีด้วย microcentrifuge จากนั้นบ่มที่ 70 °C 10 นาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงสั้น ๆ แล้วเติมสารต่าง ๆ ดังนี้

Component	Volume (µl)
10X PCR buffer	2
Final composition of the reaction:	
20 mM Tris-HCl (pH 8.4 at 22°C)	
50 mM KCl	
2.5 mM MgCl ₂	
10 mM DTT	
500 nM AP	
500 µM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP	
1-5 µg (≤50 ng/µl) of RNA	

จากนั้น เขย่าเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงสั้น ๆ จากนั้นนำไป equilibrate ที่ 42 °C 2-5 นาที แล้วเติม reverse transcriptase (SuperScript™ II RT) 1 µl นำไปบ่มที่ 42 °C ใน water bath หรือ heat block 50 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 70 °C 15 นาที นำมาวางบนน้ำแข็งและนำไปปั่นเหวี่ยงสั้น ๆ จากนั้นเติม RNase H 1 µl, ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 37 °C 20 นาที เก็บ cDNA สายแรกที่ได้ไว้ที่ -20 °C

ขั้นที่ 2 PCR reaction

เตรียม PCR reaction mixtures ดังนี้คือ 2X PCR Master mixed 12.5 μ l, F1 primer 1.0 μ l, AUAP 1.0 μ l, cDNA template 1.0 μ l, DDW 9.5 μ l โดยใช้ PCR reaction condition ดังนี้



Bioinformatics

Homology และ similarity analyses ใช้ ClustalW software จาก <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> การวิเคราะห์ Similarity searches ใช้ FASTA 3 program จาก <http://fasta.genome.jp> หรือ <http://www.ebi.ac.uk/fasta> ความสัมพันธ์ของ sequences คัดเอาจาก phylogenetic tree สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 จาก <http://www.megasoftware.net> มวลและ pI คำนวณด้วย <http://br.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl?P14790> และ http://br.expasy.org/cgi-bin/pi_tool

การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ก่อนนำไปใช้ผลิตแอนติบอดีในหนูถีบจักร

เทสารละลายสำหรับเตรียม separating gel (9%T acrylamide/Bis, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.05% ammonium persulphate, 0.05% TEMED) ใส่ลงระหว่างแผ่นกระจกของชุดเตรียมเจล แล้วหยดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของสารละลายผสม ปล่อยให้แข็งตัวอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิด polymerization อย่างสมบูรณ์

จากนั้น เตรียม stacking gel (4%T acrylamide/Bis, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.06% ammonium persulphate, 0.31% TEMED) เทลงเหนือ separating gel ซึ่งเทน้ำออกแล้ว จากนั้นเสียบ comb ลงไป ปล่อยให้แข็งตัว จากนั้นผสมตัวอย่างกับ solubilizing solution (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% glycerol, 1% SDS, 5% beta-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเดือดนาน 2 นาที แล้ว load ลงในหลุมเจล แล้วต่อ electric chamber เข้ากับ power supply แยกโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์คงที่ 150 V ในสารละลาย electrode buffer (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1% SDS) จนกระทั่งแถบของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปเกือบสุดของปลายแผ่นเจล ทำการแกะแผ่นเจลออกจากกระจก ตัดส่วนที่เป็น stacking gel ทิ้งไป จากนั้นย้อมเจลด้วย staining solution (0.1% coomassie brilliant blue R-250 ใน 40% methanol, 10% acetic acid) นานแค่พอเห็นแถบโปรตีน แล้วล้างด้วย destaining solution (40% methanol, 10% acetic acid) จนเห็นแถบโปรตีน แล้วตัดเจลตรงตำแหน่งโปรตีนที่ต้องการใส่ microtube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -65°C 1 วัน จากนั้นทำเจลให้แห้งด้วย lyophilizer จนกระทั่งเจลแห้งกรอบ นำเจลมาบดละเอียดในโกร่ง และเก็บใน dessicator

การผลิตแอนติบอดีในหนูถีบจักร

ก่อนอื่น จะะเลือดหนูถีบจักรเพื่อเก็บเป็น pre-immunized serum โดยใช้ micropipette ขนาด 100 ไมโครลิตร ที่ rinse ด้วย 1 unit/ml heparin เพื่อช่วยป้องกันเลือดแข็งตัว แล้วนำเจลที่บดละเอียดแล้วมาทำให้พองตัวด้วย PBS buffer (135 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4) สำหรับการฉีดหนูครั้งแรก จะ emulsify เจลที่พองตัวกับ complete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 ด้วย sonicator จากนั้นฉีดหนูถีบจักรด้วย emulsion ของ antigen ที่เตรียมได้ใต้ผิวหนังบริเวณต้นคอ และแผ่นหลัง 3-4 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร แล้วกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีภายหลังการฉีดหนูครั้งแรก 2 สัปดาห์ ด้วยการนำเจลที่บดละเอียดมาเตรียม emulsion กับ incomplete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 ภายหลังการฉีดหนู 3 วัน เก็บเลือดด้วย retro-orbital plexus bleeding technique แล้วเก็บเลือดไว้ที่ 4°C 12 ชั่วโมง ทำการปั่นเลือดด้วยความเร็ว 2700g ที่ 4°C 10 นาที เก็บซีรัมไว้ที่ -65°C จากนั้นนำซีรัมที่ได้ไปตรวจหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี ELISA และ Western immunoblotting หากค่าไตเตอร์ยังไม่สูงพอจะต้องทำการฉีดกระตุ้นซ้ำ โดยเว้นระยะการฉีดทุก 2 สัปดาห์

การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี ELISA

เริ่มจากเตรียม antigen ความเข้มข้น 1 μg ต่อ 50 μl ใน 50 mM carbonate buffer pH 9.5 แล้วเติมสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ลงใน well ของ microtiter plate ปริมาณ well ละ 50 μl แล้ว incubate ที่ 4°C 12 ชม. จากนั้น ล้างด้วยสารละลาย TBST (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) 3 ครั้ง ทำการ block plate ด้วย blocking solution (5% skim milk ใน TBST) well ละ 100 μl แล้ว incubate ที่ 37°C 1 ชม. แล้วล้างด้วย TBST 3 ครั้ง

เติมซีรัมที่เจือจางด้วย blocking solution อัตราส่วน 1:50 ปริมาณ well ละ 50 μl แล้ว incubate ที่ 37°C 2 ชม. จากนั้นล้างด้วย TBST 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย anti-mouse IgG linked with alkaline phosphatase เจือจางใน TBST อัตราส่วน 1:500 ปริมาณ well ละ 50 μl แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง และ TBS (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl) 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย substrate (1 mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate ใน 100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2) well ละ 100 μl แล้ววัดความเข้มของสีเหลืองด้วย microplate reader

การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี Western immunoblotting

เริ่มจากแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงบนแผ่น nitrocellulose โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 160 mA ต่อหนึ่งเจลเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นตัดแผ่น nitrocellulose เฉพาะตรงตำแหน่งที่ load สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ไปย้อมด้วย 0.1% amido black (ใน 45% methanol, 10% acetic acid) ส่วนที่เหลือนำไปแช่ใน blocking solution บ่มข้ามคืนที่ 4°C แล้วบ่มกับซีรัมที่เจือจางด้วย blocking solution อัตราส่วนต่าง ๆ 1 ชม. ล้างแผ่น nitrocellulose ด้วย TBST

3 ครั้ง, ครั้งละ 5 นาที และแช่ใน mouse IgG linked with alkaline phosphatase ที่เจือจางด้วย TBST อัตราส่วน 1:500 เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้น ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และ TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้ว soak แผ่น nitrocellulose ใน substrate buffer pH 9.5 (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) 2 ครั้ง แช่ในสารละลาย AP conjugated substrate kit (Amersham^R) จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบสีม่วงปรากฏขึ้น และหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

การตรวจฤทธิ์ต้านต่อ toxin ของแอนติบอดี หรือแอนติซีรัม

กระทำโดยการหาค่า paralyzed dose 50 (PD₅₀) ในสัตว์ทดลอง โดยใช้จิ้งหรีด โดยนำแมลงทดลองมาชั่งน้ำหนัก (ต่างกันไม่เกินร้อยละ 10) แล้วฉีดพิษสัตว์ที่ผสมกับแอนติซีรัมใน PBS (135 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.5 mM KCl และ 8.0 mM Na₂HPO₄) ที่ค่าการเจือจางต่างๆ เข้าที่ช่องท้อง (intra-abdominal) ปริมาณไม่เกิน 20 ไมโครลิตร นาน 1 ชม. นับจำนวนสัตว์ทดลองที่พลิกตัวได้ แล้วหาค่า PD₅₀

บทที่ 4 ผลการทดลอง

ตอนที่ 4.1 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษแมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*) การทำบริสุทธิ์, การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออกฤทธิ์ในน้ำพิษ และการผลิตแอนติบอดีต้านพิษ

4.1.1 แมงป่องช้างและการรีดพิษ

แมงป่องช้างรับซื้อจากชาวบ้านใกล้เคียงมหาวิทยาลัยขอนแก่น จะถูกนำมาเลี้ยงไว้ในตู้กระจกในห้องเลี้ยงสัตว์ ซึ่งปรับอุณหภูมิไว้ที่ราว 28°C ให้จิ้งหรีดเป็นอาหารหลัก (รูปที่ 4.1.1) การจำแนก species ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อรุณรัตน์ จวีราช แห่งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ อ. โกวิท น้อยโคตร แห่งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง น้ำพิษจากแมงป่อง รีดพิษโดยการ fix ตัวสัตว์ให้อยู่นิ่ง แล้วช็อกด้วยไฟฟ้า 100 V duration 1-msec ที่ความถี่ 10 Hz ด้วยเครื่อง Grass stimulator model S88

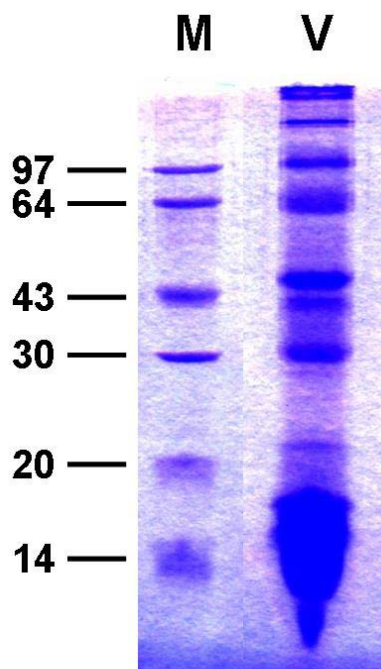


รูปที่ 4.1.1 การเลี้ยงแมงป่องช้าง

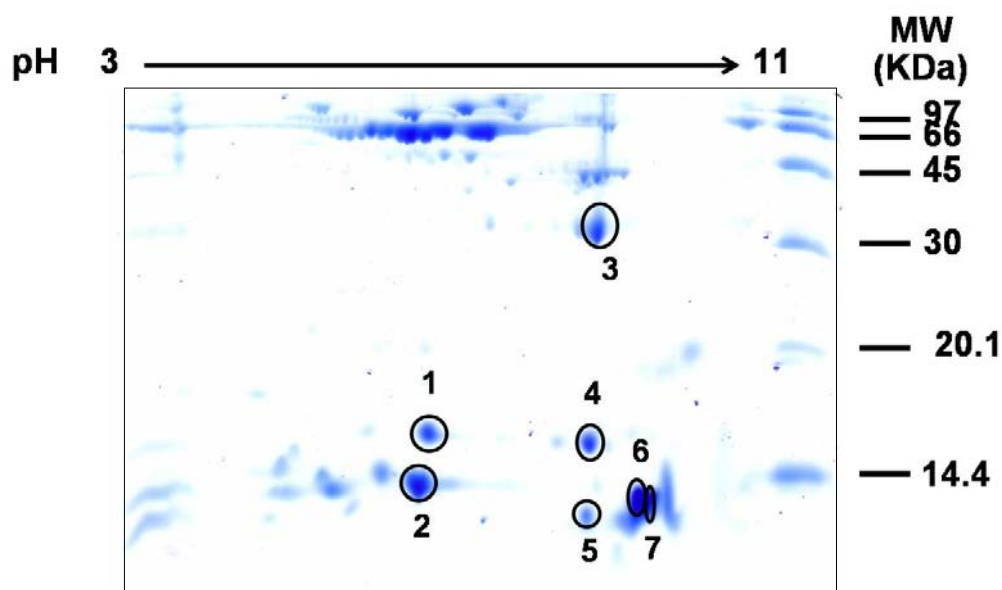
4.1.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษแมงป่องช้าง

จากผลการวิเคราะห์โดยการนำ crude venom ของแมงป่องช้าง มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 4.1.2) พบแถบโปรตีนต่าง ๆ หลายแถบ และพบแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็ก (ประมาณ 10 kDa) มีความเข้มมาก ซึ่งคาดว่าจะน่าจะเป็น toxin ที่มีในพิษแมงป่อง และจากการตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมที่มีในพิษแมงป่องด้วยวิธี Bradford โดยเทียบกับ bovine serum albumin พบว่า น้ำพิษมีความเข้มข้นของโปรตีนรวม 40 µg/µl

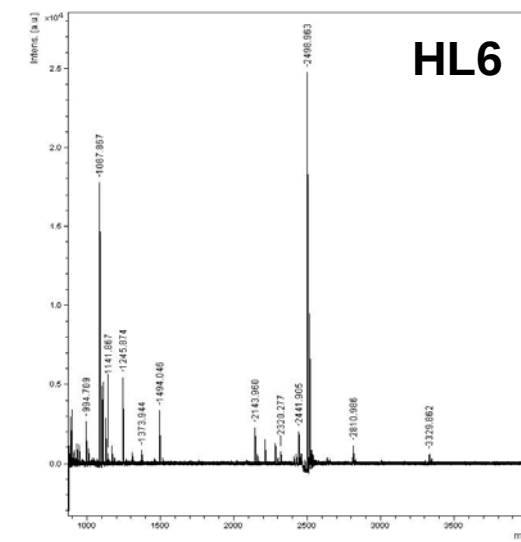
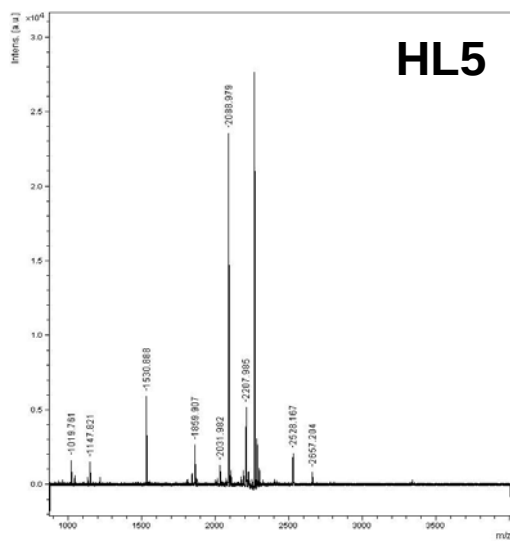
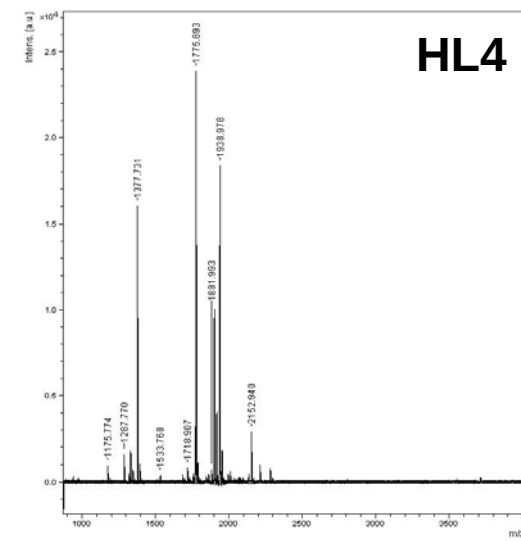
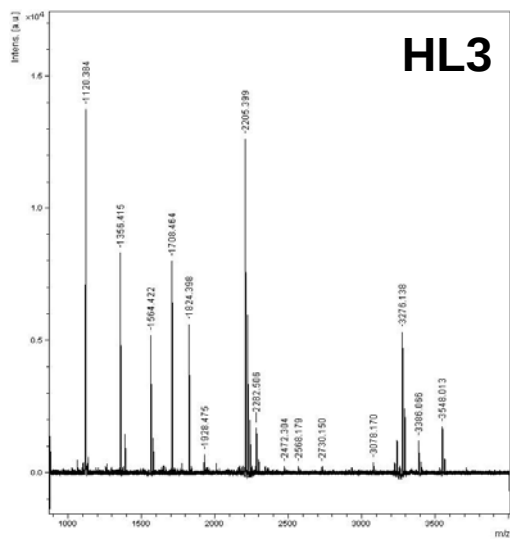
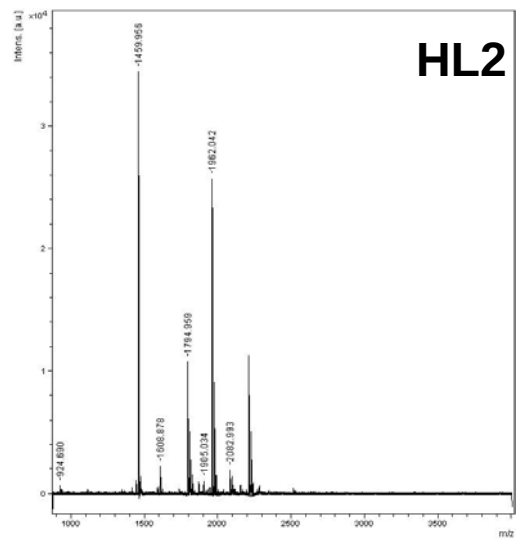
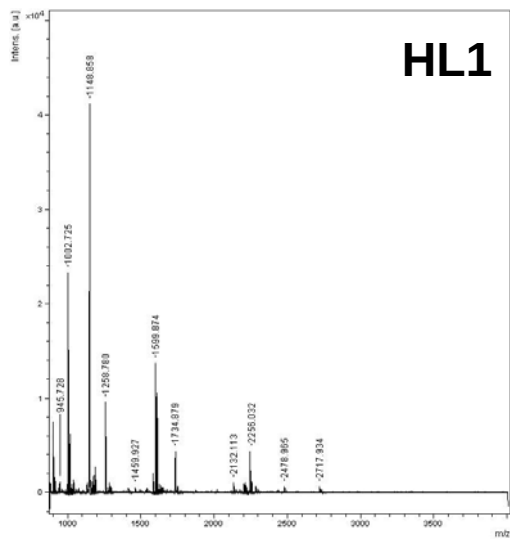
จากนั้น นำน้ำพิษมาแยกด้วย 2D-PAGE พบโปรตีนประมาณ 30 spot (รูปที่ 4.1.3) ทำการตัดโปรตีนที่เป็น major spot (วงกลมไว้ในรูป) ตั้งแต่ spot S1 ถึง S7 ส่งไปทำ peptide mass fingerprint ที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice Unit หรือ BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ trypsin จากนั้นนำเข้า matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (รูปที่ 4.1.4) เมื่อได้ข้อมูลแล้วนำไป search ใน database ด้วยโปรแกรม Mascot Search แล้ว พบว่าโปรตีนทั้ง 7 ไม่ตรงกับตัวใดเลย เพื่อให้สามารถ identify ชนิดของโปรตีนให้ได้ จึงได้นำ crude venom ของแมงป่องช้าง มาแยกด้วย 2D-PAGE อีกหลายครั้ง แล้วทำการตัด spot ต่าง ๆ ตั้งแต่ HL1.1 ถึง HL1.17 (รูปที่ 4.1.5) แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนด้วย LC-MS/MS (ตารางที่ 4.1.1) พบว่า spot HL1.4, HL1.5, HL1.11, HL1.13 และ HL1.18 คือเอนไซม์ Phospholipase และ HL1.8 คล้ายกับ Imperatoxin ของ *Pandinus imperator* (รูปที่ 4.1.6) แมงป่องจักรพรรดิในทวีปแอฟริกา และได้ผลเช่นเดียวกันเมื่อวิเคราะห์ spot HL1.8 ซ้ำด้วย LC-MS/MS (ตารางที่ 4.1.2)

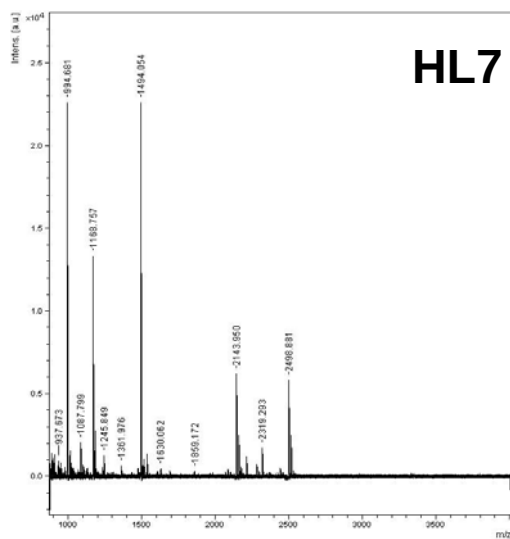


รูปที่ 4.1.2 การตรวจสอบแถบโปรตีนในพิษแมง
ป่องช้างด้วยวิธี SDS-PAGE โดยนำพิษแมงป่องมา
ผสมกับ solubilizing buffer แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย
12% SDS-PAGE แล้วนำไปย้อมด้วย 0.1%
Coomassie brilliant blue

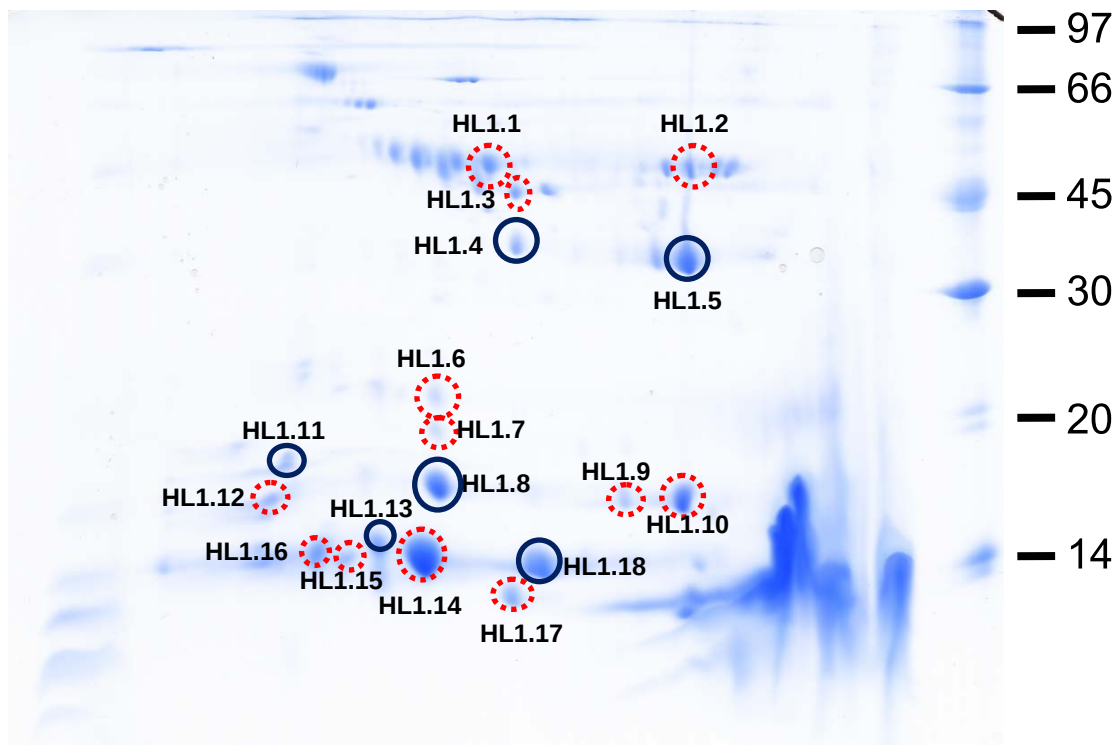


รูปที่ 4.1.3 2D-PAGE profile ของน้ำพิษแมงป่องช้าง (load ปริมาณโปรตีนรวมประมาณ 100 ไมโครกรัม) ภายหลังย้อมด้วยสี Coomassie สำหรับ first dimension ใช้ strip pH 3-11 ส่วน second dimension นั้น ใช้ 16.5% Tris-tricine gel electrophoresis หมายเลข 1 ถึง 7 คือ spot HL1 ถึง HL7 ซึ่งได้ตัดส่งวิเคราะห์ peptide mass fingerprint





รูปที่ 4.1.4 Peptide mass fingerprint ของ spot หมายเลข HL1 ถึง HL7 โดยนำโปรตีนไปตัดด้วยเอนไซม์ trypsin จากนั้นนำเข้า MALDI-TOF mass spectrometry ตัวเลขมีหน่วยเป็น Dalton

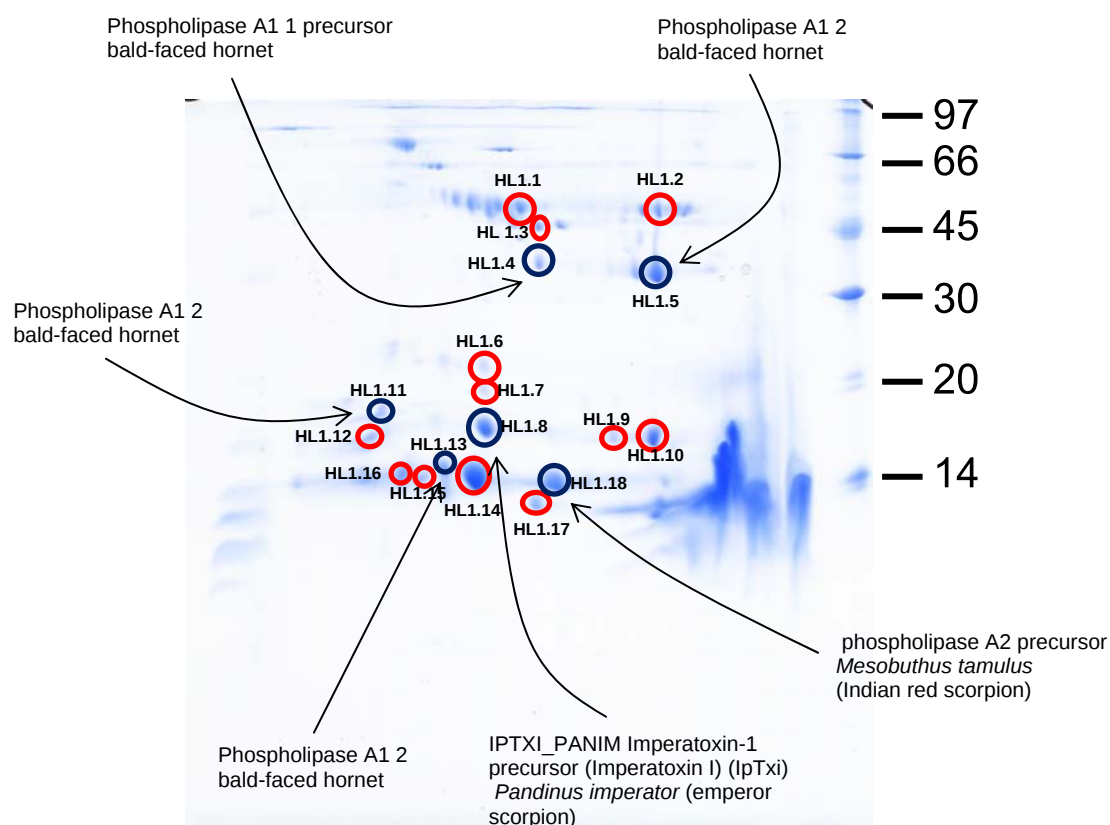


รูปที่ 4.1.5 2D-PAGE profile ของน้ำพิษแมงป่องช้าง ภายหลังย้อมด้วย Coomassie blue วงกลมทั้งประและไม่ว่า คือ spot HL1.1 ถึง 1.17 ที่ถูกส่งไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

ตารางที่ 4.1.1 ผลการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ของ spot HL1.1 ถึง HL1.17

Spot No.	Reference scan	Peptide	Score XC	Source
HL1.1	gi 107022375 ref YP_620702.1 Periplasmic phosphate binding protein	K.VTDASGKPVAEE. K.VNYQGIGSSGGLK.Q K.TVDFAGSDAPLK.D K.GNDGVAAAFVQR.L K.IGEGTTVNWPTGTGGK.G K.LPDTDIAVVR.R K.WNDPAIAALNPK.V	66.2193	<i>Burkholderia</i> <i>cenocepacia</i> AU 1054
HL1.2	gi 78066909 ref YP_369678.1 Phasin	K.STLAEGQENAQR.L K.VQALVDNVAK.N K.NAPAGSETAVAALK.S K.SALNAANTTYETVQK.A K.ANLESLFGLTTK.A	44.25502	<i>Burkholderia</i> sp. 383
HL1.3	gi 107022375 ref YP_620702.1 Periplasmic phosphate binding protein	K.GNDGVAAAFVQR.L K.IGEGTTVNWPTGTGGK.G K.TVDFAGSDAPLKDEELAK.E	30.19082	<i>Burkholderia</i> <i>cenocepacia</i> AU 1054
HL1.4	gi 548449 sp Q06478 PA11_DOLMA Phospholipase A1 1 precursor (Allergen Dol m 1.01) (Dol m I)	R.ICETDAHVQILHTSSNLGTE R.T	10.2621	<i>Dolichovespula</i> <i>maculata</i> (bald- faced hornet)
HL1.5	gi 1709542 sp P53357 PA12_DOLMA Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02) (Dol m I)	R.NECVCVGLNAK.E	10.18379	<i>Dolichovespula</i> <i>maculata</i> (bald- faced hornet)
HL1.6	gi 78066909 ref YP_369678.1 Phasin	K.STLAEGQENAQR.L K.VQALVDNVAK.N K.NAPAGSETAVAALK.S K.SALNAANTTYETVQK.A	38.26206	<i>Burkholderia</i> sp. 383
HL1.7	gi 78066909 ref YP_369678.1 Phasin	K.STLAEGQENAQR.L K.VAEAQFEEQNK.K K.VQALVDNVAK.N K.NAPAGSETAVAALK.S K.SALNAANTTYETVQK.A	48.24917	<i>Burkholderia</i> sp. 383
HL1.8	gi 37079101 sp P59888 IPTXI_PAN IM Imperatoxin-1 precursor (Imperatoxin I) (IpTxi) (Imperatoxin inhibitor) [Contains:	R.THDHCDNIPSGQTK.Y	10.16053	<i>Pandinus</i> <i>imperator</i> (emperor scorpion)

Spot No.	Reference scan	Peptide	Score XC	Source
	Imperatoxin-1 large subunit (Imperatoxin I large subunit) Imperatoxin-1 small subunit (Imperatoxin I small subunit)]			
HL1.9	gi 78066909 ref YP_369678.1 Phasin	K.STLAEGQENAQR.L K.VQALVDNVAK.N K.NAPAGSETAVAALK.S	30.18961	<i>Burkholderia</i> sp. 383
HL1.10	gi 91777371 ref YP_552579.1 ABC phosphate transporter, periplasmic ligand binding protein		20.13508	<i>Burkholderia</i> <i>xenovorans</i> LB400
HL1.11	gi 1709542 sp P53357 PA12_DOLMA Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02) (Dol m I)	R.ICETDAHYVQILHTSSNLGTE R.T R.LIGHSLGAQIAGFAGK.E	20.28637	<i>Dolichovespula</i> <i>maculata</i> (bald- faced hornet)
HL1.12	gi 78066909 ref YP_369678.1 Phasin	K.STLAEGQENAQR.L K.VQALVDNVAK.N K.SALNAANTTYETVQK.A	28.25143	<i>Burkholderia</i> sp. 383
HL1.13	gi 1709542 sp P53357 PA12_DOLMA Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02) (Dol m I)	R.ICETDAHYVQILHTSSNLGTE R.T	10.26604	<i>Dolichovespula</i> <i>maculata</i> (bald- faced hornet)
HL1.14	gi 67643008 ref ZP_00441758.1 COG0840: Methyl-accepting chemotaxis protein	K.VQALVDNVAK.N K.SAINAANTTYETVQK.A K.NAPAGSETAVAALK.S	30.2164	<i>Burkholderia</i> <i>mallei</i> GB8 horse 4
HL1.15	gi 187927835 ref YP_001898322.1 Triacylglycerol lipase	K.FLGVVDYWYQIPEDLR.A	10.25232	<i>Ralstonia</i> <i>pickettii</i> 12J
HL1.16	gi 67643008 ref ZP_00441758.1 COG0840: Methyl-accepting chemotaxis protein	K.VQALVDNVAK.N K.NAPAGSETAVAALK.S K.SAINAANTTYETVQK.A		<i>Burkholderia</i> <i>mallei</i> GB8 horse 4
HL1.17	gi 78066909 ref YP_369678.1 Phasin	K.STLAEGQENAQR.L K.VQALVDNVAK.N	20.18996	<i>Burkholderia</i> sp. 383
HL1.18	gi 38324524 gb AAR16429.1 phospholipase A2 precursor	K.YGLTNEGKYTMM*NCK.C K.YGLTNEGKYTMMNCK.C	18.13379	<i>Mesobuthus</i> <i>tamulus</i> (Indian red scorpion)



รูปที่ 4.1.6 ผลการวิเคราะห์แต่ละ spot ด้วย LC-MS/MS พบว่า spot HL1.4, 1.5, 1.11, 1.13 และ 1.18 คือเอนไซม์ Phospholipase และ HL1.8 คล้ายกับ Imperatoxin ของ *P. Imperator*

ตารางที่ 4.1.2 ผลการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ของ spot HL1.8

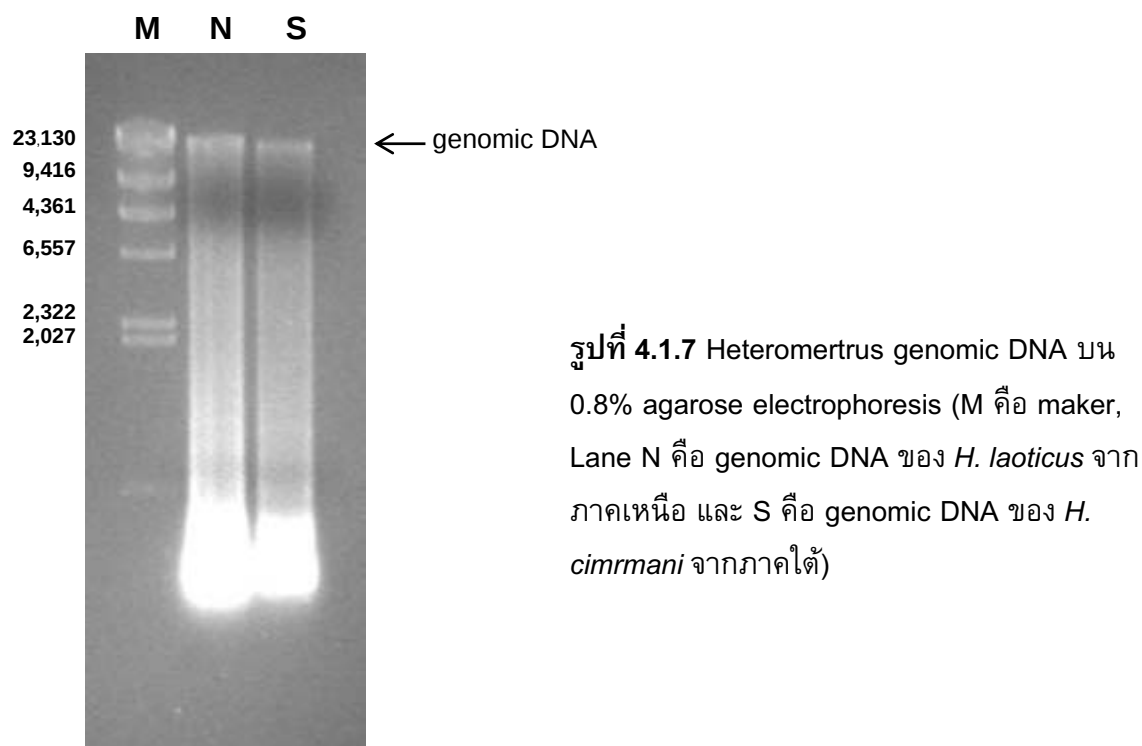
Spot No.	Reference scan	Peptide	Score XC	Source
HL1.8	gi 37079101 sp P59888 IPTXI_PANIM Imperatoxin-1 precursor (Imperatoxin I) (IpTxi) (Imperatoxin inhibitor) [Contains: Imperatoxin-1 large subunit (Imperatoxin I large subunit) Imperatoxin-1 small subunit (Imperatoxin I small subunit)]	R.THDHCDNIPSGQTK.Y	10.1605	<i>Pandinus imperator (emperor scorpion)</i>

4.1.3 การหาลำดับกรดอะมิโนของ Heteroscorpine ในพิษแมงป่องช้างจาก ภาคเหนือ (*H. laoticus*) และ ภาคใต้ (*H. cimrmani*) ของประเทศไทย

ภายหลังจากที่ได้รับการยอมรับให้โปรตีนชนิดใหม่ที่มีชื่อว่า Heteroscorpine-1 (HS-1) ที่ทำ
บริสุทธิ์ได้จากน้ำพิษของแมงป่องช้าง *H. laoticus* ได้ลงตีพิมพ์ในวารสาร Toxicon เมื่อปี 2007 แล้ว
(Uawonggul และคณะ, 2007) ต่อมาเพื่อหา isoform อื่นในกลุ่มเดียวกันจาก Heterometrus อื่น ๆ
ด้วยหลักการที่ว่า การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนแม้เพียงลำดับเดียว ก็อาจจะได้โปรตีนที่มี
ฤทธิ์ต่างออกไป ดังนั้น จึงหวังว่าอาจจะได้ isoform ของ Heteroscorpine ใน Heterometrus อื่นที่มี
ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงขึ้น ดังนั้น จึงได้นำแมงป่องช้างจากภาคเหนือ (จ.พะเยา) และแมงป่องช้างจาก
ภาคใต้ (จ.ปัตตานี) มาเลี้ยงไว้ ซึ่งเมื่อจำแนกชนิดโดย อ. โกวิท น้อยโคตร แห่งภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง พบว่าจากภาคเหนือ คือ *H. laoticus* และภาคใต้ คือ *H.*
cimrmani

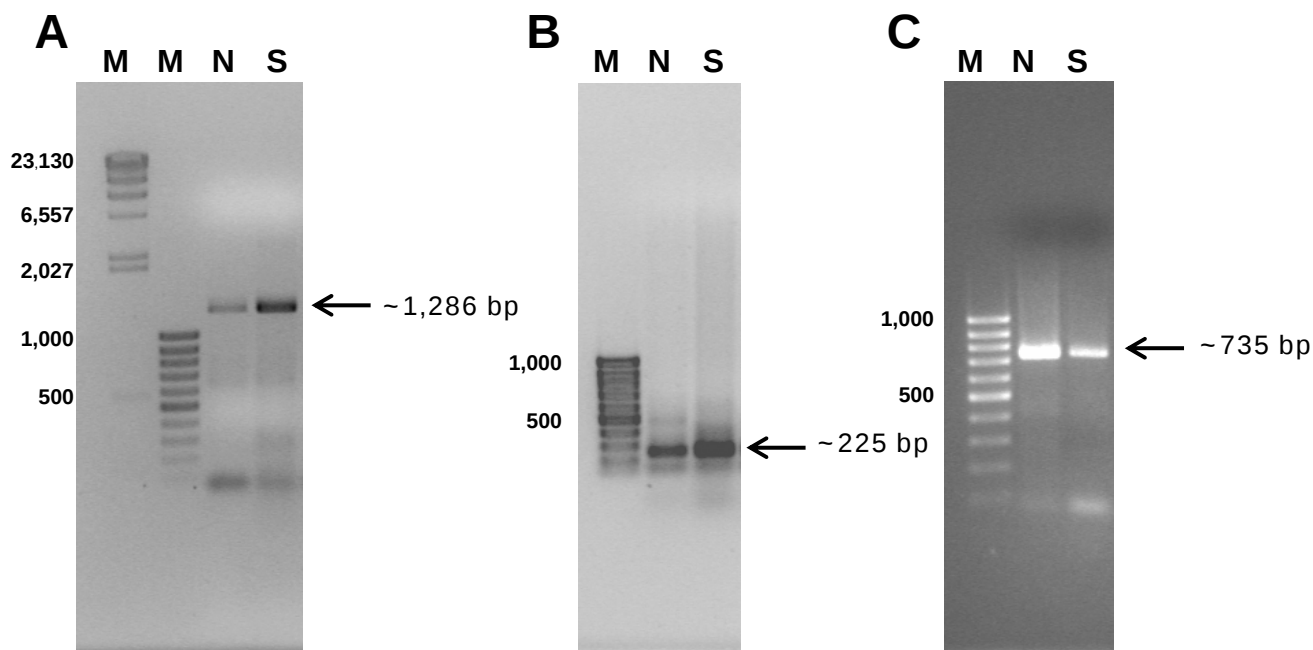
จากนั้น จึงได้นำแมงป่องชนิดต่าง ๆ มาสกัดดีเอ็นเอ (รูปที่ 4.1.7) จากนั้นนำไปทำ PCR โดย
ใช้ primer (ตารางที่ 4.1.3) ได้ PCR product (รูปที่ 4.1.8) แล้วส่งไปหา sequence ด้วยเครื่อง
automated sequencer ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ทั้ง PCR และ
การ sequence ต้องทำ 3 รอบของแต่ละคู่ของ primer) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกันแล้ว
ระหว่างโปรตีน HS-1 (Uawonggul และคณะ, 2007) กับ HS-2 ในพิษแมงป่องช้างจากภาคเหนือ และ
HS-3 ในพิษแมงป่องช้างจากภาคใต้ของประเทศไทย (รูปที่ 4.1.9 และตารางที่ 4.1.4 สำหรับลำดับ
ด้าน 5' และปลาย N และ รูปที่ 4.1.10 และตารางที่ 4.1.5 สำหรับลำดับด้าน 3' และปลาย C) พบว่า
มีความคล้ายกันเกินร้อยละ 80 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มเส้นของทั้งสามตัวด้วย
โปรแกรม CustalW (รูปที่ 4.1.11) พบว่า มีความเหมือนกันเกิน 90% บริเวณที่ต่างอย่างเด่นชัดคือ
บริเวณ intron เมื่อนำเอาเฉพาะส่วนที่เป็น exon มาเปรียบเทียบกัน พบว่าเหมือนกันถึง 98% (รูปที่
4.1.12A) และเมื่อ deduce เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีความเหมือนกัน 100% (รูปที่ 4.1.12B)
แสดงว่า แมงป่องช้างทั้งสามชนิดมีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการมาก หรือไม่มีวิวัฒนาการต่ำ
จนกระทั่ง mutation ที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ HS ไปเปรียบเทียบกับ K⁺ channel blocker และ defensins
พบว่าโมเลกุลในกลุ่มนี้มี cysteine residue จำนวน 6 ตัว ซึ่งสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้ 3
พันธะ (รูปที่ 4.1.13) และเมื่อนำไปสร้าง phylogenetic tree พบว่า HS-1 มี homology สูงกับโมเลกุล
ในกลุ่ม Scorpine (รูปที่ 4.1.14) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ HS-1, HS-2 และ HS-3 ไปสร้าง
โครงสร้างสามมิติ ด้วย DeepView Swiss-PdbViewer (รูปที่ 4.1.15) พบว่า domain ที่ประกอบขึ้น
จากลำดับกรดอะมิโน ลำดับที่ 54 ถึง 89 ให้โครงสร้างเป็น helix ซึ่งบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มี
ความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Heteroscorpine



ตารางที่ 4.1.3 Primer ที่ใช้สำหรับงานหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Heteroscorpine-2 (HS-2) และ Heteroscorpine-3 (HS-3) ในพิษแมงป่องช้างจากภาคเหนือและภาคใต้

Forward primers	Reverse primers	Product size (bp)
HSF7: 5'-GGA CT(C/G) (A/G/C)T(A/G) GC(C/G) ATT GCC TC(C/T) TGC-3'	HSR3: 5'-GCA GAA TCC CTT TTC ACC TGA CG-3'	1286
HSF33: 5'- CTG TCG AGT TGC GGA ACG CTA G -3'	HSR15: 5'-TGC CGA AAC TCT CGG AAA GGC TC -3'	225
HSF12: 5'- TGA GGG TCT AAT ATA AGC CAG TCG -3'	HSR12: 5'- TCC CGG AGA GCG GGA CAA CG -3'	735



รูปที่ 4.1.8 PCR products ของ *Heterometrus* genomic DNA ซึ่งเพิ่มจำนวนด้วยการใช้ primer HSF7 และ HSR3 (A), HSF33 และ HSR15 (B), HSF12 และ HSR12 (C) (M คือ maker, N ใช้ DNA ของแมงป่องช้างจากภาคเหนือ (*H. laoticus*) และ S ใช้ DNA ของแมงป่องช้างจากภาคใต้ (*H. cimirmani*))

HS-1	ATATAGAACTAA-ATACA-----ACACCTCCG-AAATCCGTAAATGC---ATATTTTTTTT	50
HS-2	ATATAGAACTAA-ATACA-----ACACCTCCG-AAATCCGTAAATGC---ATATTTTTTTT	50
HS-3	ATAGGAACCTTAATATACACACACACTNCCGGAAACCCGNTAAAGCCATATAATTTTTT	60
	*** * *** ***** ***** *** ** * ** *	
HS-1	TCAGGTTTGATTGATTCTTCTGCCTCCAAAACAAGATGAACAGTAAGCTTACTGCTCTTA	110
HS-2	-CAGGTTTGATTGATTCTTCTGCCTCCAAAACAATATGAACAGCAAGCTTACTGCTCTTA	109
HS-3	TCAGGTTTGATTGATTCTTCTGCCTCCAAAACAAGATGAACAGTAAGCTTACTGCTCTTA	120

	M N S K L T A L I	
HS-1	TCTTCCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGC GGATGGATTAGTAAGTAAAAATTTTTATT	170
HS-2	TCTTCCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGC GGATGGATTAGTAAGTACAGTTTTTTATT	169
HS-3	TCTTCCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGC GGATGGATTAGTAAGT--AATTTT----	174

	F L G L V A I A S C G W I N	
HS-1	GTTATTGATCGAGCCTTTCCGAGAGTTTCGGC	202
HS-2	GTTATTGATCGAGCCTTTCCGAGAGTTTCGGC	201
HS-3	-----	

รูปที่ 4.1.9 แสดงการเปรียบเทียบ gene ของ *Heteroscorpine* (HS) ในส่วนปลายอะมิโน; HS-1 คือ HS จาก *H. laoticus* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, HS-2 คือ HS จาก *H. laoticus* จากภาคเหนือ และ HS-3 คือ HS จาก *H. cimirmani* จากภาคใต้, Intron อยู่ในกรอบเส้นทึบ, non-translated region อยู่ในกรอบเส้นประ ตัวอักษรแฉกด้านล่างสุดคือกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 4.1.4 แสดงร้อยละความเหมือนของ gene ของ Heteroscorpine (HS) ในส่วนปลายอะมิโน

	SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
	=====				
	1 HS-1	202	2 HS-3	174	85
	1 HS-1	202	3 HS-2	201	98
	2 HS-3	174	3 HS-2	201	81
	=====				
HS-1	ACGAGTCTTT-ACGCCTCGGTTTCCCTGGCTATTA-TAGGCTATTTTATAGTCTAACAAA				
HS-2	ACGAGTCTTTTACGCCTCGGTTTCCCTTGCTATTAATAGGCTATTTTATAGTCGAACAAA				
HS-3	ACGAGTCTTTTACGCCTCGGTTTCCCTTGCTATTA-TAGGCTATTTTATAGTCGAACAAA				

HS-1	CACCGAGTTAACTAATGTTTTCTCTTTCCAGATGAAGAGAAGATACAAAAGAAAATTGAC				
HS-2	CACCAAGTTAACTAATGTTTTCTCCTTCCAGATGAAGAGAAGATACAAAAGAAAATTGAC				
HS-3	CACCGAGTTAACTAATGTTTTCTCTTTCCAGATGAAGAGAAGATACAAAAGAAAATTGAC				

	E E K I Q K K I D				
HS-1	GAAAAAATAGGAAATAATATCCTCGGAGGGATGGCTAAGGCCGTCGTCCACAAACTGGCG				
HS-2	GAAAAAATAGGAAATAATATCCTCGGAGGGATGGCTAAGGCCGTCGTCCACAAACTGGCG				
HS-3	GAAAAAATAGGAAATAATATCCTCGGAGGGATGGCTAAGGCCGTCGTCCACAAACTGGCG				

	E K I G N N I L G G M A K A V V H K L A				
HS-1	AAGGGCGAATTCCAATGCGTGGCAAATATTGATACGATGGGAAATTGCGAAACGCACTGC				
HS-2	AAGGGCGAATTCCAATGCGTGGCAAATATTGATACGATGGGAAATTGCGAAACGCACTGC				
HS-3	AAGGGCGAATTCCAATGCGTGGCAAATATTGATACGATGGGAAATTGCGGAGACTCACTGC				

	K G E F Q C V A N I D T M G N C E T H C				
HS-1	CAAAAAACGTCAGGTGAAAAGGGATTCTGCCACGGTACCAAATGCAAGTGTGGAAAACCA				
HS-2	CAAAAAACGTCAGGTGAAAAGGGATTCTGCCACGGTACCAAATGCAAGTGTGGAAAACCA				
HS-3	CAAAAAACGTCAGGTGAAAAGGGATTCTGCCACGGAACCAAATGCAAGTGTGGAAAACCA				

	Q K T S G E K G F C H G T K C K C G K P				
HS-1	TTATCCTACTAA 310				
HS-2	TTATCCTACTAA 312				
HS-3	TTATCCTACTAA 311				

	L S Y Stop				

รูปที่ 4.1.10 แสดงการเปรียบเทียบ gene ของ Heteroscorpine (HS) ในส่วนปลายคาร์บอกซี; HS-1 คือ HS จาก *H. laoticus* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, HS-2 คือ HS จาก *H. laoticus* จากภาคเหนือ และ HS-3 คือ HS จาก *H. cimrmani* จากภาคใต้, Intron อยู่ในกรอบเส้นทึบ, ตัวอักษรแฉกสว่างสุดคือ กรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 4.1.5 แสดงร้อยละความเหมือนของ gene ของ Heteroscorpine (HS) ในส่วนปลายคาร์บอก

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 HS-1	310	2 HS-2	312	98
1 HS-1	310	3 HS-3	311	98
2 HS-2	312	3 HS-3	311	98

HS-1	CTGTCGAGTTGCGGACGCTAGATATAGAACTAATACAAACCTCCGAAATCGTAAATGCATATTTTTCAGGTTTGATTGATTCTCTGCTCCAAACAGATGAACAGTAAGCTTACTGCTCTTATCTTCCTC	140
HS-2	*****	137
HS-3	*****	139
HS-1	GGACTCGTAGCGATTGCCTCTTCGGATGGATTAGTAAGTAAATTTTATGTTATGATGAGCCTTCCGAGAGTTTCGGCATGAAAAGTGCTCAGTTTATGAACATTCAACCACCAAGTTAGAGTACTTGAACA	280
HS-2	*****	277
HS-3	*****	279
HS-1	ACTGCTCATATACTGAACGAAGCCAGATATTAGACACTATTGGTGAGTTCGATAGCGAAACTGCATGCGGTAGCATGAAACGAATAAGGTAATGTTATACAGTCGATATAATTACGTATCGAATCTGAGGCTCT	420
HS-2	*****	417
HS-3	*****	419
HS-1	AATATAAGCCAGTCGATTTCCGTAGCAGTCAGGCGATACCGCCTAATAGTCACACGGATTCTGTGATTAAATAATAGAGCACCTAAAACCAATTATCCTCCATTGAAAATGAATTTATTAAATGTCACAATCTAGCGAC	560
HS-2	*****	557
HS-3	*****	559
HS-1	TAGTCATTATCTTCATCTAAAAAGTTTCATGAACAGGATTGATTACTATTGTTACGTAATAATATATACTTCGGGATGATCGTTACGTAATCATAACGTTAATGAGGATTGTGGTATATATTTTTTCTGAAACTTGA	700
HS-2	*****	697
HS-3	*****	699
HS-1	TTACAGCCAGTGAAGTTCCGAATTTAATATATTTGAAACTTCCTTAC-----TTTTTATATCAGCAGATTATGTATAGTGAATTCGCTTCTGCTCCAGAGTCGAATTTAAATAGACTGCTCTCCGCTCTTAAGGAG	839
HS-2	*****	836
HS-3	*****	838
HS-1	TTAATGGTAGCAATCAGTCCGCCATTTTACCGCAGCAACTCTAGTACTATCTGGAACGTTTGGCTTTTGTGAATTAACTCTGTGCACCTTAAATTTGCAAAATTTCAAAGATCTTACAAAAAGAGAAAT	978
HS-2	*****	968
HS-3	*****	976
HS-1	GGAATGACCGCGGAGCTATAACAAGAAATTTCTTAAGGAATATACGAGCCATGCCCGGCGATATTTGATAAACGGGTTACAAAAAAGAGAGCTACTTATCGATTATTACTTTTA-----AAATAACCA	1111
HS-2	*****	1101
HS-3	*****	1114
HS-1	ACTTCCATTTCAAGTTGTCCTCGCTCTCCGGGACTTCTCTTTACGAGTCTTTACGCTGGTTTCCCTGCTATTAAGGCTATTTATAGTCTAACAAACACCGAGTTAACTAATGTTTCTCTTTCCAGATGAA	1249
HS-2	*****	1241
HS-3	*****	1253
HS-1	GAGAAGATACAAAAGAAATTTGACGAAAAATAGGAATAATATCTCGAGGGATGGCTAAGCCGCTGCTCCACAACTGCGCAAGGCGAATTCATGCGTGGCAATATTGATACGATGGAAATTCGGAACGCA	1389
HS-2	*****	1381
HS-3	*****	1393
HS-1	CTGCCAAAAACGTCAGGTGAAAAGGATTCTGCCACGGTACCAAATGCAAGTGTGAAAACCATTTCTACTAA	1465
HS-2	*****	1457
HS-3	*****	1469

รูปที่ 4.1.11 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HS-1, HS-2 และ HS-3 ซึ่งลำดับที่แตกต่างกันจะแสดงไว้ด้วยกล่องสี่เหลี่ยม

A

```

HS-1 GTTTGATTGATTCTTCTGCCTCCAAAACAAATATGAACAGTAAGCTTACTGCTCTTATCTT 60
HS-2 GTTTGATTGATTCTTCTGCCTCCAAAACAAATATGAACAGTAAGCTTACTGCTCTTATCTT 60
HS-3 GTTTGATTGATTCTTCTGCCTCCAAAACAAATATGAACAGCAAGCTTACTGCTCTTATCTT 60
*****

HS-1 CCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGC GGATGGATTAAATGAAGAGAAGATACAAAAGAA 120
HS-2 CCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGC GGATGGATTAAATGAAGAGAAGATACAAAAGAA 120
HS-3 CCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGC GGATGGATTAAATGAAGAGAAGATACAAAAGAA 120
*****

HS-1 AATTGACGAAAAAATAGGAAATAATATCCTCGGAGGGATGGCTAAGGCCGTCGTCCACAA 180
HS-2 AATTGACGAAAAAATAGGAAATAATATCCTCGGAGGGATGGCTAAGGCCGTCGTCCACAA 180
HS-3 AATTGACGAAAAAATAGGAAATAATATCCTCGGAGGGATGGCTAAGGCCGTCGTCCACAA 180
*****

HS-1 ACTGGCGAAGGGCGAATTCCAATGCGTGGCAAAATATTGATACGATGGGAAATTGCGAAAC 240
HS-2 ACTGGCGAAGGGCGAATTCCAATGCGTGGCAAAATATTGATACGATGGGAAATTGCGAAAC 240
HS-3 ACTGGCGAAGGGCGAATTCCAATGCGTGGCAAAATATTGATACGATGGGAAATTGCGAGAC 240
*****

HS-1 GCACTGCCAAAAACGTCAGGTGAAAAGGGATTCTGCCACGGTACCAAATGCAAGTGTGG 300
HS-2 GCACTGCCAAAAACGTCAGGTGAAAAGGGATTCTGCCACGGTACCAAATGCAAGTGTGG 300
HS-3 TCACTGCCAAAAACGTCAGGTGAAAAGGGATTCTGCCACGGAACCAAATGCAAGTGTGG 300
*****

HS-1 AAAACCATTAATCCTACTAA 319 100%
HS-2 AAAACCATTAATCCTACTAA 319 98%
HS-3 AAAACCATTAATCCTACTAA 319 98%
*****

```

B

```

HS-1 MNSKLTALIFLGLVAIASCGWINEEKIQKKIDEKIGNNILGGMAKAVVHKLAKGEFQCVA 60
HS-2 MNSKLTALIFLGLVAIASCGWINEEKIQKKIDEKIGNNILGGMAKAVVHKLAKGEFQCVA 60
HS-3 MNSKLTALIFLGLVAIASCGWINEEKIQKKIDEKIGNNILGGMAKAVVHKLAKGEFQCVA 60
*****

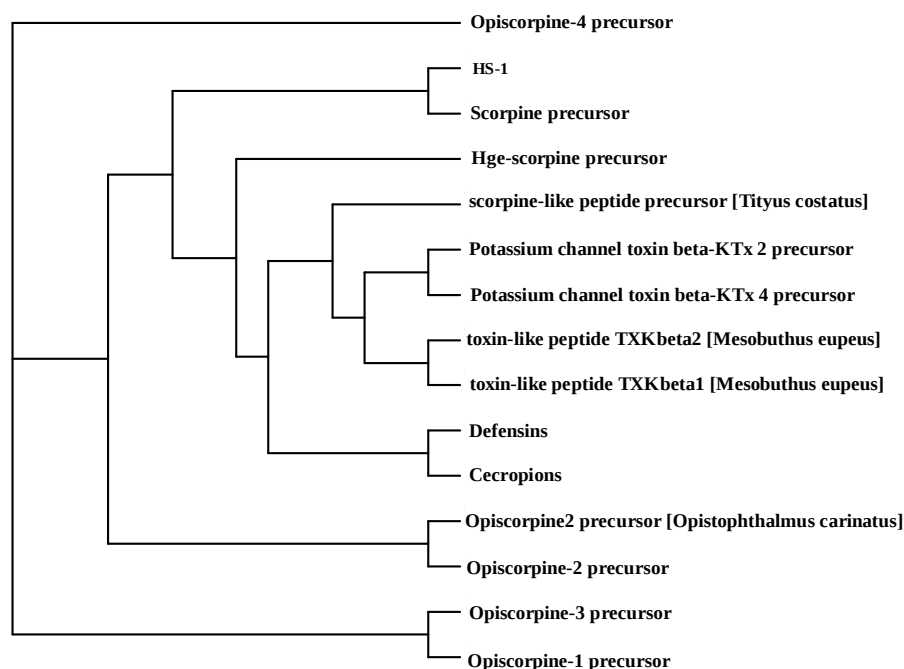
HS-1 NIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGTKCKCGKPLSY 100%
HS-2 NIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGTKCKCGKPLSY 100%
HS-3 NIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGTKCKCGKPLSY 100%
*****

```

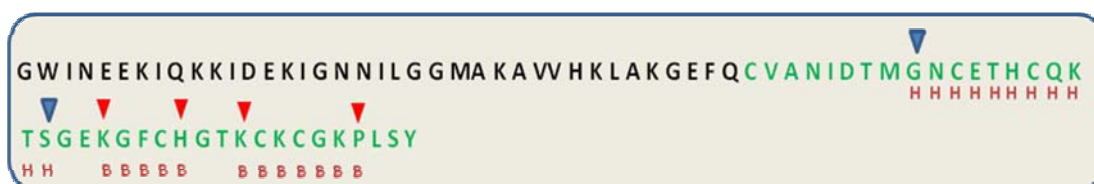
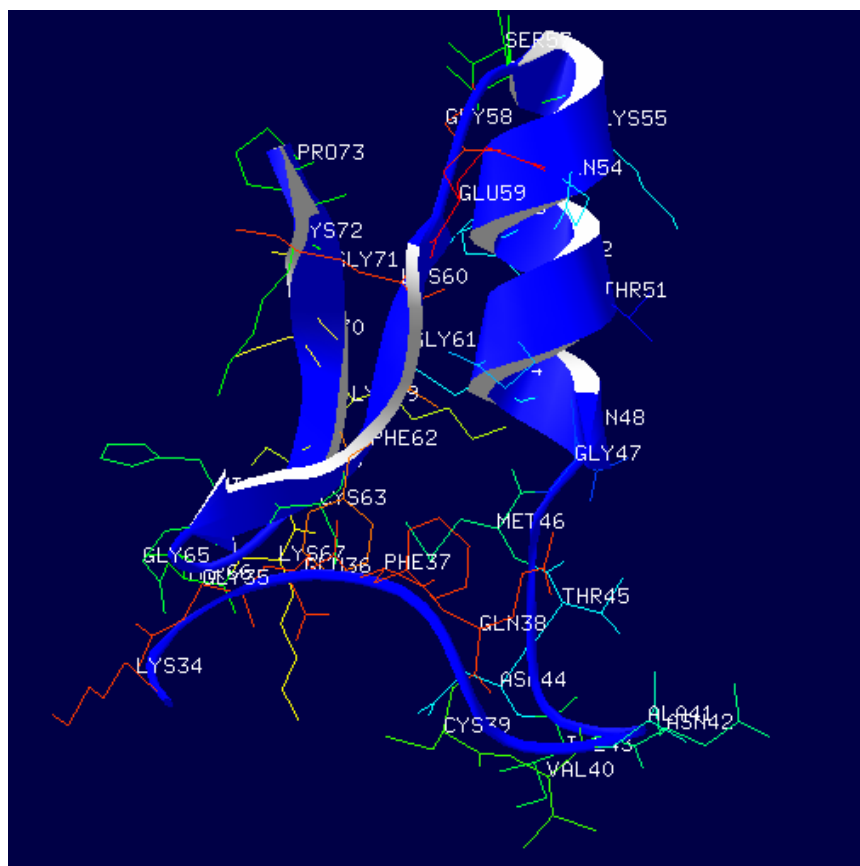
รูปที่ 4.1.12 (A) ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน exon ของยีน HS-1, HS-2 และ HS-3 และ (B) ผลการ deduce และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HS-1, HS-2 และ HS-3 ด้วยโปรแกรม ClustalW เครื่องหมาย * แสดงหน่วยที่เหมือนกัน

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
HS-1	1	MNSKLTALIF	LGLVAIASCG	WINEEKIQKK	IDEKIGNNLL	GGMAKAVVHK	LAKGEFQCVA	NIDTMGNCEY	HCQKTSGEK- GFCHG-TKCK	CGKPLSY--
PANTM Scorpine	1	MNSKLTALIF	LGLIAIAYCG	WINEEKIQKK	IDERMGNVTL	GGMAKAIVHK	MAKNEFQCMA	NMDMLGNCEK	HCQ-TSGEK- GYCHG-TKCK	CGTPLSY--
Opiscorpine2 p	1	MNNKLTALIF	LGLLAIASCK	WLNEKSIQNK	IDEKI~GKNF	LGGMAKAVVHK	KLAKNEFMCMA	ANMDPTGSCE	THCQKASGEK- GYCHG-TKCK	KCGVPLSY-
SCR2 OPICA Opiscor	1	MNNKLTALIF	HGLLAIASCK	WLNEKSIQNK	IDEKIGKNFL	GGMAKAVVHK	LAKNEFMCMA	NMDPTGSCEY	HCQKASGEK- GYCHG-TKCK	CGVPLSY--
SCR4 OPICA Opiscor	1	MNNKLTALIF	LGLLAIASCK	WLNEKSIQNK	IDEKIGKNFL	GGMAKAVVHK	LAKNEFMCVA	NIDMTKSCDT	HCQKASGEK- GYCHG-TKCK	CGVPLSY--
SCR3 OPICA Opiscor	1	MNNKLTALIF	LGLLAIASCK	WLNEKSIQNK	IDEKIGKNFL	GGMAKAVVHK	LAKNEFMCVA	NVDMTKSCDT	HCQKASGEK- GYCHG-TKCK	CGVPLSY--
SCR1 OPICA Opiscor	1	MNNKLTALIF	LGLLAIASCK	WFNEKSIQNK	IDEKIGKNFL	GGMAKAVVHK	LAKNEFMCVA	NVDMTKSCDT	HCQKASGEK- GYCHG-TKCK	CGVPLSY--
SCRP HADGE Hge-scorpian	1	MNTKLTALIF	LGLVTVSCG	WMSEKKVQGI	LDKKLPEGII	RNAKAIVHK	MAKNQFCCFA	NVDVKDCKR	HCKAEDKE-- GICHG-TKCK	CGVPISYL-
KBX2 ANDAU Potassium	1	MQRNLVLLF	LGMVALSSCG	-LREKHVQKL	VKYAVPVGTL	RTIIQTVVHK	VGKTQFCCPA	---	YQGYCDD HCQDIKKEE- GFCHG-FKCK	CGIPMGF--
KBX4 MESMA Potassium	1	MQRNLVLLF	LGMVALSSCG	-LREKHVQKL	VKYAVPEGTL	RTIIQTVVHK	LCKTQFCCPA	---	YQGYCDD HCQDIKKEE- GFCHG-FKCK	CGIPMGF--
toxin-like peptide	1	MQRNLVLLF	LGMVALSSCG	-FREKHVQRF	VKYAVPESTL	RTVLIQTVVHK	VGKTQFCCPA	---	YQGYCDD HCQDIKKEE- GFCHG-FKCK	CGIPMGF--
toxin-like pep	1	MQRNLVLLF	LGMVALSSCG	-FREKHVQRF	VKYAVPESTL	RTVLIQTVVHK	VGKTQFCCSA	---	YQGYCDD HCQDIKKEE- GFCHG-FKCK	CGIPMGF--
scorpine-like	1	MERKLAPLIF	LGMVTLASCG	-LREKHVQKL	VA-LIPNDQL	RSILKAVVHK	VAKTQFCCPA	---	YEGYNN HCQDIKKEE- GECHG-FKCK	CAKD----
1ICA: A SEQUENCE Defensins	1	-----	ATCD	LLSGTGIN--	-----	-----	-----	-----	HSACAA HCLLRGNRG- GYCNGKGVCV	CRN-----
1QP6: B SEQUENCE Cecropins	1	-----	-G	-EVEELEKK	FKEL-----	-----	-----	-----	WKGPRRG EIEELHKKTH	ELIKG-----

รูปที่ 4.1.13 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HS-1 กับ K⁺ channel blocker และ defensins ตัวอักษรสีเหลืองแสดงกรดอะมิโนชนิด cysteine



รูปที่ 4.1.14 รูปแบบ Phylogenetic tree ของ HS-1, K⁺ channel blocker และ defensins โดยวิเคราะห์จาก primary structures ด้วย ClustalW program



รูปที่ 4.1.15 โครงสร้างสามมิติของ Heteroscorpine เมื่อวิเคราะห์ด้วย DeepView Swiss-PdbViewer โดยใช้ Cys pattern ของ invertebrate defensins เป็นต้นแบบ ในกรอบล่างแสดงตำแหน่งที่แสดงโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแบบ helix (H) และ β -sheet (B)

จากการวิเคราะห์ Intron ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HS-1, HS-2 และ HS-3 (รูปที่ 4.1.16) พบว่า ลำดับบน 5' splice site ไม่แตกต่างจาก scorpine อื่น แต่ที่น่าสนใจคือ branch site นั้น แตกต่างจาก opiscorpine แต่กลับไปคล้ายกับ toxin ของแมงป่องในกลุ่ม Isometrus มากกว่า ส่วน 3' splice site ไปคล้ายกับ BmTXKS2 จากแมงป่อง *Buthus martensii* Karsch มาก ความสำคัญของ ลำดับ intron ที่เปลี่ยนไปนี้จำเป็นต้องได้รับการศึกษาต่อไป



B

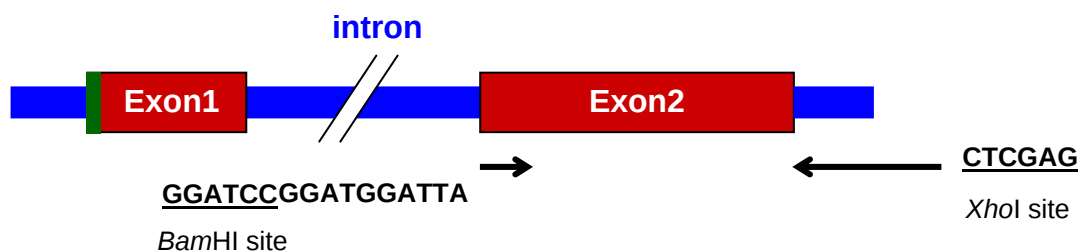
Gene	5'splice	Branch site	3'splice
HS-1	gtaagtaaaa	ctttaat	ctctttccag
HS-2	gtaagtaaaa	ttttaat	ctccttccag
HS-3	gtaagtacag	ttttaat	ctctttccag
Opiscorpine	ggaagtagtc	gtatt	ttctttccag
KTX2	gtaattacga	cattaat	aatattttag
BmTXKS2	gtaagttaat	ctttaat	ttaaatttag
Consensus	gtaagtnnnn	ynttaat	nnnatttttag

รูปที่ 4.1.16 ผลการเปรียบเทียบจุดสำคัญ ๆ บน intron ของ HS-1, HS-2 และ HS-3 เปรียบเทียบกับ toxin จากแมงป่องชนิดอื่น ๆ (Opiscorpine จากแมงป่องแอฟริกา *Opisthophthalmus carinatus* ส่วน KTX2 จากแมงป่องในออสเตรเลีย *Androctonus australis* และ BmTXKS2 จากแมงป่อง *Buthus martensii*)

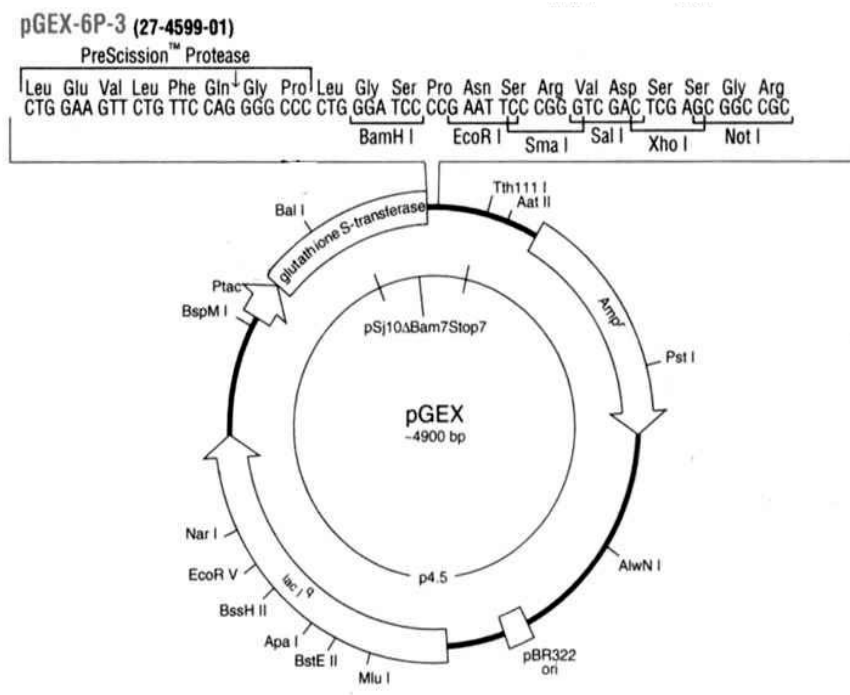
4.1.4 การสร้างยีน *recombinant Heteroscorpine-1 (recHS-1)* และการผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน *recombinant HS-1 (recHS-1)*

4.1.4.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ และ plasmid construction

เริ่มจากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Forward primer (HSF20Bam) ที่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Bam*HI อยู่เหนือ Gly codon GGA คือ 5'-GGA TCC GGA TGG ATT AAT GAA GAG AAG ATA CAA AAG-3' (ขีดเส้นใต้ คือตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Bam*HI) ส่วน reverse primer (HSR6Xho) มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Xho*I อยู่ห่างจาก stop codon TAA ไป 18 หน่วย คือ 5'-CTC GAG GTC CCC CTT TGG CTG CAA TTA-3' (ขีดเส้นใต้ คือตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Xho*I) (รูปที่ 4.1.17) ปฏิกิริยา PCR กระทำที่ 94 °C นาน 5 นาที เป็น initial denaturing temperature ตามมาด้วย 30 รอบของ denaturation ที่ 94 °C นาน 30 วินาที, annealing ที่ 55 °C นาน 30 วินาที และ elongation ที่ 72 °C นาน 30 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย คือ elongation ที่ 72 °C นาน 7 นาที จากนั้นสร้าง recombinant gene ด้วย pGEX-6P-3 expression vector ขนาด 4900 bp (รูปที่ 4.1.18) และ GST Gene Fusion System (Pharmacia Biotech) โดย PCR product จะถูกชะออกจาก agarose gel และถูกแทรกเข้าไปใน cloning region ของ pGEX-6P-3 vector จากนั้นนำ construction ที่เตรียมได้ transform เข้าสู่ *E. coli* strain JM109 แล้วคัดเลือกบน medium ด้วย ampicillin



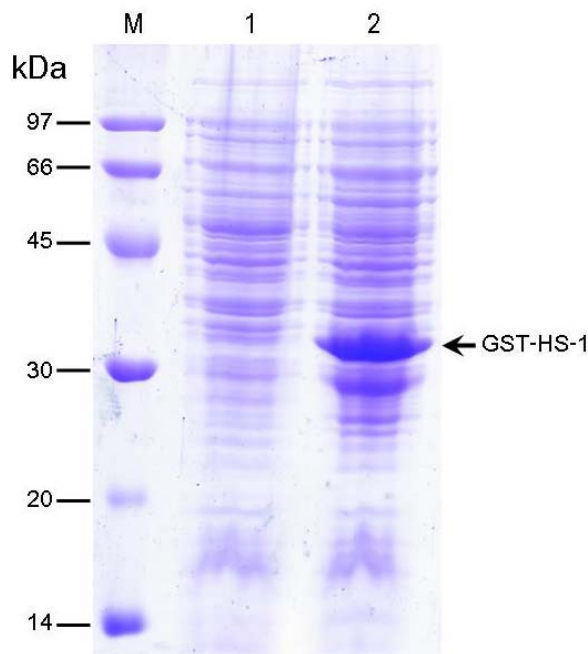
รูปที่ 4.1.17 Primer สำหรับยีน *HS-1* (ไม่มี leading sequence)



รูปที่ 4.1.18 pGEX expression vector จะเห็นตำแหน่งแทรกขั้วยีน *HS-1* บริเวณ multicloning site ระหว่างตำแหน่งตัดของ BamHI และ XhoI

4.1.4.2 การกระตุ้นการแสดงออกของยีน *HS-1* ใน *E. coli*

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่รับเอาพลาสมิดที่มียีน *HS-1* ใน LB broth ที่มี 50 µg/ml ampicillin จนกระทั่งได้ค่า OD รว 0.1 ที่ 600 nm ถ่ายเชื้อลงใน LB broth ที่มี 0.4 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน แล้วเลี้ยงต่อจนกระทั่งได้ค่า OD ที่ 600 nm รว 0.7-1.0 ทำการปั่นเก็บเชื้อและตรวจสอบการแสดงออกด้วย 13% SDS-PAGE (รูปที่ 4.1.19) จะเห็นว่า ภายหลังการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออก พบโปรตีน recombinant GST-Heteroscorpine-1 (recGST-HS-1) ขนาดประมาณ 33 kDa (รูปที่ 4.1.19) จากนั้นแยกบริสุทธิ์โปรตีนด้วย Glutathione sepharose bead และตัด GST ด้วยเอนไซม์ PreScission Protease® แล้วตรวจสอบด้วย 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE พบแถบโปรตีน recHS-1 หลังตัดด้วยเอนไซม์ มีขนาดราว 7 kDa (รูปที่ 4.1.20 lane 4)



รูปที่ 4.1.19 โปรตีน recombinant GST-Heteroscorpine-1 (GST-HS-1) ใน *E. coli* จากการแยกด้วย 13% Tris-glycine SDS-PAGE (M คือ marker, lane 1 คือ ก่อนการเหนี่ยวนำ และ lane 2 คือ หลังการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนด้วย IPTG)

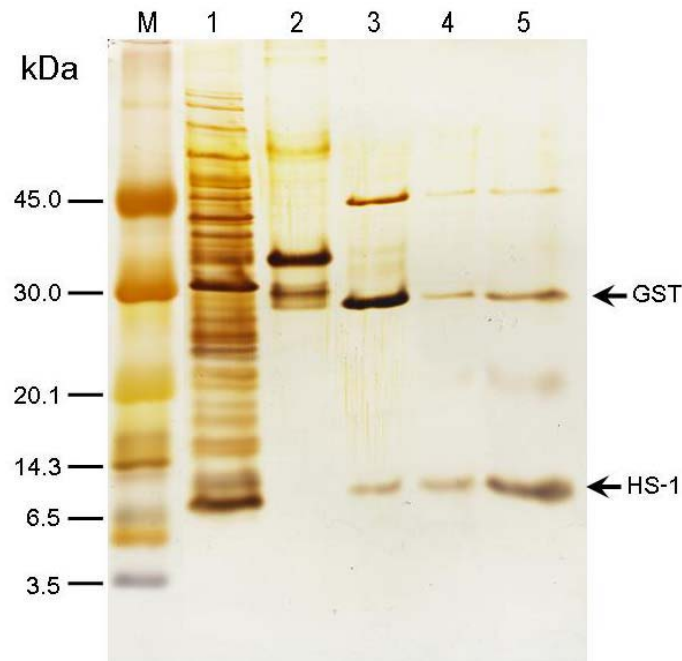
4.1.4.3 การทำ refold ของโปรตีน recHS-1

นำโปรตีน recHS-1 ที่แยกบริสุทธิ์ได้มาทำ refold เพื่อให้ได้ activity กลับคืนมา โดยละลายโปรตีนใน denaturation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 M guanidine-HCl, 5 mM EDTA) แล้วนำไปต้มในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น เจือจางใน renaturation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Triton X-100, 8 mM reduced glutathione, 1 mM oxidized glutathione, 0.5 mM PMSF, 0.3 M arginine) แล้วนำมากำจัดเกลือออก (desalting) ด้วย PD-10 Desalting column (GE Healthcare, UK) ตรวจสอบโปรตีนหลังการทำ refolding ด้วย 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 7 kDa ที่ตำแหน่งเดียวกับ recHS-1 (รูปที่ 4.1.20 lane 5)

4.1.4.4 การผลิตแอนติบอดีต้านพิษแมงป่องและ recHS-1

เพื่อทำการตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีน recHS-1 และ refolded HS-1 ต่อ anti-crude scorpion venom antibody และ anti-HS-1 antibody จึงจำเป็นต้องสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ crude venom และ recHS-1 เริ่มต้นโดยจากการนำน้ำพิษมากระตุ้นภูมิในหนูถีบจักร โดยเว้นระยะในการฉีดกระตุ้นทุก 2 สัปดาห์ ทำการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดย coat หลุมของ ELISA plate ด้วย 1 µg พิษแมงป่อง ภายหลังจาก block ด้วย skim milk แล้ว pre-immunized serum หรือ Immunized serum ถูกเติมลงในหลุมที่ค่าการเจือจางต่าง ๆ กัน จากนั้น ตรวจสอบการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดีด้วย anti-mouse IgG linked with alkali phosphatase และ *p*-nitrophenyl phosphate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm พบว่าให้ค่าไตเตอร์ราว 1: 1000 (ตารางที่ 4.1.6) จากนั้น ตรวจสอบความจำเพาะของ

แอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี Western immunoblotting พบว่า แอนติบอดีจับได้กับแถบโปรตีนหลายแถบ ที่ค่าการเจือจาง 1:100 (รูปที่ 4.1.21) ส่วน anti-recHS-1 antibody นั้นใช้โปรตีนที่ผลิตได้จาก E.coli กระตุ้นในหนูถีบจักร แล้วตรวจไตเตอร์ด้วยวิธี ELISA (ตารางที่ 4.1.7) พบว่าให้ค่าไตเตอร์ราว 1: 1000 เช่นกัน และยังให้ความจำเพาะสูงต่อ recHS-1 เมื่อตรวจด้วยวิธี Western Immunoblotting (ผลการทดลองไม่ได้แสดงไว้)



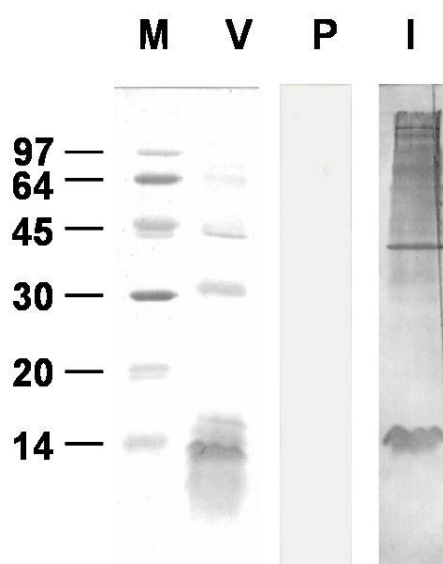
รูปที่ 4.1.20 ผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีน recGST-HS-1 และตรวจสอบด้วย 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE (M คือ marker, lane 1 คือ supernatant ก่อนตัดด้วยเอนไซม์, 2 คือ bead ก่อนตัดด้วยเอนไซม์, 3 คือ bead หลังตัดด้วยเอนไซม์, 4 คือ supernatant หลังตัดด้วยเอนไซม์ และ 5 คือ refolded HS-1)

ตารางที่ 4.1.6 ผลการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อน้ำพิษแมงป่องช้าง (anti-crude scorpion venom antibody) ด้วยวิธี ELISA

	pre-immunized serum	Immunized serum		
ค่าการเจือจาง	1:10	1:10	1:100	1:1000
หนูตัวที่ 1	-0.001	0.163	0.140	0.071
หนูตัวที่ 2	-0.003	0.160	0.149	0.080
หนูตัวที่ 3	-0.001	0.161	0.137	0.103

ตารางที่ 4.1.7 ผลการตรวจหาค่าไตเตอร์ของ anti-recHS-1 antibody ด้วยวิธี ELISA

	pre-immunized serum	Immunized serum		
ค่าการเจือจาง	1:10	1:10	1:100	1:1000
หนูตัวที่ 1	-0.002	0.233	0.163	0.150



รูปที่ 4.1.21 การตรวจสอบความจำเพาะของ anti-crude scorpion venom antibody ด้วยวิธี Western immunoblotting โดยนำพิษแมงป่องมาแยกด้วย SDS-PAGE แล้ว transfer ไปยังแผ่น nitrocellulose นำไปบ่มกับ immunized serum ของหนู (lane I) ที่ค่าความเจือจาง 1:100 ส่วน lane V = น้ำพิษของแมงป่องช้าง, lane P = Preimmunized serum

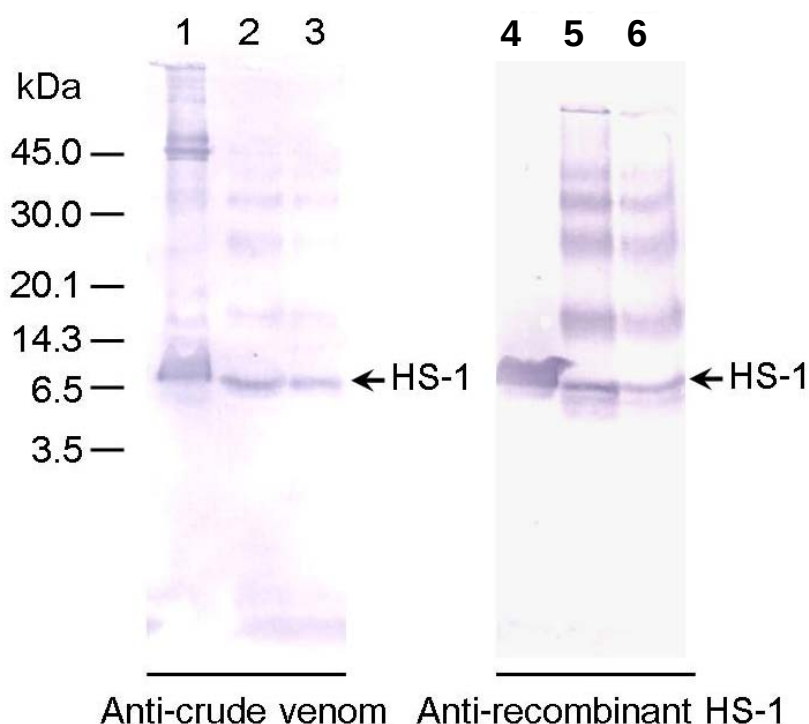
เมื่อนำ anti-recHS-1 antibody มาตรวจฤทธิ์ต้านพิษของแมงป่องช้างในจิ้งหรีด (ตารางที่ 4.1.8) พบว่า แอนติบอดีสามารถต้านฤทธิ์ของแมงป่องช้าง โดยสามารถเพิ่มค่า paralyzed dose 50 (PD₅₀) และเมื่อใช้สัดส่วนของน้ำพิษต่อซีรัมเท่ากัน anti-crude venom antibody สามารถลดความเป็นพิษของน้ำพิษของแมงป่องช้างได้ดีกว่า anti-recHS-1 antibody

ตารางที่ 4.1.8 แสดง neutralization assay ของ anti-recHS-1 antibody ด้านต่อน้ำพิษของแมงป่องช้างในจิ้งหรีด

	PD ₅₀ (microgram per g body weight)
crude venom	11
crude venom + anti-crude venom antibody	90
crude venom + anti-recHS-1 antibody	34

4.1.4.5 การตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีน recHS-1 และ refolded HS-1 ต่อ anti-crude scorpion venom antibody และ anti-HS-1 antibody

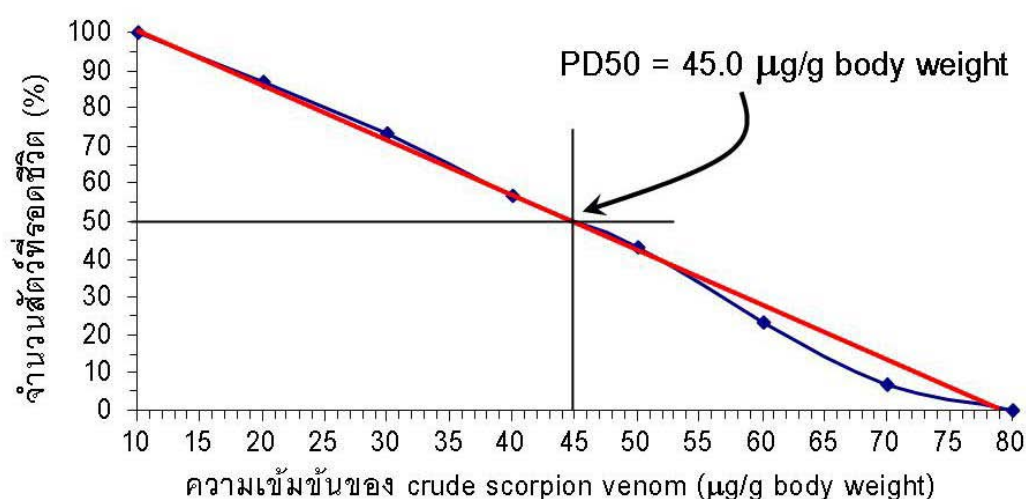
เพื่อเป็นการตรวจสอบโครงสร้างเบื้องต้นของโปรตีน recHS-1 ว่าน่าจะยังคล้าย native protein หรือไม่ จึงได้นำโปรตีน recHS-1 และ refolded HS-1 มาแยกด้วย SDS-PAGE จากนั้นทำ Western immunoblotting กับ anti-crude scorpion venom antibody และ anti-HS-1 antibody ที่ค่าการเจือจาง 1:100 จะเห็นได้ว่า anti-crude scorpion venom antibody สามารถจับกับ recHS-1 และ refolded HS-1 ได้ (รูปที่ 4.1.22 lane 2 และ 3) โดยพบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 7 kDa ตรงกับที่พบใน crude scorpion venom และในทางกลับกัน anti-HS-1 antibody ก็สามารถจับกับ HS-1 ใน crude scorpion venom ได้เช่นกัน โดยพบแถบโปรตีนที่มีขนาด 7 kDa ตรงกับแถบโปรตีน recHS-1 และ refolded HS-1 (รูปที่ 4.1.22 lane 5 และ 6) โดยเฉพาะใน crude scorpion venom (รูปที่ 4.1.22 lane 4) ไม่พบการจับข้าม (cross reaction) กับแถบโปรตีนอื่น ๆ เลย แสดงว่า โปรตีน HS-1 ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียมีโครงสร้างใกล้เคียงกับโปรตีน native HS-1 ใน crude scorpion venom



รูปที่ 4.1.22 ความจำเพาะของโปรตีน crude scorpion venom, recHS-1 และ refolded HS-1 ต่อ anti-crude scorpion venom antibody และ anti-HS-1 antibody ที่ค่าการเจือจาง 1:100 (lane 1 และ 4 คือ crude scorpion venom, lane 2 และ 5 คือ recHS-1 และ lane 3 และ 6 คือ refolded HS-1)

4.1.4.6 การทดสอบค่า paralytic dose 50 (PD₅₀) ของ crude scorpion venom, recHS-1 และ refolded HS-1 ในหนอนนก (*Tenebrio molitor* L.) และจิ้งหรีด (*Gryllus* sp.)

เพื่อตรวจสอบ activity ของ refolded HS-1 จึงได้ทำการฉีด crude scorpion venom, recHS-1 และ refolded HS-1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในหนอนนกที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.10 ± 0.01 กรัม จากนั้นนับจำนวนหนอนนกที่รอดชีวิตหลังจากเวลาผ่านไป 30 นาที โดยใช้ 1xPBS buffer, pH 7.4 สำหรับกลุ่มควบคุม พบว่า ได้ค่า PD₅₀ ของ crude scorpion venom ในหนอนนกเท่ากับ 45.0 µg/กรัมน้ำหนักตัว 1 กรัม (รูปที่ 4.1.23) ส่วนค่า PD₅₀ ของ recHS-1 และ refolded HS-1 ได้ค่ามากกว่า 150.0 และเท่ากับ 51.5 µg/กรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1.9) และเมื่อทดสอบกับจิ้งหรีดก็ให้ผลไปในทำนองเดียวกัน (ตารางที่ 4.1.10) แสดงว่า recHS-1 มี activity ลดลงมาก ต่อเมื่อนำไปทำ refolding จึงจะได้ activity กลับคืนมา สาเหตุเพราะโครงสร้างของ HS-1 ต้องการ disulfide bond ที่ถูกต้อง การแสดงออกของ HS-1 ในแบคทีเรียอาจทำให้ disulfide bond ที่ได้ไม่ครบหรือผิดไป ส่งผลให้ activity ของ HS-1 หดไป จำเป็นต้อง refold เสียใหม่ จึงจะได้ activity กลับคืนมา



รูปที่ 4.1.23 การหาค่า PD₅₀ ของ crude scorpion venom ในหนอนนก (*Tenebrio molitor* L.)

ตารางที่ 4.1.9 ค่า PD₅₀ ของ crude scorpion venom, recHS-1 และ refolded HS-1 ในหนอนนก

โปรตีน	PD ₅₀ (µg/กรัมน้ำหนักตัว 1 กรัม)
crude scorpion venom	45.0
recHS-1	>150.0
refolded recHS-1	51.5

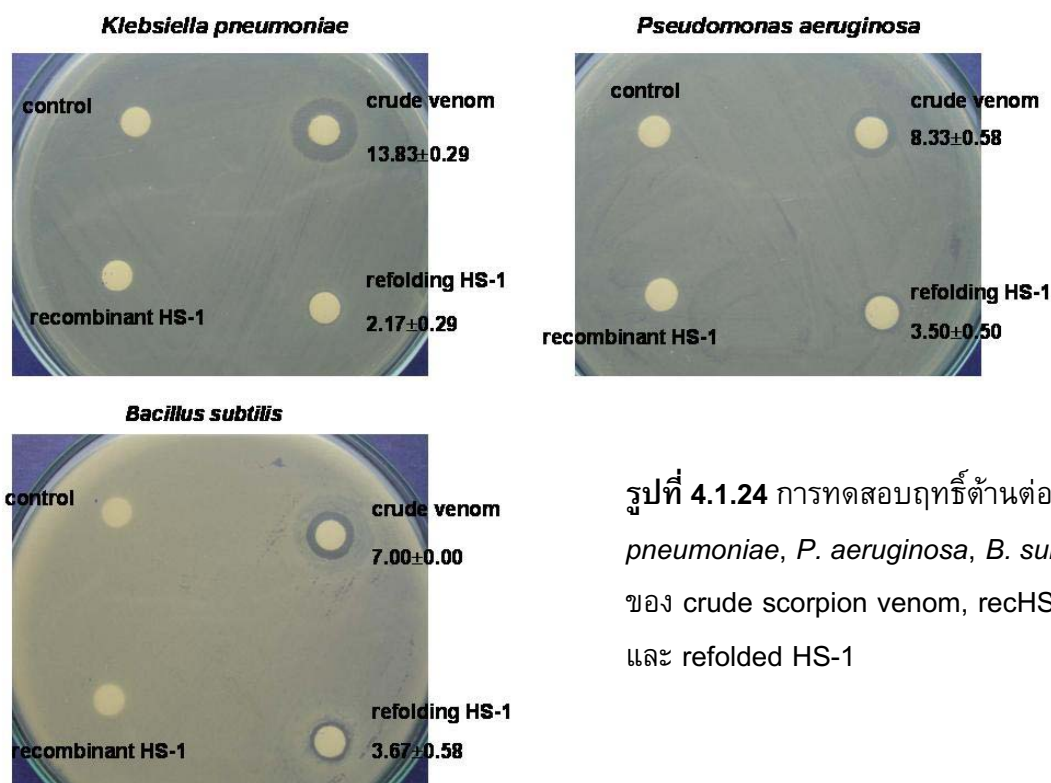
ตารางที่ 4.1.10 ค่า PD₅₀ ของ crude scorpion venom, recHS-1 และ refolded HS-1 ในจังหวัด

	PD ₅₀ (μg/กรัมน้ำหนักตัว 1 กรัม)
crude scorpion venom	0.67
recHS-1	>186
refolded recHS-1.	about 24

4.1.4.7 การตรวจสอบฤทธิ์ของ refolded HS-1 โดยดูฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี disc diffusion method

การตรวจสอบฤทธิ์ของ refolded HS-1 โดยดูฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี disc diffusion method โดยใช้ Mueller–Hinton agar plate ที่ 35 °C (รูปที่ 4.1.24 และ ตารางที่ 4.1.11) ทำการวัด clear zone ที่ได้ พบว่า refolded HS-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis*

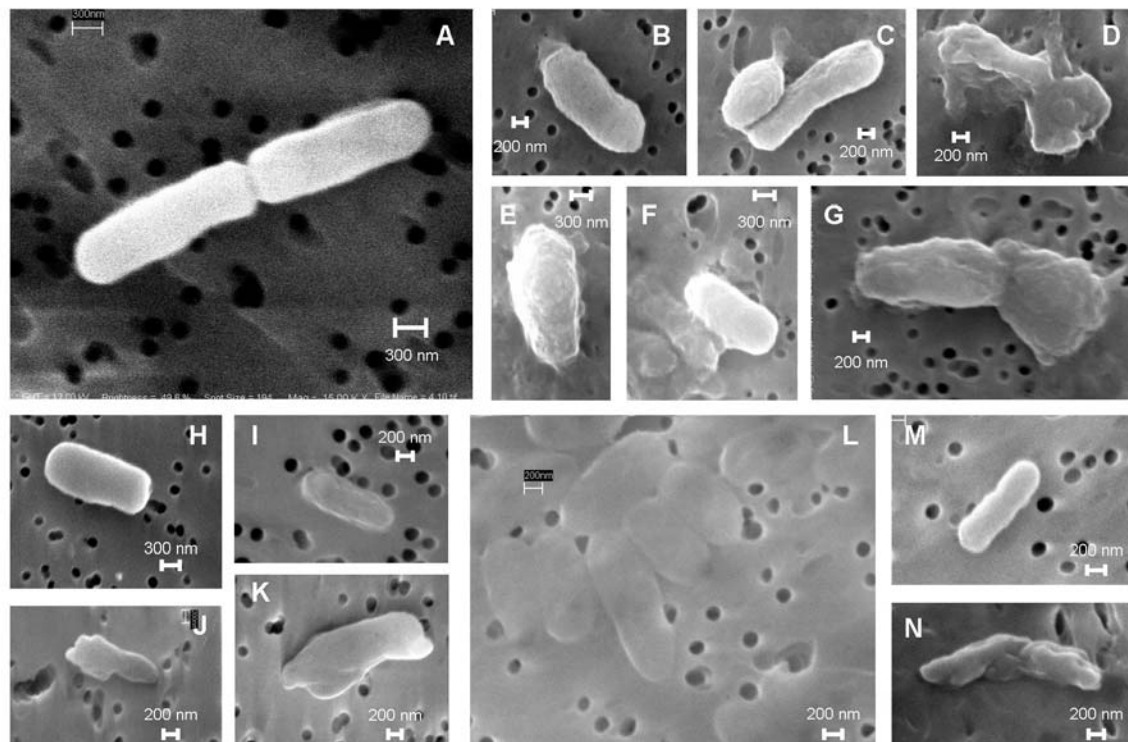
ต่อมาได้ทำการตรวจรูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 4.1.25) พบว่า *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* ตอบสนองต่อ refolding HS-1 โดยมีรูปร่างบิดเบี้ยวไปจากปกติ คล้ายกับที่เกิดจากการใช้ crude venom



รูปที่ 4.1.24 การทดสอบฤทธิ์ต้านต่อ *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ของ crude scorpion venom, recHS-1 และ refolded HS-1

ตารางที่ 4.1.11 สรุปค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ Antibacterial activity ของ recHS-1 และ refolding HS-1 ต้านต่อเชื้อ *B. subtilis*, *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* ด้วย disc diffusion method

	control	crude venom	recHS-1	refolding HS-1
<i>K. pneumoniae</i>	0.00	13.83±0.29	0.00	2.17±0.29
<i>P. aeruginosa</i>	0.00	8.33±0.58	0.00	3.50±0.50
<i>B. subtilis</i>	0.00	7.00±0.00	0.00	3.67±0.58

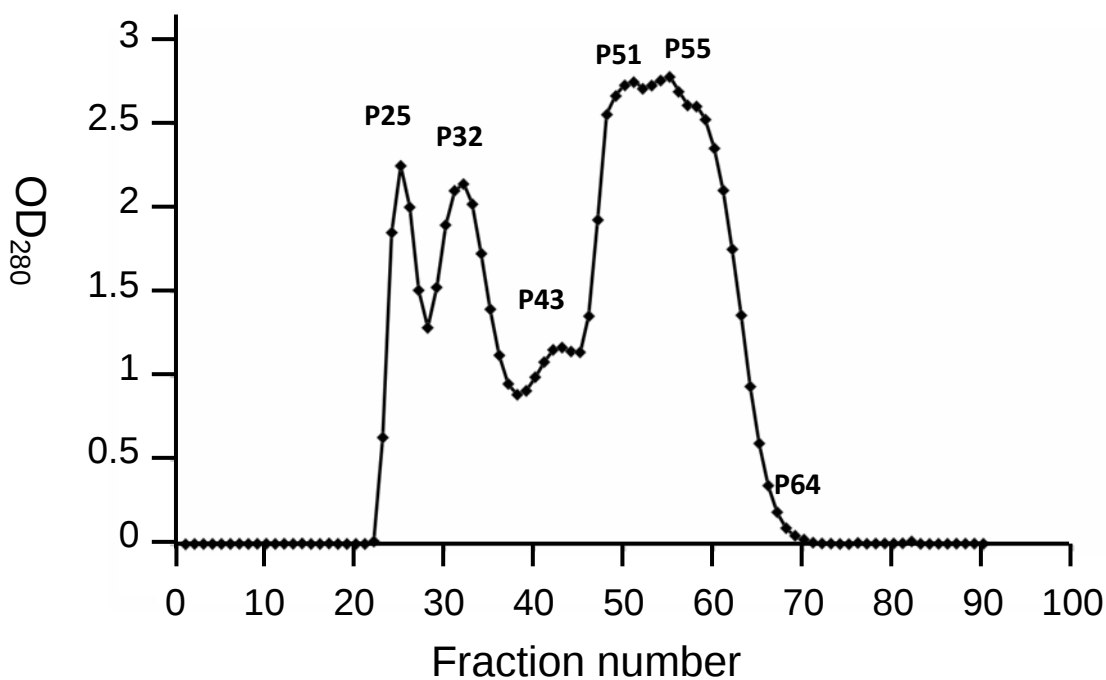


รูปที่ 4.1.25 รูปถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเชื้อ *Bacillus subtilis* (A-G), *Klebsiella pneumoniae* (H-K) และ *Pseudomonas aeruginosa* (L-N) เมื่อไม่ได้รับสารใด ๆ (A, H และ L) หรือได้รับน้ำพิษแมงป่องช้าง (*H. laoticus*) (B-D, I และ M) หรือได้รับ refolding HS-1 (E-G, J-K และ N) จากการทดสอบด้วย disc diffusion method แถบขีดแสดงขนาดมีหน่วยเป็นนาโนเมตร

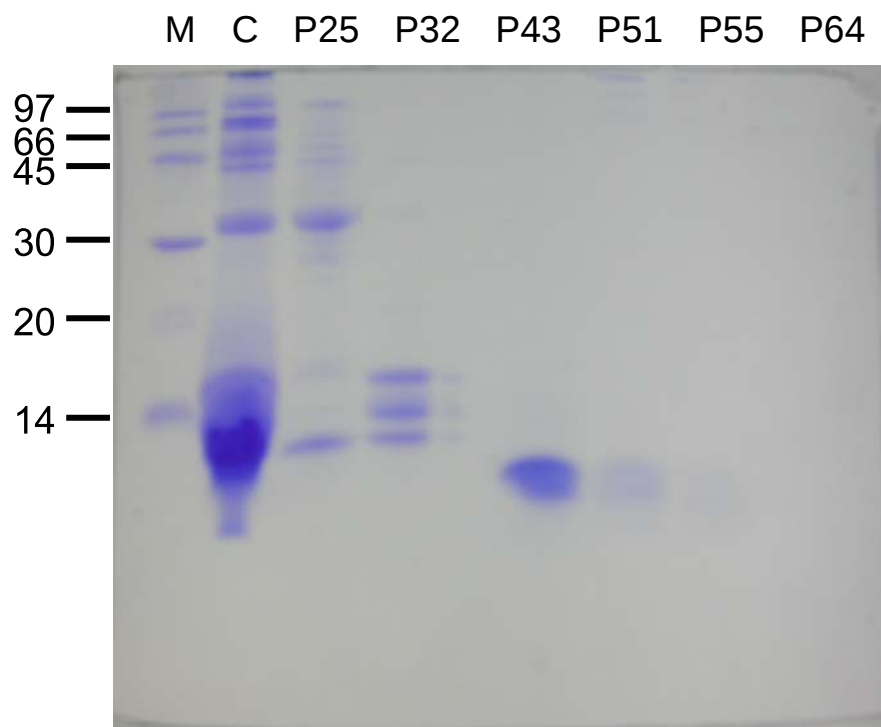
4.1.5 การทำบริสุทธิ์, หาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีน Heteromtoxin (HmTx) ในน้ำพิษแมงป่องช้าง

4.1.5.1 การทำบริสุทธิ์โปรตีน Heteromtoxin (HmTx)

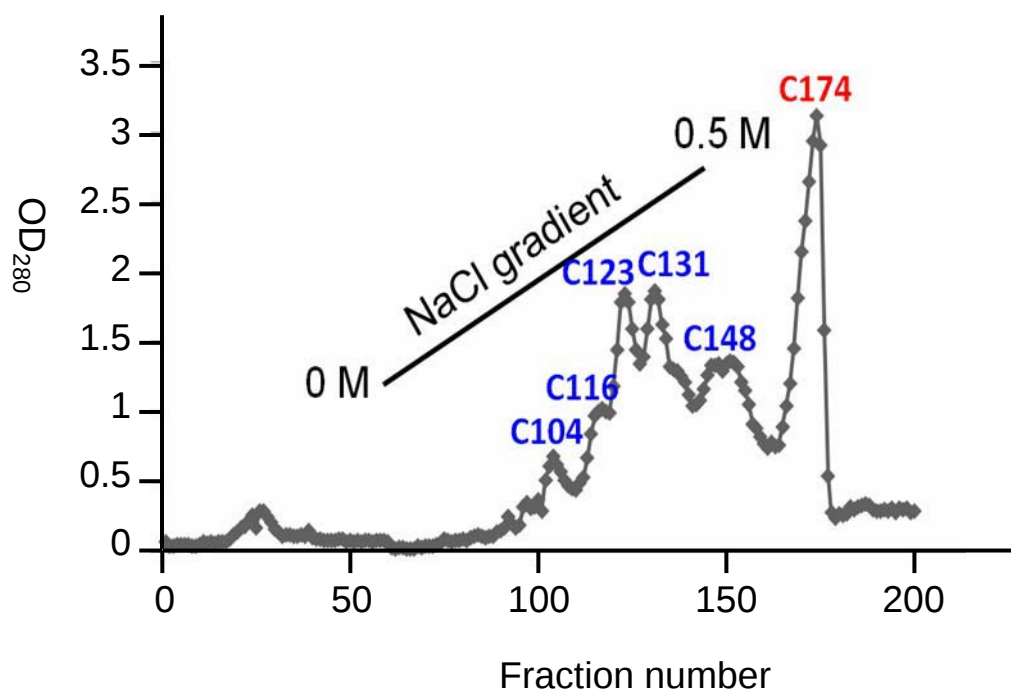
การทำบริสุทธิ์ HmTx เริ่มด้วยคานำน้ำพิษแมงป่องช้างมาผ่าน Sephadex G50 gel filtration column chromatography โดยนำพิษแมงป่อง 50 มิลลิกรัม มา load บน column จากนั้นล้าง แล้ว equilibrate และ elute ด้วย 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 (รูปที่ 4.1.26) วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 4.1.27) พบว่ายังไม่บริสุทธิ์ จึงนำเอา fraction หมายเลข 28-37 มารวมกันแล้วนำไปผ่าน CM Toyopearl cationic column chromatography โดยเริ่มจาก equilibrate คอลัมน์ด้วย 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 แล้ว load ด้วย pooled fraction หมายเลข 28-37 ที่ได้จาก gel filtration chromatography จากนั้น elute ด้วย NaCl gradient (0 to 0.5 M) ใน 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 ได้ profile (รูปที่ 4.1.28) แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 4.1.29) พบว่า fraction หมายเลข 174 น่าจะใช้ HmTx บริสุทธิ์



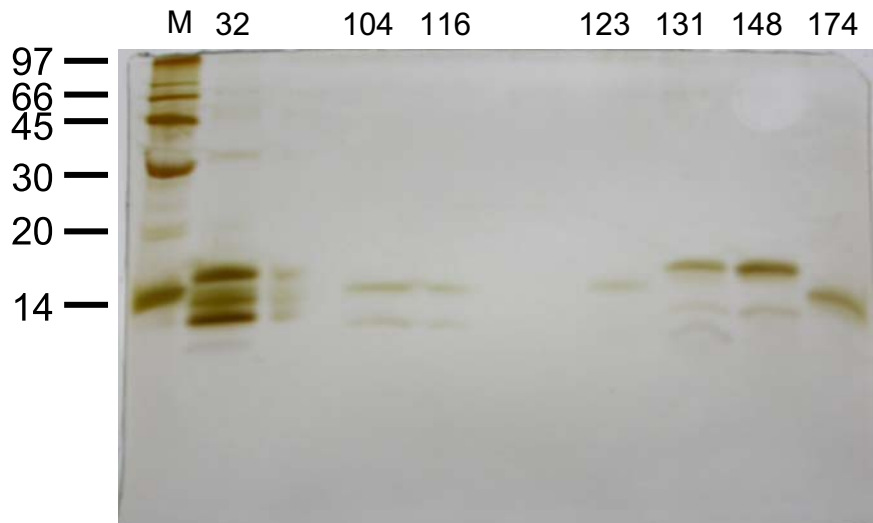
รูปที่ 4.1.26 Chromatogram ของการแยกบริสุทธิ์น้ำพิษแมงป่องช้าง ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-50 gel filtration chromatography



รูปที่ 4.1.27 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแต่ละ fraction จาก Sephadex G-50 gel filtration column ด้วย 16% SDS-PAGE (M คือ Marker, C คือ Crude venom, P คือ peak number)



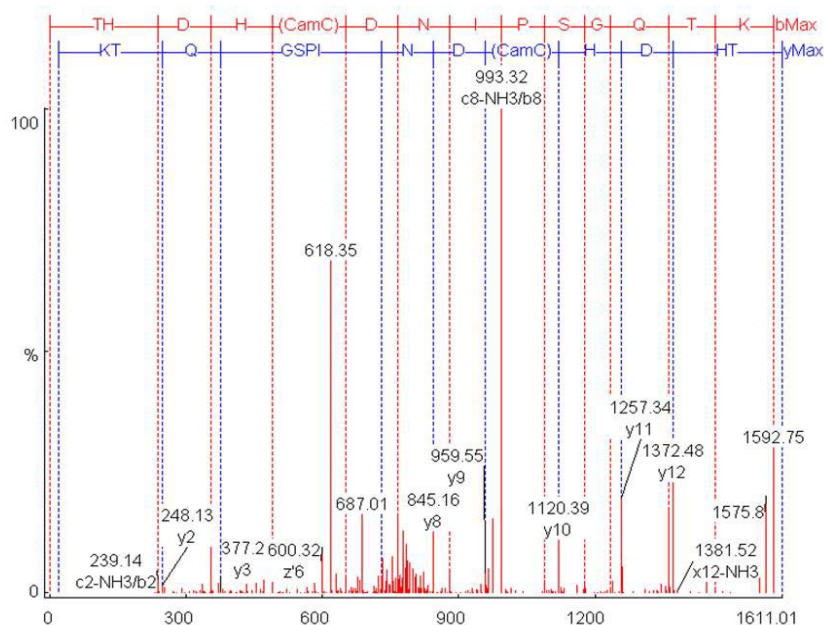
รูปที่ 4.1.28 Elution profile จาก CM Toyopearl cationic column chromatography ภายหลังจาก fraction 28-37 จาก gel filtration มา load แล้ว elute ด้วย 0-0.5 M NaCl gradient



รูปที่ 4.1.29 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแต่ละ fraction จาก CM Toyopearl cationic column ด้วย 16% Tris-tricine SDS-PAGE (M คือ Marker, C คือ Crude venom, ตัวเลขคือ peak number)

4.1.5.2 การหาลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ Heteromtoxin (HmTx)

นำเอา fraction หมายเลข 174 บริสุทธิ์ ส่งไปวิเคราะห์ด้วย liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ที่สถาบันจีโนม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) พบว่า ได้ลำดับกรดอะมิโนออกมาบางส่วนคือ RTHDHCDNIPSGQTKY (รูปที่ 4.1.30) และมีความคล้ายคลึงกัน Imperatoxin ของแมงป่องจักรพรรดิ (*Pandinus imperator*) ในทวีปแอฟริกา (ตารางที่ 4.1.12) จึงตั้งชื่อโปรตีนนี้ว่า **Heteromtoxin (HmTx)** ซึ่งเป็น toxin ที่พบในน้ำพิษแมงป่องช้าง (*Heterometrus*)



รูปที่ 4.1.30 ผลการวิเคราะห์ fraction 174 จาก CM Toyopearl 650M cationic column chromatogram ด้วย LC-MS/MS

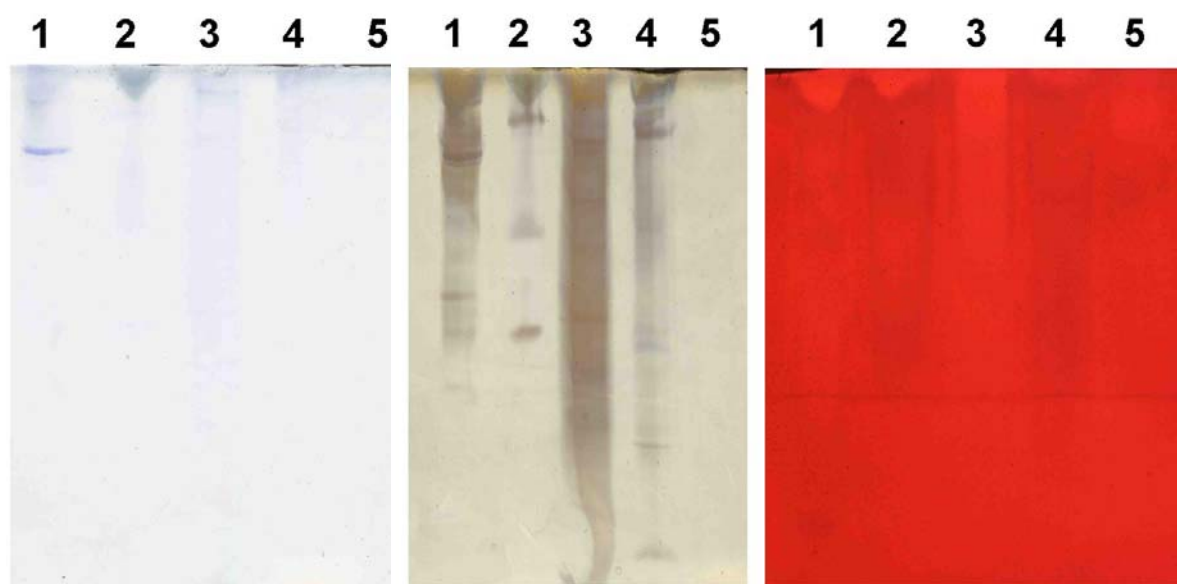
ตารางที่ 4.1.12 ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนด้วย LC-MS/MS และวิธี De novo ของโปรตีน fraction 174 จาก CM Toyopearl 650M cationic column chromatogram

Referent scan	Peptide	Score XC	Source
gi 37079101 sp P59888 IPTXI_PA NIM Imperatoxin-1 precursor (Imperatoxin I) (IpTxi) (Imperatoxin inhibitor) [Contains: Imperatoxin-1 large subunit (Imperatoxin I large subunit); Imperatoxin-1 small subunit (Imperatoxin I small subunit)]	R.THDHCDNIPSGQTK.Y	10.14	Pandinus imperator (emperor scorpion)

4.1.5.3 การตรวจสอบ activity ของ Heteromtoxin (HmTx)

Imperatoxin (IpTx) เป็น peptide toxin ในน้ำพิษของแมงป่องจักรพรรดิในแอฟริกา (African emperor scorpion) *Pandinus imperator* ประกอบด้วย 2 subtypes คือ Imperatoxin A (หรือ Imperatoxin activator) เป็น peptide toxin ซึ่งเร่งการผ่านเข้าออกของ Ca^{2+} ของ sarcoplasmic reticulum ภายในเซลล์ และ Imperatoxin I (หรือ Imperatoxin inhibitor) ซึ่งจะทำงานตรงกันข้ามกับ Imperatoxin A คือยับยั้งหรือลดการผ่านเข้าออกของ Ca^{2+} ผ่าน sarcoplasmic reticulum

สำหรับ Imperatoxin I นั้นมีน้ำหนักโมเลกุล 15 kDa โครงสร้างประกอบด้วย 2 polypeptides คือ large subunit ขนาด 104 amino acids และ smaller subunit ขนาด 27 amino acids แต่ละ subunit เชื่อมต่อกันด้วย disulfide bond และพบว่ามี Phospholipase A2 (PLA2) activity บน large subunit ดังนั้น ในครั้งนี้ จึงได้ทำการตรวจสอบ phospholipase activity ของ Heteromtoxin (HmTx) เพราะมี primary structure คล้าย Imperatoxin I ด้วยวิธี Zymographic detection เปรียบเทียบกับน้ำพิษของงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*), งูเห่า (*Naja naja siamensis*), แมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*), ต่อหลุม (*Vespa tropica*) และมดคันไฟ (*Solenopsis geminata*) โดยนำน้ำพิษของสัตว์แต่ละชนิดมา load บน 13% native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) ที่มีสารตั้งต้นของเอนไซม์ คือ 5 mg/ml phosphatidylcholine จากนั้นโปรตีนถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 25 mA ที่ 4°C แล้วเจลจะถูกย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 แล้ว destain จนกระทั่งพื้นหลังใสหรือไม่เจลกี้จะถูกบ่มกับ reaction mixture (ประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM $CaCl_2$ และ 0.12% Rhodamine 6G) พร้อมกับเขย่าเบา ๆ ข้ามคืน ซึ่งหากมี activity ของ phospholipase ก็จะสามารถพบ (รูปที่ 4.1.31) พบ phospholipase activity ของ HmTx อยู่บ้าง แต่ activity ยังต่ำกว่าพิษงูและพิษต่อหลุมอยู่มาก



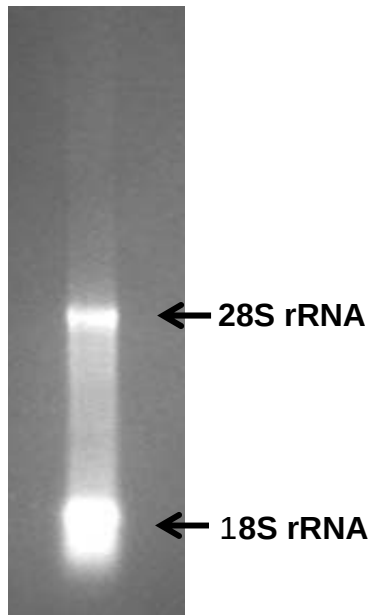
รูปที่ 4.1.31 การทดสอบ Phospholipase activity ของ HmTx ซึ่ง lane 1 คือ น้ำพิษของงูจงอาง (*O. hannah*) 5 µg, lane 2: งูเห่า (*N. n. siamensis*), 5 µg, lane 3: ต่อหลุม (*V. tropica*) 5 µg, lane 4: แมงป่องช้าง (*H. laoticus*) 5 µg, lane 5: HmTx, รูปซ้าย วิเคราะห์บน 15% Native PAGE 25 mA ที่ 4°C แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R 250 ส่วนรูปกลาง วิเคราะห์บน 15% Native PAGE 25 mA ที่ 4°C แล้วย้อมด้วยสี silver ส่วนรูปขวา วิเคราะห์บน 15% Native PAGE 25 mA ที่ 4°C แล้วย้อมด้วยสี Rhodamine 6G

4.1.5.4 การสกัด RNA จากเนื้อเยื่อต่อมพิษแมงป่องช้าง

เมื่อทราบแล้วว่า HmTx อาจจะเป็น phospholipase ดังนั้น เพื่อที่จะหาลำดับกรดอะมิโนของ HmTx เติมน้ำด้วยวิธี RT-PCR จึงได้ทำการสกัด total RNA จากส่วน telson ของแมงป่องช้าง (*H. laoticus*) ด้วย illustra RNeasy Mini RNA Isolation Kit ของบริษัท GE healthcare Bioscience ผลการสกัด total RNA ภายหลังเมื่อตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบว่า ได้แถบ RNA 2 แถบ คือ 28S และ 18S ribosomal RNA (รูปที่ 4.1.32) จึงได้นำ RNA ที่สกัดได้มาใช้เป็นแม่แบบในงาน RT-PCR

4.1.5.5 การออกแบบ primer เพื่อใช้ในการหาลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้นของ HmTx

จากข้อมูลที่ได้จากการทำ LC-MS/MS จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.1.33) ของ Imperatoxin I ของแมงป่อง *P. imperator* เป็นต้นแบบในการออกแบบ primer เพื่อใช้ในการหาลำดับกรดนิวคลีโอไทด์ของ HmTx ด้วยวิธี PCR การออกแบบ primer ใช้โปรแกรม Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) ส่วนการคำนวณหา Tm, hairpin formation, complementary, self-annealing ใช้โปรแกรม OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) และการหา primer dimer และตำแหน่งจับบน DNA ใช้โปรแกรม Primer-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ผลการออกแบบได้ primer 3 คู่ (ตารางที่ 4.1.13)



รูปที่ 4.1.32 RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อต่อมพิษ
แมงป่องช้าง เพื่อนำไปใช้เตรียม cDNA แล้วใช้เป็น
แม่แบบสำหรับทำ RT-PCR ต่อไป

Nucleotide sequence 504 bp

HIF1
 ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCAGAGAATATCCAAAGAAGAGATGGAATTCTT
 CGAAGGGAGGTGTGAACGCATGGGGGAAGCAGACGAGACTATGTGGGGAACCAAATGGT
 GTGGAAGCGGAAACGAGGCTACAGATATTTCAAGACTTGGTTACTGGAGTAATTTAGATT
 HIF3
 CGTGTTGTAGGACCCACGACCATTGTGACAATATTCCATCAGGGCAAATAAATATGGTC
 TGACGAATGAAGGAAAATACACAATGATGAACTGCAAATGCGAGACGGCATTGGAACAAT
 HIR3
 GTCTGAGAAACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCTGCTGGCTTTGTTAGAAAACTT
 ATTTTGACTTATATGGGAATGGGTGCTACAACGTGCAATGTCCCTCTCAGAGAAGATTGG
 HIR2
 CAAGAAGTGAAGAGTGTCTGATGGTGTGGCAACGTATACAGGAGAAGCTGGGTATGGT
 HIR1
 GCATGGGCGATTAACTAACTGAATGGTTAA

รูปที่ 4.1.33 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ Imperatoxin I จากแมงป่อง *P. imperator* ซึ่งแสดง primer
ที่ออกแบบได้ เพื่อนำไปใช้เพิ่มจำนวนยีน HmTx ของ *H. laoticus*

ตารางที่ 4.1.13 ผลการออกแบบ primer เพื่อใช้ในการหาลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้นของ HmTx โดยใช้ ยีนของ Imperatoxin เป็นต้นแบบ

Primer	sequence	length	%GC	Tm	Product size
1. Forward primer: HIF1	5' ATGCATACTCCAAAACACGCTA 3'	22 base	41	58	501
1. Reverse primer: HIR1	5' ACCATTCAGTTTGTGAATCGCCC 3'	23 base	43	61	
2. Forward primer: HIF2	5' AGACGAGACTATGTGGGGAAC 3'	21 base	52	54	355
2. Reverse primer: HIR2	5' ACCATCAGGACACTCTTCACTT 3'	22 base	45	53	
3. Forward primer: HIF3	5' GTAGGACCCACGACCATTG 3'	19 base	57	58	148
3. Reverse primer: HIR3	5' GGTCCCTCCATACCTCCAGT 3'	20 base	55	57	

Note: None hairpin formation, complementary, self-annealing, primer dimer

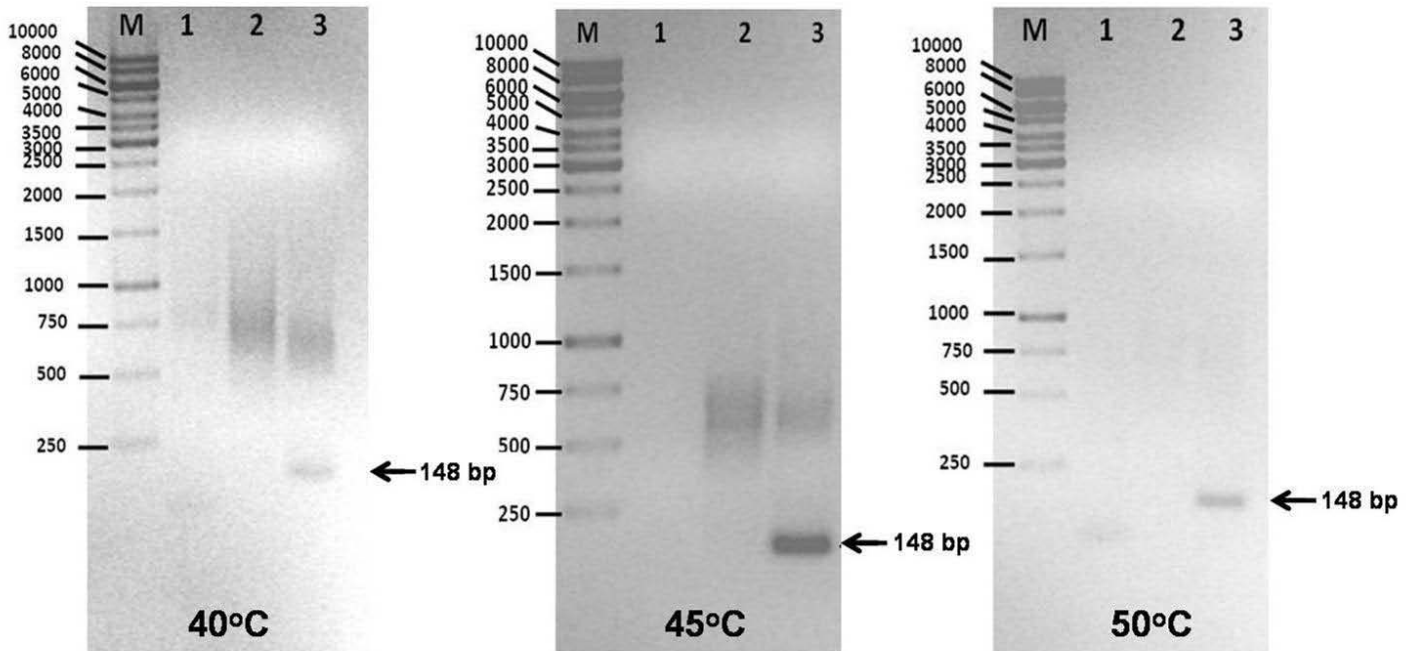
4.1.5.6 การหาลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้นของ HmTx ด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ผลการทำ RT-PCR พบแถบขนาด 148 เบส จากการใช้ primer คู่ต่าง ๆ คือ HIF1 และHIR1, HIF2 และHIR2, และ HIF3 และHIR3 (รูปที่ 4.1.34) พบว่า มีเฉพาะคู่ HIF3 และ HIR3 ที่ให้ PCR product ตรงตามที่คาดไว้ คือ 148 bp ไม่ว่าจะเพิ่ม annealing temperature เป็น 40, 45 หรือ 50 องศาเซลเซียส ก็ยังคงพบ product เช่นเดิม จึงได้นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.1.35) และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับ Imperatoxin (IpX) (รูปที่ 4.1.36) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Heteromtoxin (HmTx) เหมือนกับ IpX ถึง 88% จึงเชื่อว่าลำดับที่ได้มีความถูกต้อง

ต่อมา เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' จึงได้ทำ Rapid Amplification of 3'cDNA Ends (3' RACE) โดยใช้ mRNA เป็นแม่แบบ (รูปที่ 4.1.37) พบว่า เมื่อใช้ primer F1 คู่กับ AUAP ได้ PCR product ขนาด 656 bp และเมื่อใช้ primer F3 คู่กับ AUAP ได้ PCR product ขนาด 475 bp จึงได้นำ PCR product ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.1.38 และรูปที่ 4.1.39 และ 4.1.40) เมื่อสรุปลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อมูลทั้งหมด ได้ 648 ลำดับ และเมื่อตัดเอา untranslation region ออกไป เหลือ 504 ลำดับ (รูปที่ 4.1.41 และ 4.1.42) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HmTx, imperotoxin I และ toxin จาก *Mesobuthus tamulus* (รูปที่ 4.1.43) พบความเหมือนรวม 85%

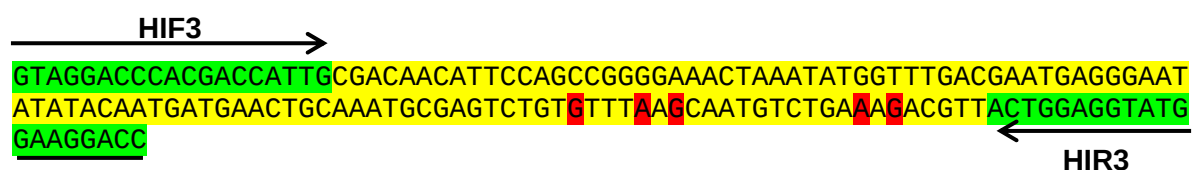
จากนั้น ทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าได้ 167 ลำดับ (รูปที่ 4.1.44) เมื่อเปรียบเทียบกับ imperotoxin I และ toxin จาก *Mesobuthus tamulus* (รูปที่ 4.1.45) พบความเหมือนประมาณร้อยละ 80

PCR products of *H. laoticus* total RNA were amplified with primer HIF1, HIR1, HIF2, HIR2 and HIF3, HIR3



Lane M: maker 1 Kb ladder, Lane 1: PCR product HIF1 and HIR1, Lane 2: PCR product HIF2 and HIR2, Lane 3: PCR product HIF3 and HIR3 on 1.2% agarose 100 volt 50 min

รูปที่ 4.1.34 ผลจากการทำ RT-PCR ด้วยการใช้ mRNA เป็นแม่แบบ ด้วย primer คู่ต่าง ๆ คือ HIF1 และ HIR1, HIF2 และ HIR2, และ HIF3 และ HIR3 ที่ annealing temperature 40, 45 และ 50°C



รูปที่ 4.1.35 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Heteromtoxin (HmTx) ขนาด 148 bp ที่ได้จากการทำ DNA sequence ของ PCR product จากรูปที่ 4.1.34 ลูกศรแสดงบริเวณจับของ primer

ClustalW2 alignment

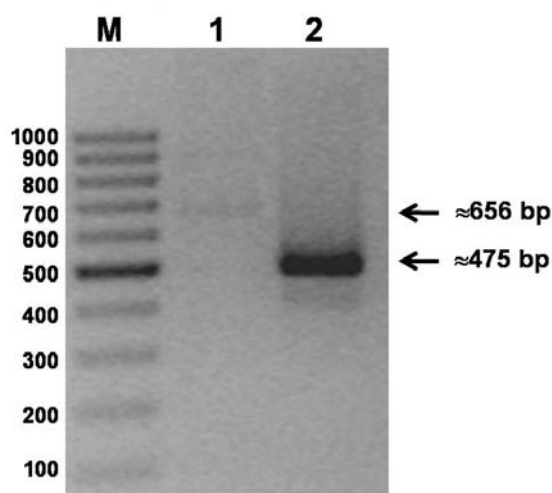
SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 ImperatoxinI	504	2 Heteromtoxin	148	88

ImperatoxinI	ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCAGAGAATATCCRAAGAAGAGATGGAATTCTTCGAA	60
Heteromtoxin	-----	
ImperatoxinI	GGGAGGTGTGAACGCATGGGGGAAGCAGACGAGACTATGTGGGGAACCAATGGTGTGGA	120
Heteromtoxin	-----	
ImperatoxinI	AGCGGAACGAGGCTACAGATATTTCAGAACTTGGTTACTGGAGTAATTTAGATTCTGTGT	180
Heteromtoxin	-----	
ImperatoxinI	TGTAGGACCCACGACCATTGTGACAATATTCCATCAGGGCAAACATAAATATGGTCTGACG	240
Heteromtoxin	-GTAGGACCCACGACCATTGCGACAACATTCCAGCCGGGGAAACATAAATATGGTTTGACG	59

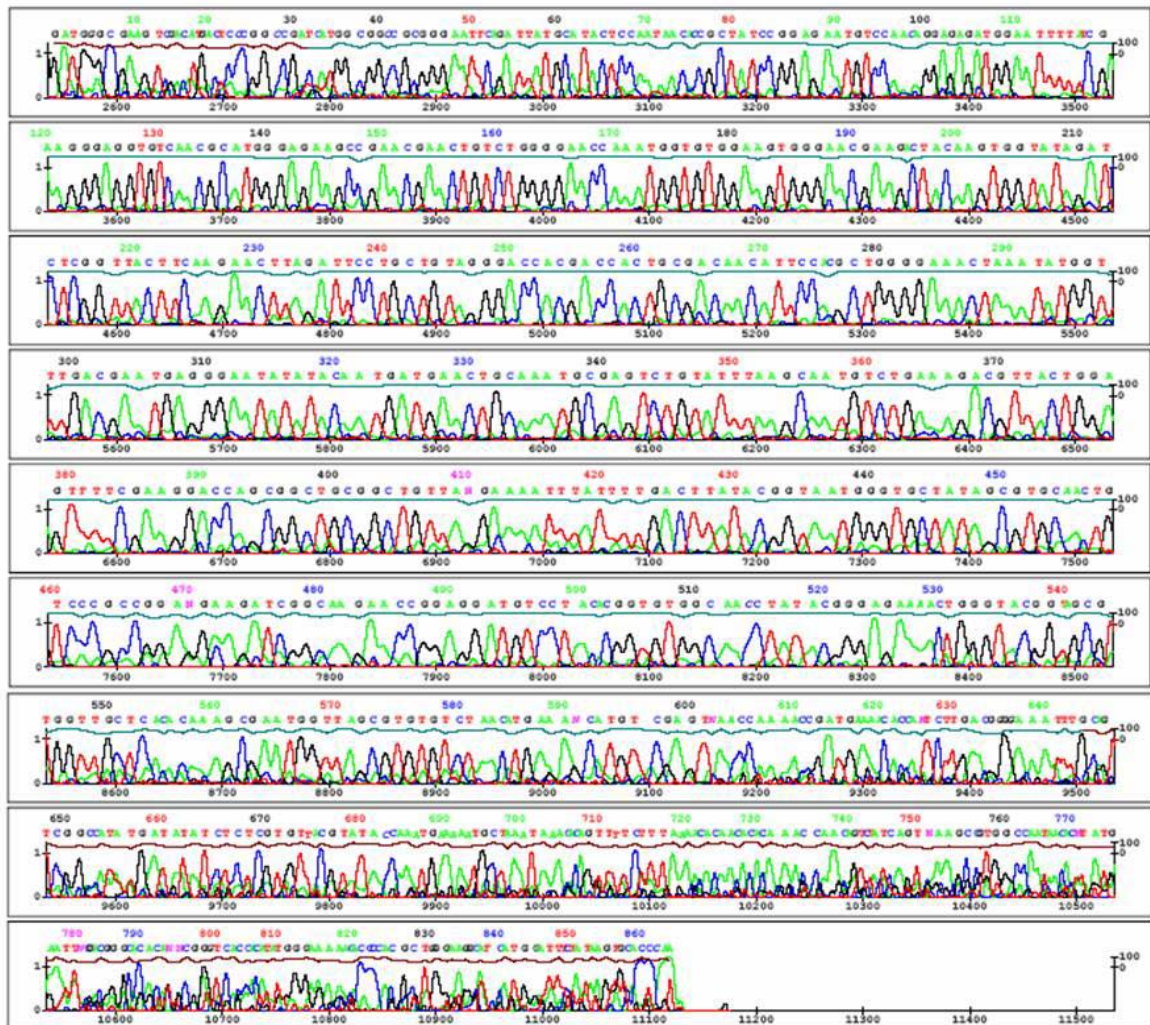
ImperatoxinI	AATGAAGGAAAATACACAATGATGAACTGCAATGCGAGACGGCATTGTAACAATGTCTG	300
Heteromtoxin	AATGAGGGAATATATACAATGATGAACTGCAATGCGAGTCTGTGTTTAAGCAATGTCTG	119

ImperatoxinI	AGAAACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCTGCTGGCTTTGTTAGAAAACTTATTTT	360
Heteromtoxin	AAAGACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACC-----	148
	* * *****	
ImperatoxinI	GACTTATATGGGAATGGGTGCTACAACGTGCAATGTCCCTCTCAGAGAAGATTGGCAAGA	420
Heteromtoxin	-----	
ImperatoxinI	AGTGAAGAGTGTCTGATGGTGTGGCAACGTATACAGGAGAAGCTGGGTATGGTGCATGG	480
Heteromtoxin	-----	
ImperatoxinI	GCGATTAACAACTGAATGGTTAA	504
Heteromtoxin	-----	

รูปที่ 4.1.36 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Heteromtoxin (HmTx) กับ Imperatoxin (IpX)



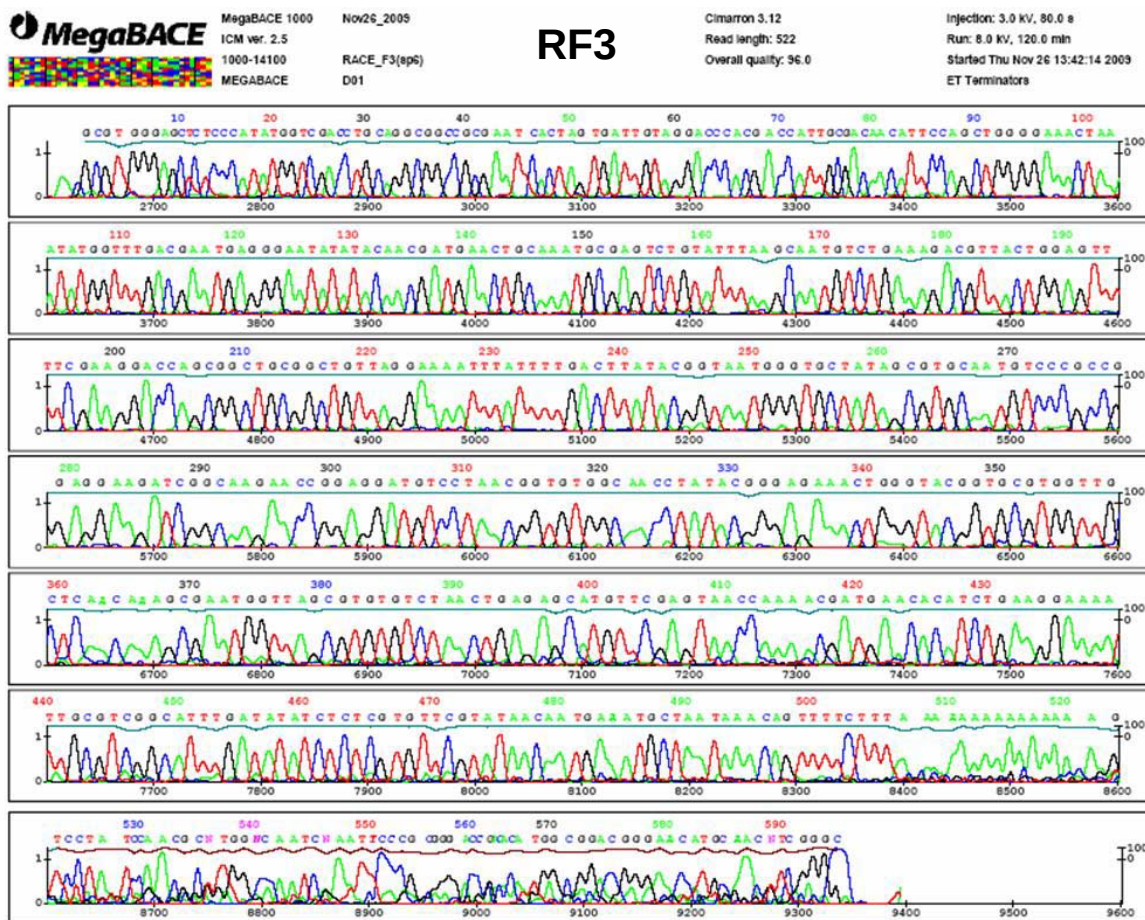
รูปที่ 4.1.37 แสดง 3' RACE product ใน lane ที่ 1 ใช้ primer F1 คู่กับ AUAP และ ใน lane ที่ 2 ใช้ primer F3 คู่กับ AUAP



HIF1

ATGCATACTCCAATAACACCGCTATCCGGAGAATGTCCAACAGGAGAGATGGAATTTTATCGAAGGGAGGTGT
 CAACGCATGGGAGAAGCCGAACGAAGTGTCTGGGAACCAAATGGTGTGGAAGTGGGAACGAAGACTACAAGT
 GGTATAGATCTCGTTACTTCAAGAACTTAGATTCTGTGTAGGGACCACGACCACTGCGACAACATTCCAC
 GCTGGGGAACATAATATGTTTACGAATGAGGGAATATATACAATGATGAAGTGCAAATGCGAGTCTGTAT
 TTAAGCAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGTTTTTGAAGGACGAGCGGCTGCGGCTGTTANGAAAAATTTATTT
 TGACTTATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAACTGTCCGCGCGGANGAAGATCGGCAAGAACCGGAGGATG
 TCCTACACGGTGTGGCAACCTATACGGGAGAAAACCTGGGTACGGTAGCGTGGTTGCTCACACAAAGCGAATGG
 TTAGCGTGTGTCTAATGAAANCATGTGCGAGTNAACCAAAACCGATGAAAACACCANTCTTGACGGGGAAAT
 TTGAGTTCGGCCATATGATATATCTCTCGTGTTACGTATACCAATGAAAAATGCTAAATAAACACAGTTTTTC
 TTTAAACACAAACACACAAACCAACAGTCTATCAGTNAAGCCGTGGCCAATAACACNTATGAATTNCGACGGG
 CACACANNCGGGTCACCACATATGGGAAAAACACCCACGCTGGGAAGGCATCATGGATTTCTATAAGTGCAC
 CCAA

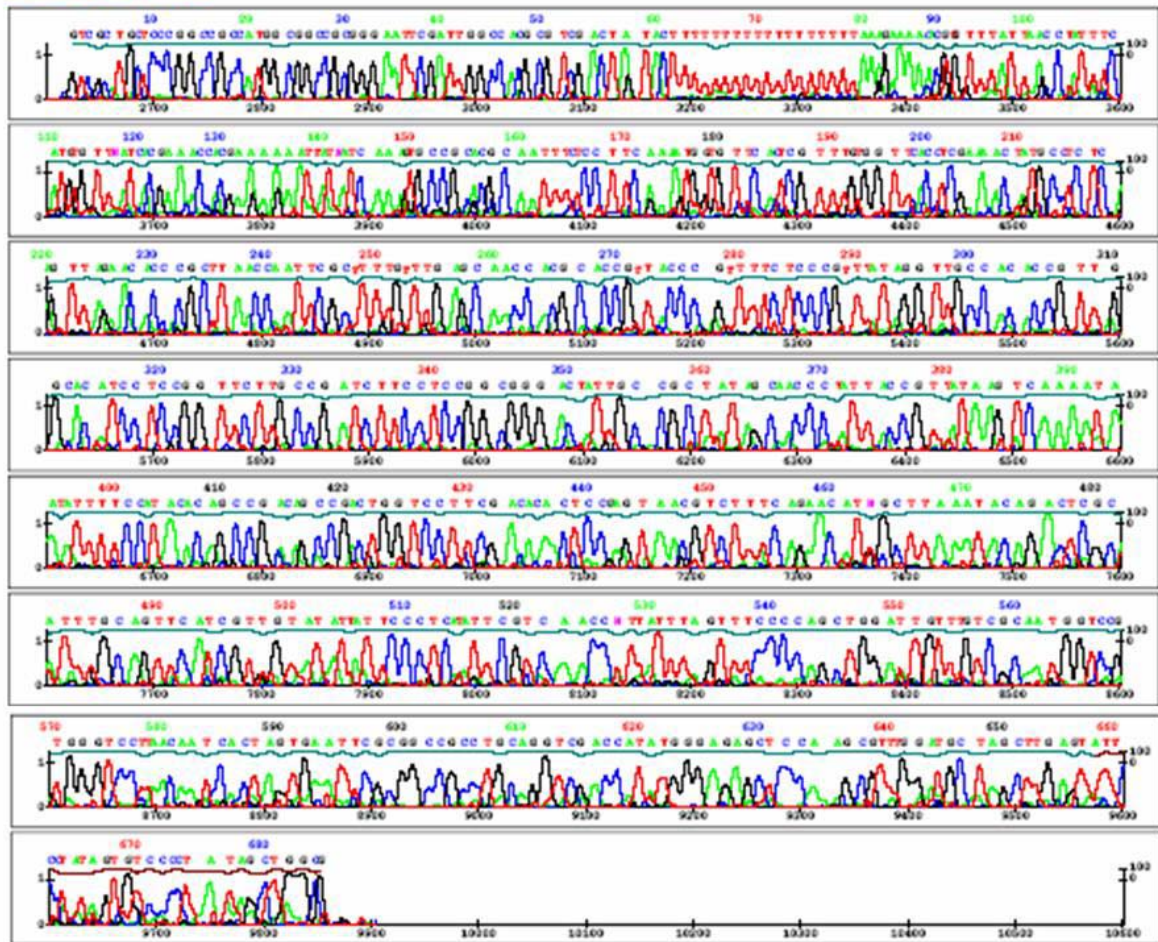
รูปที่ 4.1.38 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Heteromtoxin (HmTx) ของ 3' RACE product ขนาดราว 656 bp โดยใช้ mRNA จากต่อมพิษของ *H. laoticus* เป็นแม่แบบ และใช้ primer HIF1 กับ AUAP
 ลูกศรแสดงตำแหน่งจับของ primer HIF1



>> RF3

GTAGGACCCACGACCATTGCGACAACATTCCAGCTGGGGAACTAAATATGGTTTGGACGAATGAGGGAATATA
 TACAACGATGAACTGCAAATGCGAGTCTGTATTTAAGCAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGTTTTTCGAAGGA
 CCAGCGGCTGCGGCTGTTAGGAAAAATTTATTTTGAATTATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCG
 CCGGAGGAAGATCGGCAAGAACCGGAGGATGTCCTAACGGTGTGGCAACCTATACGGGAGAACTGGGTACGG
 TGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAGCGTGTGTCTAACTGAGAGCATGTTTCGAGTAACCAAAACGATG
 AACACATCTGAAGGAAAATTGCGTCGGCATTTGATATATCTCTCGTGTTTCGTATAACAAATGAAATGCTAATAA
 ACAGTTTTCTTTAAAAAAGTCCTATCCAACGCNTGGNCAATCNAATTCGCGGGACCGACACA
 TGGCGGACGGGAACATGCAACNTCGGGC

รูปที่ 4.1.39 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Heteromtoxin (HmTx) ของ 3' RACE product ขนาดราว 475 bp โดยใช้ mRNA จากต่อมพิษของ *H. laoticus* เป็นแม่แบบ และใช้ primer HIF3 กับ AUAP



>> FF3

GGCCACGCGTCTGACTATACTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGAAAAACAGTGTATTATTAACCTATTTTCATGTGT
TNATCACGAAACCACGAAAAAATTATNATCAAAGTGCCGACGCAATTTCTCCTTCAAAATGGTGTTCACTCG
TTTGTGGTTACCTCGAAACTATGCCTCTCAGTTAGAACACCCGCTTAACCAATTCGCTTTTGTGTTGAGCAA
CCACGCACCGTTACCCGTTTTCTCCCGTTTATAGGTTGCCACACCGTTGGCACATCCTCCGTTCTTGCCGAT
CTTCTCCGGCGGGACTATTGCCGCTATAGCAACCTATTACCGTTATAAGTCAAAAATAATATTTTCCATACA
CAGCCGACGACCGACTGGTCTTCGACACACTCCGAGTAACGCTTTTTCAGAACATNGCTTAAATACAGACTCG
CATTTGCAGTTTCATCGTTGTATATTATTTCCCTCATATTCGTCACACNTTATTTAGTTTCCCAAGCTGGATTGT
TTGTCGAATGGTCCGTGGGTCTTAACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGA
GAGCTCCAAGCGTTTGGATGCTAGCTTGAGTATTCCTATAGTGTCCTTATAGCTGGCG

>> FF3 (reverse)

CGCCAGCTATAGGGGACACTATAGGAATACTCAAGCTAGCATCCAAACGCTTGGAGCTCTCCCATATGGTCGA
CCTGCAGGCGGCCGGAATCACTAGTGATTGTTAAGGACCCACGGACCATTCGACAAAAAATCCAGCTGGGG
AACTAAATAANGTTGACGAATATGAGGGAATAATATACAACGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAA
GCNATGTTCTGAAAGACGTTACTCGGAGTGTGTGCAAGGACCACTCGGCTGTCGGCTGTGTATGGAAAAATATT
ATTTTGACTTATAACGTAATAGGGTTGCTATAGCGGCAATAGTCCCGCCGGAGGAAGATCGGCAAGAACCGG
AGGATGTGCAACGGTGTGGCAACCTATAACGGGAGAAAACGGGTAACGGTGCCTGGTGTCTCAAAACAAAAG
CGAATTGGTTAAGCGGGTGTCTAACTGAGAGGCATAGTTTTTCGAGGTGAACCACAAACGAGTGAACACCATT
TTGAAGGAGAAATTGCGTGCAGCACTTTGATNATAATTTTTTCGTGGTTTCGTGATNAACACATGAAATAGGT
TAATAAACACGTGTTTTCTTTTAAAAAAGTATAGTCGACGCGTGGCC

รูปที่ 4.1.40 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Heteromtoxin (HmTx) ของ 3' RACE product ขนาดราว 475 bp โดยใช้ mRNA จากต่อมพิษของ *H. laoticus* เป็นแม่แบบ และใช้ primer HIF3 กับ AUAP
ลูกศรแสดงตำแหน่งจับของ primer AUAP

```

RACE_FF3rev  CGCCAGCTATAGGGGACACTATAGGAATACTCAAGCTAGCATCCAAACGCTTGGAGCTCT 60
RACE_RF3      -----
                                     HIF3
RACE_FF3rev  CCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATCACTAGTGATTGT 120
RACE_RF3      -----GTAGGACCCACG-AC 14
                                     *****
RACE_FF3rev  CATTGCGACAAACAATCCAGCTGGGGAACTAAATAANGGTTGACGAATATGAGGGAATA 180
RACE_RF3      CATTGCGACAA-CATTCCAGCTGGGGAACTAAATATGGTTTGACGAA--TGAGGGAATA 71
                                     *****
RACE_FF3rev  ATATACAACGATGAACTGCAAATGCGAGTCTGTATTTAAGCNATGTTCTGAAAGACGTTA 240
RACE_RF3      -TATACAACGATGAACTGCAAATGCGAGTCTGTATTTAAGCAATGT-CTGAAAGACGTTA 129
                                     *****
RACE_FF3rev  CTCGGAGTGTGTGCGAAGGACCAGTCGGCTGTCGGCTGTGTATGGAAAAATTATTTTGGAC 300
RACE_RF3      CT-GGAGT-TTTCGAAGGACCAG-CGGCTG-CGGCTGT--TAGGAAAATTTATTTTGGAC 182
                                     *****
RACE_FF3rev  TTATAACGGTAATAGGGTTGCTATAGCG-GCAATAGTCCCGCCGGAGGAAGATCGGCAAG 359
RACE_RF3      TTATA-CGGTAATGGG--TGCTATAGCGTGCAAT-GTCCCGCCGGAGGAAGATCGGCAAG 238
                                     *****
RACE_FF3rev  AACCGGAGGATGTGCCAACGGTGTGGCAACCTATAAACGGGAGAAAACGGGTAAACGGTGC 419
RACE_RF3      AACCGGAGGATGTCCTAACGGTGTGGCAACCTATA--CGGGAGAACTGGGTA-CGGTGC 295
                                     *****
RACE_FF3rev  GTGGTTGCTCAAACAAAAGCGAATTGGTTAAGCGGGTGTCTAACTGAGAGGCATAGTTT 479
RACE_RF3      GTGGTTGCTCAA--CAAAGCGAAT-GGTTA-GCGTGTGT-CTAACTGAGAG-CATG---T 346
                                     *****
RACE_FF3rev  TCGAGGTGAACCACAAACGAGTGAACACCATTTTGAAGGAGAAATTGCGTGCGGCACTTT 539
RACE_RF3      TCGAG--TAACCA-AAACGA-TGAACACA--TCTGAAGGA-AAATTGCGT-CGGCATT-- 396
                                     *****
RACE_FF3rev  GATNATAATTTTTTCGTGGTTTCGTGATNAACACATGAAATAGGTTAATAAACACGTGTT 599
RACE_RF3      --TGATATATCTCTCGTG--TTCGTA--TAACA-ATGAAAT--GCTAATAACA---GTT 444
                                     *****
                                     AUAP
RACE_FF3rev  TTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGTATAGTCGACGCGTGGCC----- 642
RACE_RF3      TTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCTAT--CCAACGCNTGGNCAATCNAATTCGCGGG 502
                                     *****
RACE_FF3rev  -----
RACE_RF3      ACCGACACATGGCGGACGGGAACATGCAACNTCGGGC 539

```

รูปที่ 4.1.41 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Heteromtoxin (HmTx) ที่ได้จาก 3' RACE เส้น RF3 จากรูปที่ 4.1.39 และ FF3 (reverse) จากรูปที่ 4.1.40

- ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก 3'RACE ระหว่าง HIF1 กับ AUAP primer ได้ 786 bp ดังนี้

ATGCATACTCCAATAACACGCTATCCGGAGAATGTCCAAAGGAGAGATGGAATTTATCGAAGGGAGGTGTCAA
CGCATGGGAGAAGCCGAACGAACGTGTCTGGGGAACCAATGGTGTGGAAGTGGGAACGAAGCTACAAGTGGTA
TAGATCTCGTTACTTCAAGAACTTAGATTCTGCTGTAGGGACCACGACCACTGCGACAACATTCCAGCTGG
GGAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATATACAATGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAAG
CAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGTTTTCGAAGGACCAGCGGCTGCGGCTGTTAGGAAAAATTTATTTTGACT
TATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCGCCGGAAGAAGATCGGCAAGAACCAGGAGGATGTCCTAA
CGGTGTGGCAACCTATACGGGAGAAAACTGGGTACGGTGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAGCGTGT
GTCTAACTGAAGCATGTCGAGTAACCAAAACCGATGACACCATCTTGACGAAATTTGCAGTCGGCCATATGAT
ATATCTCTCGTGTTACGTATACCAAAATGAAAAATGCTAAATAAACACAGTTTTCTTTAAAAACACAACACAA
ACCAACAGTCTATCAGTGAAGCCTGGCCAATAACACATATGAATTCGACGGGCACACAAGCGGGTCACCACAT
ATGGGAAAAACACCCACGCTGGGAAGGCATCATGGATTTCTATAAGTGCACCCAA

- ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก 3'RACE ระหว่าง HIF3 กับ AUAP primer ได้ 487 bp ดังนี้

GTAGGACCCACGACCATTGCGACAACATTCCAGCTGGGGAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATA
TACAACGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAAGCAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGTTTTCGAAGGA
CCAGCGGCTGCGGCTGTTAGGAAAAATTTATTTTGACTTATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCG
CCGGAGGAAGATCGGCAAGAACCAGGAGGATGTCCTAACGGTGTGGCAACCTATACGGGAGAACTGGGTACGG
TGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAGCGTGTGTCTAACTGAGAGCATGTTGAGTAACCAAAACGATG
AACACATCTGAAGGAAAATTGCGTCGGCATTGATATATCTCTCGTGTTCTGATAACAATGAAATGCTAATAA
ACAGTTTTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTATAGTCGACGCGTGGCC

- ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก RT-PCR ระหว่าง HIF3 กับ HIR3 ได้ 148 bp ดังนี้

GTAGGACCCACGACCATTGCGACAACATTCCAGCCGGGGAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATA
TACAATGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTGTTAAGCAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGGTATGGAAGGA
CC

- เมื่อทำการสรุปรวม ได้ Heteromtoxin (HmTx) เต็มเส้นขนาด 648 bp ดังนี้

ATGCATACTCCAAACACGCTATCCGGAGAATGTCCAAAGGAGAGATGGAATTTTTCGAAGGGAGGTGTCAAC
GCATGGGAGAAGCAGAACGAACTGTCTGGGGAACCAATGGTGTGGAAGTGGAAACGAAGCTACAAGTGGTAT
AGATCTCGGTTACTTTCAAGAACTTAGATTCTGCTGTAGGACCCACGACCATTGTGACAACATTCCAGCTGGG
GAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATATACAATGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAAGC
AATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCGGCTGCGGCTGTTAGAAAAATTTATTTTGACTT
ATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCGCCGGAAGAAGATCGGCAAGAACCAGGAGGATGTCCTAAC
GGTGTGGCAACCTATACGGGAGAACTGGGTACGGTGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAGCGTGTGT
CTAACTGAGAGCATGTTGAGTAACCAAAACGATGAACACATCTGAAGGAAAATTGCGTCGGCATTGATATA
TCTCTCGTGTTCTGATAACAATGAAATGCTAATAAACAGTTTTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

- นำมาตัด untranslated region ออก ได้ยีน HmTx เฉพาะ translated region ขนาด 504 bp ดังนี้

ATGCATACTCCAAACACGCTATCCGGAGAATGTCCAAAGGAGAGATGGAATTTTTCGAAGGGAGGTGTCAAC
GCATGGGAGAAGCAGAACGAACTGTCTGGGGAACCAATGGTGTGGAAGTGGAAACGAAGCTACAAGTGGTAT
AGATCTCGGTTACTTTCAAGAACTTAGATTCTGCTGTAGGACCCACGACCATTGTGACAACATTCCAGCTGGG
GAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATATACAATGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAAGC
AATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCGGCTGCGGCTGTTAGAAAAATTTATTTTGACTT
ATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCGCCGGAAGAAGATCGGCAAGAACCAGGAGGATGTCCTAAC
GGTGTGGCAACCTATACGGGAGAACTGGGTACGGTGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAG

รูปที่ 4.1.42 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Heteromtoxin (HmTx) ที่สรุปได้

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 HmTx	504	2 M.tamulus	504	86
1 HmTx	504	3 ImperatoxinI	504	84
2 M.tamulus	504	3 ImperatoxinI	504	85

Alignment

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

HmTx      ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCGGAGAATGTCCAAAGGAGAGATGGAATTTTTCGAA 60
M.tamulus ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCGGAGAATGTCCAAAGGAGAGATGGAATTTTTCGAA 60
ImperatoxinI ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCAGAGAATATCCAAAGAAGAGATGGAATTTCTTCGAA 60
*****

HmTx      GGGAGGTGTCAACGCATGGGAGAAGCAGAACGAACTGTCTGGGGAACCAAATGGTGTGGA 120
M.tamulus GGGAGGTGTCAACGCATGGGAGAAGCAGAACGAACTGTCTGGGGAACCAAATGGTGTGGA 120
ImperatoxinI GGGAGGTGTGAACGCATGGGGAAGCAGACGAGACTATGTGGGGAACCAAATGGTGTGGA 120
*****

HmTx      AGTGGAAACGAAGCTACAAGTGGTATAGATCTCGGTTACTTCAAGAACTTAGATTCCTGC 180
M.tamulus AGCGGAAATGAAGCTATAAATACAGATCTTGGTTACTTTAGCAACTTAGATTCATGC 180
ImperatoxinI AGCGGAAACGAAGCTACAGATATTTAGAACTTGGTTACTGGAGTAATTTAGATTCGTGT 180
**

HmTx      TGTAGGACCCACGACCATTGTGACAACATTCCAGCTGGGGAACCTAAATATGGTTTGACG 240
M.tamulus TGCAGGACTCATGACCACTGTGACAGCATTCCAGCTGGGGAACCTAAATATGGTTTGACG 240
ImperatoxinI TGTAGGACCCACGACCATTGTGACAATATTCATCAGGGCAACCTAAATATGGTCTGACG 240
**

HmTx      AATGAGGGAATATATACAATGATGAAGTGCAGTCTGTATTTAAGCAATGTCTG 300
M.tamulus AATGAGGGAATATATACAATGATGAAGTGCAGTCTGTATTTAAGCAATGTCTG 300
ImperatoxinI AATGAAGGAAATACACAATGATGAAGTGCAGTCTGTATTTAAGCAATGTCTG 300
*****

HmTx      AAAGACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCGGCTGCGGCTGTTAGAAAAATTTATTT 360
M.tamulus AGAGACGTGCGTGGAATTTTGAAGGAAAAGCGGCTGCCGCTGTTAGGAAAATTTATTT 360
ImperatoxinI AGAAACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCTGCTGGCTTTGTTAGAAAAATTTATTT 360
*

HmTx      GACTTATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCGCCGAAGAAGATCGGCAAGA 420
M.tamulus GACTTATATGGGAATGGGTGCTTTAACGTGAAATGTCCCTCCGGAGCAAGATCGGCAAGA 420
ImperatoxinI GACTTATATGGGAATGGGTGCTACAACGTGCAATGTCCCTCTCAGAGAAGATTGGCAAGA 420
*****

HmTx      ACCGGAGGATGTCCTAACGGTGTGGCAACCTATACGGGAGAACTGGGTACGGTGCCTGG 480
M.tamulus AGTGAAGAATGTACTAACGGTATGGCAACATATACAGGGGAAACAGGGTACGGTGCATGG 480
ImperatoxinI AGTGAAGAGTGTCTGATGGTGTGGCAACGTATACAGGAGAAGCTGGGTATGGTGCATGG 480
*

HmTx      TTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAG 504
M.tamulus GCGATTAACAACTGAATGGTTAA 504
ImperatoxinI GCGATTAACAACTGAATGGTTAA 504
*

```

รูปที่ 4.1.43 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HmTx, imperotoxin I และ toxin จาก *Mesobuthus tamulus*

รูปที่ 4.1.44 การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HmTx เป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ program จาก ExPASy - Translate tool (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>)

รูปที่ 4.1.45 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HmTx กับ toxin จาก *M. tamulus* และ Imperatoxin (IpTxi) ซึ่ง Signal sequence คือ ส่วนที่ขีดเส้นใต้ ส่วนที่เน้นสีเหลืองเป็นส่วน small subunit

4.1.5.7 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน HmTx ด้วย Phylogenetic tree

เริ่มจากการเลือกโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม Phospholipase A2 จากสิ่งมีชีวิต 17 ชนิด ได้แก่ แมงป่อง วัว เหลือบ งู ผึ้ง ต่อ และคน จากนั้นใช้วิธีบูตสแตรป (bootstrap) เพื่อประเมินค่าความมั่นใจต่อวิวัฒนาการที่ได้ โดยอาศัยการทดลองสับเปลี่ยนค่าข้อมูลโดยการแทนที่ เริ่มจากการสุ่มดึงเอาข้อมูลลักษณะบางอย่างออกจากตารางเมตริกซ์ แล้วทำให้เมตริกซ์นั้นมีขนาดเท่าเดิมโดยการเพิ่มจำนวนซ้ำของข้อมูลลักษณะอื่นขึ้นมาแทนที่ จากนั้นจึงคำนวณสร้างแผนภูมิเคลโดแกรมใหม่ขึ้นมา หลังจากทำซ้ำไปหลายๆ รอบ แผนภูมิทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์หาความแข็งแรง หรือความมั่นใจที่กิ่ง (branch) ต่าง ๆ บนแผนภูมิ อยู่ในรูปของร้อยละ ถ้ามีค่าใกล้ 100 % จะช่วยให้มั่นใจได้ว่ากิ่งดังกล่าวหรือเคลด (clade) บนกิ่งนั้น น่าจะเกิดขึ้นได้จริงบนวิวัฒนาการที่ถูกต้อง

โปรตีนทั้ง 17 ชนิดที่ถูกเลือกนำมาใช้ในการสร้าง phylogenetic tree

```
>HmTx
MHTPKHAIRRMASKGEMEFFEGRCQRMGEAERTVWGTKWCGSGNEATSGIDLGYFKNLDSCCRTHDHCNIPAGETKYGLTN
EGIYTMNCKCESVFKQCLKDVTGGMEGPAAAVRKIYFDLYGNGCYSVQCPAGRRSARTGGCPNGVATYTGGETGYGAWLL
NKANG
>M. tamulus
MHTPKHAIRRMASKGEMEFFEGRCQRMGEAKRTMWGTKWCGSGNEAINYTDLGYFSNLDSCCRTHDHCDSIPAGETKYGLTN
EGKYTMNCKCESAFEKCLRDVIRGILEGKAAAVRKTYFDLYGNGCFNVKCPSGARSARSEECTNGMATYTGGETGYGAWAI
NKLNG
>IpTxi_P. imperator
MHTPKHAIQRISKEEMEFFEGRCERMGEADETMWGTKWCGSGNEATDISELGYWSNLDSCCRTHDHCNIPSGQTKYGLTN
EGKYTMNCKCETAFEKCLRNVTGGMEGPAAGFVRKTYFDLYGNGCYNVQCPSQRRLARSEECPDGVATYTGGEAGYGAWAI
NKLNG
>HgPLA2
MSLIIVLVISVLSADAVLSMDNELYNLNEPSQRSSWPVARAVRMQFSKRSEGGRESRKMQGCQILESLNDIAREALRTPRH
TTKRISKDEMEFFEGRCCLSVGESERTVLGKWKCGAGNEAANYSDLGYNVDRCCREHDHCNIPAGETKYGLKNEGTYTM
MNCKCEKAFDKCLSDISGYFTRKAVSAVKFTYFTLYGNGCYNVKCENGRSPSNECPNGVAEYTGGETGLGAKVINFGK
>H. fulvipes
TMWGKWKWCGSGNKAINYTDLGYFSNLDSCCRTHDHCNIAAGETKYGLTNEGKYTMNCKCEATFQQCLRDVHGPLEGKAA
FTIRKLYFGLYGNCFNVQCPS
>A. Phaiodactylus
MVKRVSKEEMDALERSCSQPFEERFLIVSGTKWCGNNNIAANYSDLGFLKADKCCRHDHCDHIASGETKYGLENKGLFT
ILNCDCEAFDHCLKEISNNVTDIRQKGAENVWFYFQWYNANCYRLYCKDEKSARDEACTNQYAVVKKNFVTQ
>A. mellifera
MQVVLGSLFLLLLSTSHGWQIRDRIGDNELEERIIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMCPDVM SAGESKH
GLTNTASHTRLSCDDCKFYDCLKNSADTISSYFVGKMYFNLIDTKCYKLEHPVTGCGERTEGRCLHYTVDKSKPKVYQWF
DLRKY
>1POC_A A. mellifera
IIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMCPDVM SAGESKHGLTNTASHTRLSCDDCKFYDCLKNSADTISSY
FVGKMYFNLIDTKCYKLEHPVTGCGERTEGRCLHYTVDKSKPKVYQWFDLRKY
>A. cerana
IIYPGTLWCGHGNVSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMCPDVM SAGESKHGLTNTASHTRLSCDDTFYDCLKNSGEKISSY
FVGKMYFNLIDTKCYKLEHPVTGCGERTEGRCLRYTVDKSKPKVYQWFDLRKY
>Bos_taurus
MGVLVLLGVLSFLGRITLGGSPALHWDSTSCHLARPGRPLRSLFSLGKDAQGLALFHAHWDGHGRLQVCSRQDEPDLTA
AYGALCAGEITRGSFIHTPGPELQALATLQSQWEACRGPASPAGTREKRAAGQNGVPGIGRQWVKRGWTVPGTLWCGVG
DSAGNSELGVFQGPDLCCREHRCRPHNVSPFQYNYGIRNYRFHTISHCNCDAFQQCLQDQRDSVDIMGVAFFNVLAIP
CFVLEEQEQACVEWYWWGGCRRYGSVPFARLQPRTFYNASWSSPATSLTPSPQNPALSRPQMHPQWPSEWKEKSPSKT
NATALQAPVASPGSDRASTVQLEVTHPGFQGTGGRKPPGAHRACRSFRHLDQCEHQIGPQETKQFLNSAHEPLFHCNCT
RRLARFLRLHGPVVGASMLWELPGMTCFKLAPPLDCAEGKGCPDRPRAFKVSARHLLRLQQRRLQLQGTGTGNGQVWPSED
QGAPISFYNRCLQLT
>Pediculus_humanus_corporis
MKQSPNVRGSGSSSGGSDGGSSGGGGGGGGDESLIVDEKLGRTKWCGTGNVANSYNDLGIWVKEDRCCREHDHCPIQLEP
GQCRNGICNFSPTFRSHCDNAFRRCLEKTKSNIANIIGSIYFNVAQGTICISERRFCPQAMRCSVGEFRRNRPYKPSSSF
SFSSGSGSSGLVRIYNLKKKLFSLNLSFGIFGGNRHLIIL
>B. jararacussu
```

MRTLWIMAVLLVGVGDLWQFGQMILKETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDCCYGKLTNCKPKTD RYS
YSRENGVIIICGEGTPCEKQICECDKAAAVCFRENLRITYKKRYMAYPDVLCKKPAEK

>N. naja

MNPAHLLILAAVCVSPLGASSNRPMPLNLYQFKNMVQCTVPNRSWDFADYGCYCGRGGSGTPVDDLDRCCQVHDN CYGEA
EKISRCWPYFKTYSYEQSGTLTCKGGNNACAAVCDCLAAICFAGAPYNDNNYNIDLKARCQ

>V. ammodytes

MRTLWIVAVCLIGVEGSLLEFGMMILGETGKNPLTSYSFYGCYCGVGGKGT PKDATDRCCFVHDCCYGNLPDCSPKTD RYKYHRENGAIVC
GKGTSCENRICECDRAAICFRKNLKTNYIYRNYPDFLCKKESEK

>P04054.3_H.Sapiens IB

MKLLVLAVLLTVAAADSGISPRAVWQFRKMIKCVIPGSDPFLEYNNYGCYCGLGSGTPVDELKCCQTHDN CYDQAKKLDSCKFLLDN PY
THTYSYSCSGSAITCSSKNKECEAFICNCDRNAICFSKAPYNKAHKNLDTKKYCQS

>Q9NZ20_H.Sapiens III

MGVQAGLFGMLGFLGVALGGSPALRWYRTSCHLTAKVPGNPLGYLSFLAKDAQGLALIHARWDAHRRLQACSWED EPELTA
AYGALCAHETAWGSFIHTPGPELQRALATLQSQWEACRALEESPA GARKKRAAGQSGVPGGGHQREKRGWTPGT LWCGVG
DSAGNSSELGVFQGPDLCCREHRCQPQNISPLQYNYGIRNYRFHTISHC DCDTRFQQCLQNQHDSISDIVGVAFFNVLEIP
CFVLEEQEACVAWYWWGGCRMYGTVP LARLQPRTFYNASWSSRATSPTPSSRSPAPPKPRQKQHLRKGP PHQKGSKRPSKA
NTTALQDPMVSPRLDVAPTGLQGPQGG LKPGGARWVCRSFRRLDQCEHQIGPREIEFQLLNSAQEPLFHCNCTRR LARFL
RLHSPPEVTNMLWELLGTTCTFKLAPPLDCVEGKNCSRDPRAIRVSARHLRRLQRRHQLQDKGTD ERQPWPSEPLRGPMSF
YNQCLQLTQAARRPDRQKQSWSQ

>060733.2_H.Sapiens

MQFFGLVNTFSGVTNLFSPNFRVKEVAVADYTSSDRVREEGLILFQNTPNRTWDCVLVNPRNSQSGFRLFQLELEADAL
VNFHQYSSQLLPFYESSPQVLHTEVLQHLTDLIRNHPSWSVAHLA VELGIRECFHHSRIISCANCAENEEGCTPLHLACRK
GDGEILVELVQYCHTQMDVTDYKGETVFHYAVQGDNSQVLQLLGRNAVAGLNQVNNQGLTPLHLACQLGKQEMVRVLLCN
ARCNIMGPNGYPIHSAMKFSQKGAEMIISMDSQIHSKDPYRGASPLHWAKNAEMARMLLKRCNVNSTSSAGNTALHVA
VMRNRFDCAIVLLTHGANADARGEHGNTPHLAMSKDNVEMIKALIVFGAEVDTPNDFGETPTFLASKIGRLVTRKAILTL
LRTVGAIEYCFPIHGVPAEQGSAAPHHFSLERAQPPPISLNNLEQLDLMHISRARKPAFILGSMRDEKRTHDHLCLDGG
GVKGLIIIIQLLIAIEKASGVATKDLFDWVAGTSTGGILALAILHKS MAYMRGMYFRMKDEVFRGSRPYESGPLEEFLKRE
FGEHTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLVWRAARSSGAAPTYFRPNG
RFLDGGLLANNPTLDAMTEIHEYNQDLIRKGQANKVKKLSIVVSLGTGRSPQVPVTCVDVFRPSNPWELAKTVFGAKELGK
MVVDCCTDPDGRAVDRARAWCEMVGIIQYFRLNPQLGTDIMLDEVSDTVLVNALWETEVYIYEHREEFQKLIQ LLLSP

Reference

>HmTx: heteromtoxin

>M. tamulus: gb|AAR16429.1|phospholipase A2 precursor [Mesobuthus tamulus]

>IpTx1_P. imperator: gi|37079101|sp|P59888.1|AltName: Full=Imperatoxin I

>PA2HADGE: gi|218546750|sp|P0C8L9.1|RecName: Full=Phospholipase A2; Short=HgPLA2

>H. fulvipes: gi|73612161|gb|AAZ78243.1| phospholipase A2

>A. Phaiodactylus: gi|62900722|sp|Q6PXP0.2| RecName: Full=Phaiodactylipin

>A. mellifera: gi|58585172|ref|NP_001011614.1|phospholipase A2 precursor

>1POC_A_A. mellifera: gi|157833543|pdb|1POC|A Chain A, Crystal Structure Of Bee-
Venom Phospholipase A2 In A Complex With A Transition-State Analogue

>A. cerana: gi|7435005|pir|A59055 phospholipase A2 (EC 3.1.1.4), venom - Indian
honeybee

>Bos_taurus: gi|124249266|ref|NP_001074379.1| phospholipase A2, group III
precursor [Bos taurus]

>Pediculus humanus corporis: gi|242018446|ref|XP_002429686.1| Phospholipase A2,
putative

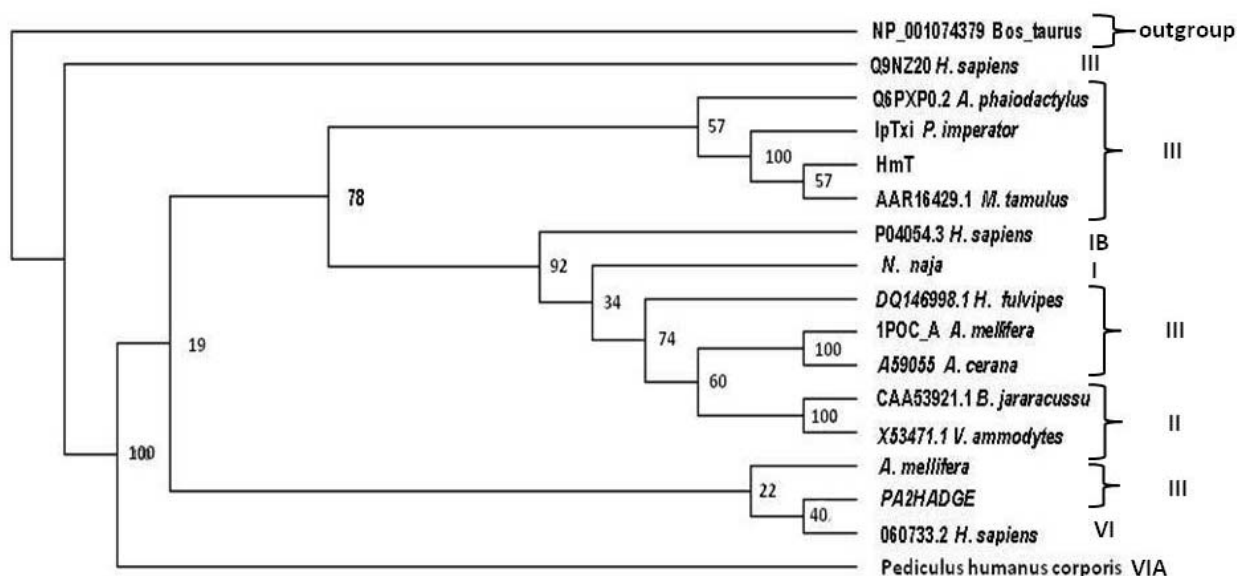
>Q9NZ20_H.Sapiens: gi|20139239|sp|Q9NZ20.1|PA2G3_HUMAN RecName: Full=Group 3
secretory phospholipase A2; AltName: Full=Group III secretory phospholipase A2;
Short=GIII sPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase GIII;
AltName: Full=sPLA2-III; Flags: Precursor

>060733.2_H.Sapiens: gi|6685712|sp|060733.2_H.Sapiens |PA2G6_HUMAN RecName:
Full=85 kDa calcium-independent phospholipase A2; Short=CaI-PLA2; Short=iPLA2;
AltName: Full=Group VI phospholipase A2; Short=GVI PLA2

>P04054.3_H.Sapiens: gi|129404|sp|P04054.3|PA21B_HUMAN RecName:
Full=Phospholipase A2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase;
AltName: Full=Group IB phospholipase A2; Flags: Precursor

4.1.5.8 การวิเคราะห์ Phylogenetic tree

การสร้าง Phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ HmTx กับโปรตีนในกลุ่มเดียวกัน ด้วย ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนภายในกลุ่มโปรตีนที่เลือกมาศึกษาและใช้ TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) เพื่อสร้าง tree พบว่าค่า bootstrap มีค่าได้ตั้งแต่ 19-100 % โดยสามารถแบ่งความสัมพันธ์ได้เป็นกลุ่มๆ (รูปที่ 4.1.47) พบว่า โปรตีน HmTx และ toxin จาก *M. tamulus* มีความใกล้ชิดกับ IpTx จาก *P. imperator* มากที่สุดซึ่งได้ค่า bootstrap ถึง 100 % ทั้งยังถูกจัดไว้ให้มีความใกล้ชิดกับ toxin จาก *A. phaiodactylus* ซึ่งจัดเป็นกลุ่มของ PLA2 ชนิดที่ 3 นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ใกล้ชิด (มีค่า bootstrap เท่ากับ 100%) ของกลุ่มโปรตีนที่นำมาศึกษาอีกสองกลุ่ม คือ กลุ่มของ 1POC A จาก *Apis mellifera* และ A59055 จาก *A. cerana* ซึ่งเป็น PLA2 ชนิดที่ 3 ที่พบในแมลงวงศ์ต่อ แตน และ toxin จาก *B. jararacussu* กับ *V. ammodytes* ซึ่งเป็น PLA2 ชนิดที่ 2 ที่พบในงู จาก Phylogenetic tree ยังพบว่าโปรตีน HmTx มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ 1POC A จาก *A. mellifera* (bee phospholipase) ซึ่งมีโครงสร้างสามมิติรายงานไว้แล้ว ดังนั้น จึงเลือกใช้ 1POC A จาก *A. mellifera* (PDB accession number 1POC) เป็นต้นแบบในการสร้างโครงสร้างสามมิติของโปรตีน HmTx โดยเทคนิค Molecular modeling



รูปที่ 4.1.47 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน HmTx กับโปรตีนกลุ่ม Phospholipase A2 ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

4.1.5.9 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติ

ในการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติ จะเลือกใช้เฉพาะ Mature protein โดยใช้ 1POC A จาก *A. mellifera* ขนาด 134 กรดอะมิโน เป็นต้นแบบ เพราะมีรายงานเอาไว้แล้ว (รูปที่ 4.1.48)

> template 1POCA จาก *A. mellifera* 134 aa

IIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGRFKHTDACCRTDHMCDPVMSAGESKHGLTNTASHTRLSCDCDDKFYDCLKNSADTISSY
FVGKMYFNLIDTKCYKLEHPVTGCGERTEGRCLHYTVDKSKPKVYQWFDLRKY

>HmTx 136 aa

TVWGTKWCGSGNEATSGIDLGYFKNLDSCCRTDHCDNIPAGETKYGLTNEGIYTMNCKCESVFKQCLKDVTTGGMEGPAA
AAVRKIYFDLYGNGCYSVQCPAGRRSARTGGCPNGVATYTGGETGYGAWLLNKANG

รูปที่ 4.1.48 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ 1POC A จาก *A. mellifera* และ HmTx

จากนั้น วิเคราะห์ในส่วนของ Primary structure โดยเทียบกับ toxin จาก *M. tumulus*, IpTxi ซึ่งเป็น Phospholipase A2 กลุ่ม 3 ที่มีความใกล้เคียงกันมากเมื่อศึกษาด้วย Phylogenetic tree แล้ว Alignment กับโปรตีนในกลุ่มเดียวกัน โดยใช้โปรแกรม ClustalW2

HmTx ประกอบขึ้นจากกรดอะมิโน 167 ตัว (รูปที่ 4.1.49) แบ่งเป็น mature protein ประกอบขึ้นจากกรดอะมิโน 136 ตัว และ putative signal peptide 31 ตัว (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ -31 ถึง -1 ที่ขีดเส้นใต้) โปรตีน HmTx เป็น heterodimer ประกอบด้วยสอง subunit คือ large subunit และ small subunit โดย large subunit มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 104 ตัว (ตำแหน่งที่ 1-104) small subunit พบมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 27 ตัว (ตำแหน่งที่ 110-136 แสดงในส่วนที่เน้นสีเหลือง) และมีลำดับของ peptide 5 ตัวที่เรียงต่อกัน เป็นตำแหน่งตัดแยกของทั้งสอง subunit คือ **RRSAR** (ตำแหน่งที่ 105-109 ส่วนที่ขีดเส้นใต้สองเส้น) (การนับตำแหน่งโปรตีนจะไม่นับ putative signal peptide โดยตำแหน่งที่ 1 เริ่มที่ตำแหน่งแรกของ mature protein)

	-31		-1		10	
HmTx	▼	MHTPKHAIRMSKGEMEFFE	GRCQRMGEAERTVWGTKWCG	▼	SGNEATSGIDLGYFKNLDSC	80
	30		50		70	
HmTx	▼	CRTHDHCDNIPAGETKYGLT	▼	NEGIYTMNCKCESVFKQCL	▼	KDVTGGMEGPAAAVRKIYF 160
	90		110		130	
HmTx	▼	DLYGNGCYSVQCPAGRRSAR	▼	TGGCPNGVATYTGGETGYGAW	▼	LLNKANG 167

รูปที่ 4.1.49 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ HmTx โดยที่ ตำแหน่งที่ -31 ถึง -1 คือ putative signal peptide ส่วน large subunit คือตำแหน่งที่ 1-104 และ small subunit คือตำแหน่งที่ 110-136 (เน้นสีเหลือง) และมีลำดับ RRSAR (ตำแหน่งที่ 105-109) เป็นส่วนแยก subunit ทั้งสองออกจากกัน

4.1.5.10 การศึกษาโครงสร้างสามมิติ โดยใช้โปรแกรม Swiss-PdbViewer DeepView v4.0

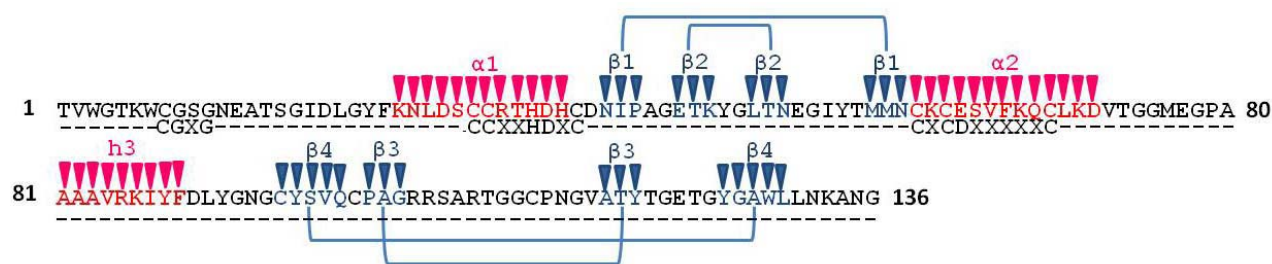
(<http://spdbv.vital-it.ch/>)

จากการเปรียบเทียบ HmTx กับ 1POC A จาก *A.mellifera* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม phospholipase A2 ที่มีความใกล้เคียงกันทางวิวัฒนาการจาก phylogenetic tree และมีรายงานของโครงสร้างสามมิติไว้แล้ว นำมาใช้เป็น template ซึ่งมีค่าความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนเมื่อเทียบกับ (รูปที่ 4.1.50)

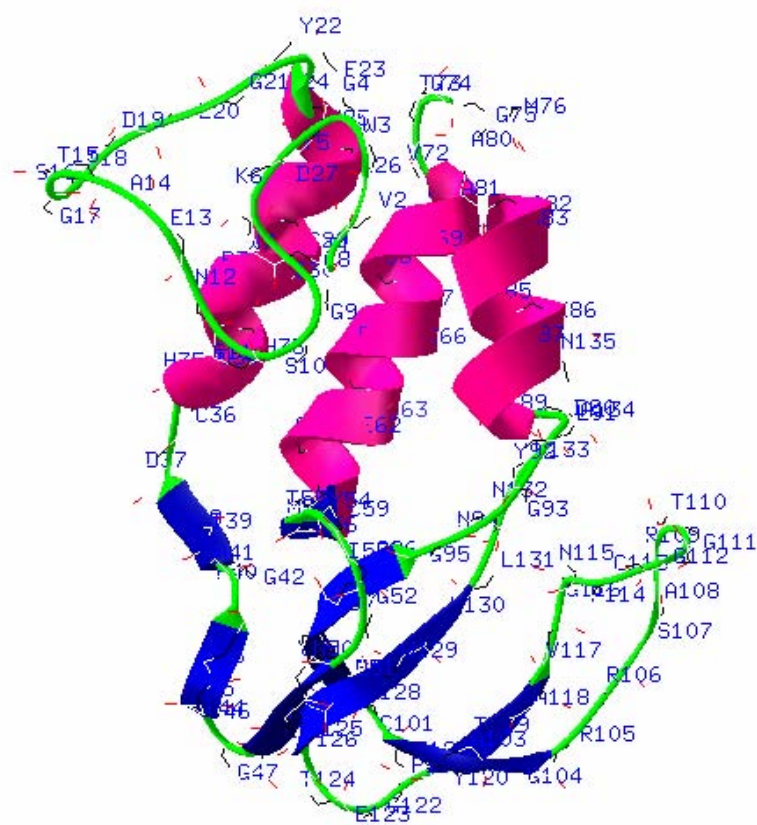
SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score
=====	=====	=====	=====	=====
1 1POC_A <i>A.mellifera</i>	134	2 HmTx	136	34
=====	=====	=====	=====	=====
1POC_A <i>A.mellifera</i>	IIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMCPDVMSAGESKHGLTNTASHTRLS	60		
HmTx	-TVWGTWKWCGSGNEATSGIDLGYFKNLDSCCRTHDHC-DNIPAGETKYGLTNEGIIYTMMN	58		
	** *** **:.. : ** *: :***** * * :.***:*.**** .:* :.			
1POC_A <i>A.mellifera</i>	CDCDDKFYDCLKNSADTIS---SYFVGKMYFNLIDTKCYKLEHPVTGCGERTEGRCLHYT	117		
HmTx	CKCESVFKQCLKDVTTGGMEGPAAAAVRKIYFDLYGNGCYSVQCPAGRRSARTGG-CPNGV	117		
	*.:. * :***: .. :. : * :*:*. * .. **.: * . ** * * : .			
1POC_A <i>A.mellifera</i>	VDKSKPKVYQWFDLRKY--	134		
HmTx	ATYTGETGYGAWLLNKANG	136		
	. : . * :*. *			

รูปที่ 4.1.50 แสดงความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน HmTx กับ 1POC A จาก *A. mellifera*

จากการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของ HmTx (รูปที่ 4.1.51 และ 4.1.52) พบว่า โครงสร้างหลักประกอบด้วย α -helices 3 ส่วน คือ h1 (LYS24-HIS35), h2 (CYS59-ASP71) และ h3 (ALA81-PHE89) และ anti-parallel β -sheet 4 คู่ คือ b1 (ASN38-PRO40 กับ MET56-ASN58), b2 (GLU43-LYS45 กับ LEU48-ASN50), b3 (PRO102-GLY104 กับ ALA118-TYR120) และ b4 (CYC96-GLN100 กับ TYR126-LEU130), ที่เหลือคือส่วนของ random coil ซึ่งพบว่าบริเวณ conserved sequences คือ -CCxxHDxC- , CxCDxxxxxC- ของ 1POC A และ HmTx เป็นส่วนที่เป็น helix ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ในการเป็น phospholipase



รูปที่ 4.1.51 แสดงตำแหน่งการเกิด α -helices (แสดงไว้ด้วยสีชมพู), anti-parallel β -sheet (แสดงไว้ด้วยลูกศรสีน้ำเงิน) และตำแหน่ง conserved sequences -CGxG-, -CCxxHDxC-, CxCDxxxxxC- ของ HmTx เมื่อเทียบกับ 1POC A จากผึ้ง (*A.mellifera*) (Kuchler และคณะ, 1989)

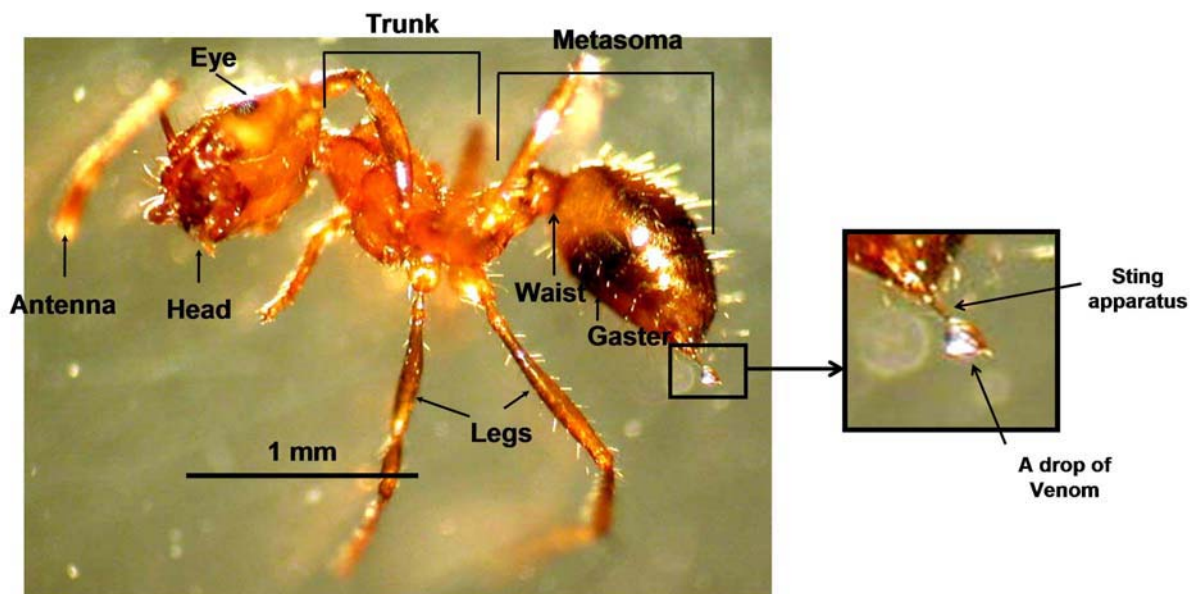


รูปที่ 4.1.52 แสดงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน HmTx ด้วยวิธี molecular modeling ใช้ *A.mellifera* (PDB accession number 1POC) เป็น template โดยใช้โปรแกรม Swiss-PdbViewer DeepView v4.0

ตอนที่ 4.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษมดคันไฟ (*Solenopsis geminata*) การทำบริสุทธิ์, การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออกฤทธิ์ในน้ำพิษ และการผลิตแอนติบอดีต้านพิษ

4.2.1 มดคันไฟและการรีดพิษ

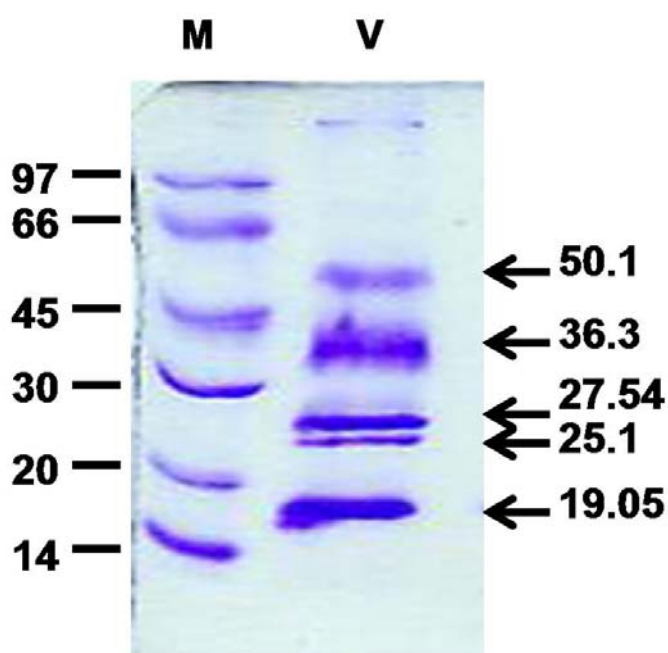
มดคันไฟเก็บได้ทั่วไป แล้วนำไป identify species ที่ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และที่พิพิธภัณฑ์มด ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่ามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solenopsis geminata* การเก็บพิษมดคันไฟ โดยกระตุ้นให้มดตกใจแล้วปล่อยหยดน้ำพิษ ใช้ปลาย capillary เก็บน้ำพิษ พบว่า มดคันไฟ 1 ตัว ให้น้ำพิษปริมาณ 0.01 ไมโครลิตร (รูปที่ 4.2.1) และต้องใช้มากกว่า 1000 ตัว สำหรับการทำงานแต่ละครั้ง



รูปที่ 4.2.1 มดคันไฟไทย ภายใต้ Stereomicroscope แสดงส่วนต่าง ๆ ของมดคันไฟ และแสดงให้เห็นน้ำพิษที่ปลายกันกำลังหยดออกมาจากปลาย sting apparatus ที่ใช้ต่อย มด 1 ตัวให้น้ำพิษราว 0.01 ไมโครลิตร

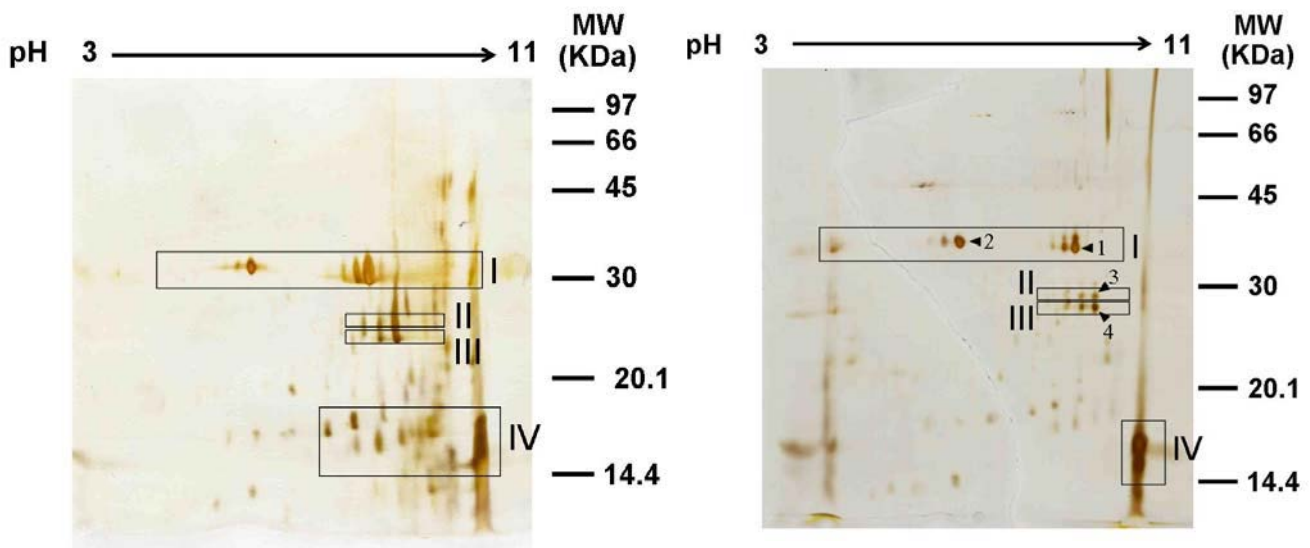
4.2.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษมดคันไฟ

จากการนำน้ำพิษมดคันไฟมา run SDS-PAGE พบแถบโปรตีนจำนวน 5 แถบใหญ่ ๆ คือ ประมาณ 50, 36, 27, 25 และ 19 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.2.2) ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับรูปแบบของ SDS-PAGE ของโปรตีนในน้ำพิษมดคันไฟชนิด red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) ในสหรัฐอเมริกา แล้วพบว่ามียูบแบบคล้ายคลึงกัน จึงตั้งชื่อโปรตีนขนาด 36, 27, 25 และ 19 กิโลดาลตัน ว่า Solgem 1, Solgem 2, Solgem 3 และ Solgem 4 ตามลำดับ เพื่อให้สอดคล้องกับโปรตีนที่มีฤทธิ์เป็น allergen ที่มีชื่อว่า Sol i 1, Sol i 2, Sol i 3 และ Sol i 4 ในน้ำพิษของ *S. invicta*

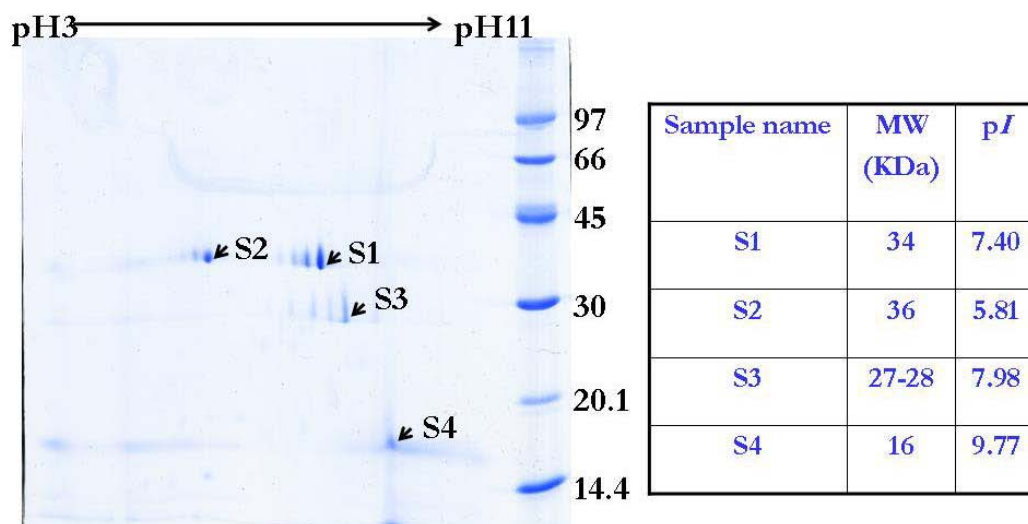


รูปที่ 4.2.2 โปรตีนในน้ำพิษมดคันไฟไทยภายหลังจาก run 13% SDS-PAGE (lane M คือ marker, V คือ crude venom)

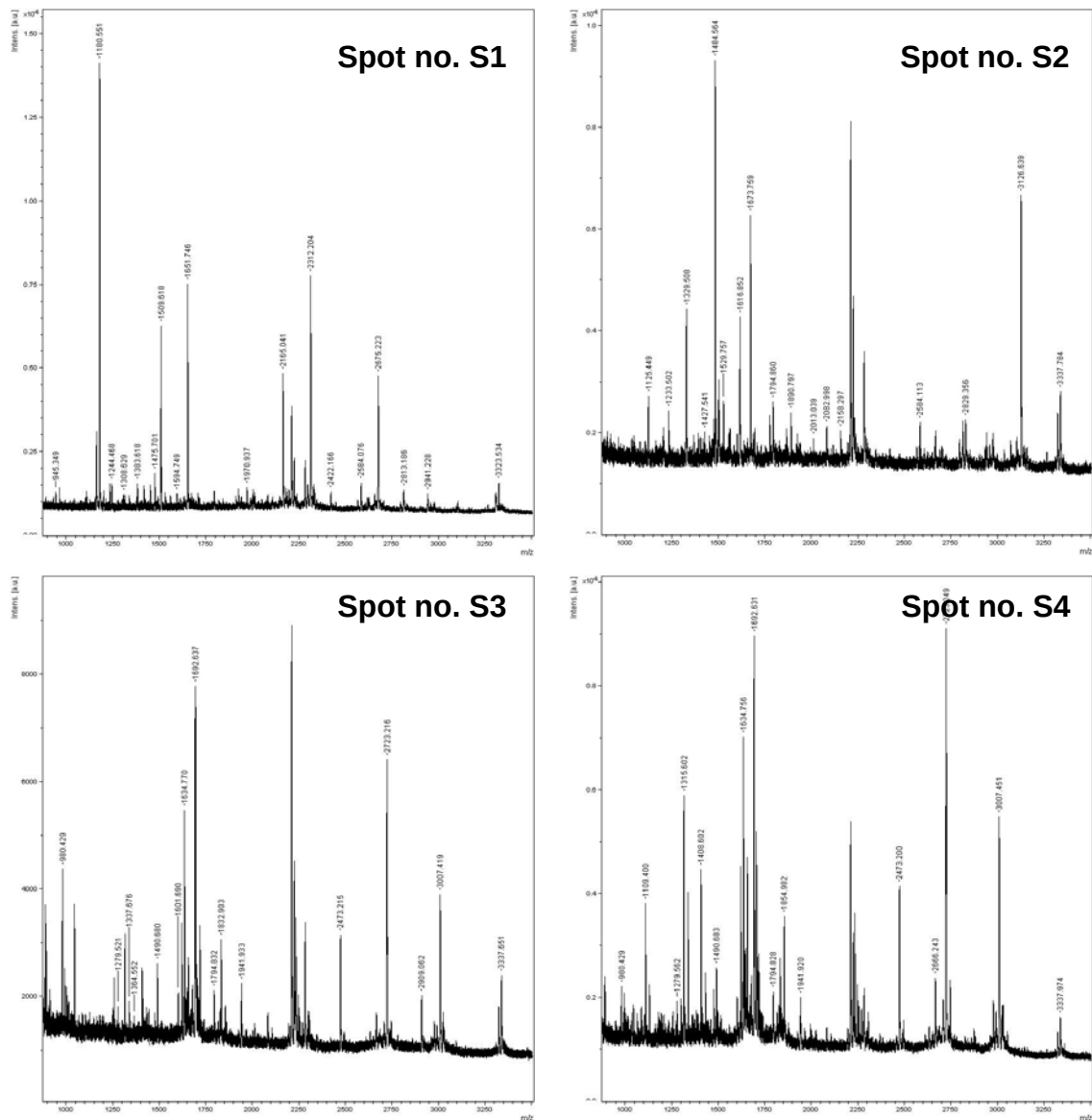
จากนั้น นำโปรตีนในน้ำพิษมดคันไฟไทยมาวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE (รูปที่ 4.2.3) พบว่า กลุ่มโปรตีน Solgem 1 มีจำนวนราว 10 isoform ส่วนกลุ่ม Solgem 2, Solgem 3 และ Solgem 4 มีจำนวนราว 3, 3 และ 10 isoform ตามลำดับ จึงได้ทำการตัดเอา major spot S1 ถึง S4 (รูปที่ 4.2.4) ไปทำ peptide mass fingerprint พบว่า ได้ fragment ต่าง ๆ กัน (รูปที่ 4.2.5) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำไป search ใน database ด้วยโปรแกรม Mascot Matrix Science แล้ว พบว่าไม่ตรงกับโปรตีนตัวใดเลย คาดว่าอาจเป็นโปรตีนตัวใหม่ในพิษมดคันไฟ ที่ยังไม่มีผู้ใดรายงานไว้ จึงได้ส่งไปหาลำดับกรดอะมิโนบางส่วนด้วย liquid chromatography tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS)



รูปที่ 4.2.3 2D-PAGE profile ของน้ำพิษมดคันไฟ สำหรับ first dimension (IEF) โหลดโปรตีน ปริมาณ 150 (รูปซ้าย) และ 80 (รูปขวา) μg บน IPG strip ขนาด 7 cm โดยมี nonlinear gradient อยู่ระหว่าง pH 3-11 ส่วน second dimension ใช้ 13% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี silver ซึ่ง หมายเลข I, II, III and IV คือ กลุ่มของ Solgem 1, 2, 3 และ 4 ที่สอดคล้องกับผลจาก SDS-PAGE (รูปที่ 4.2.2).



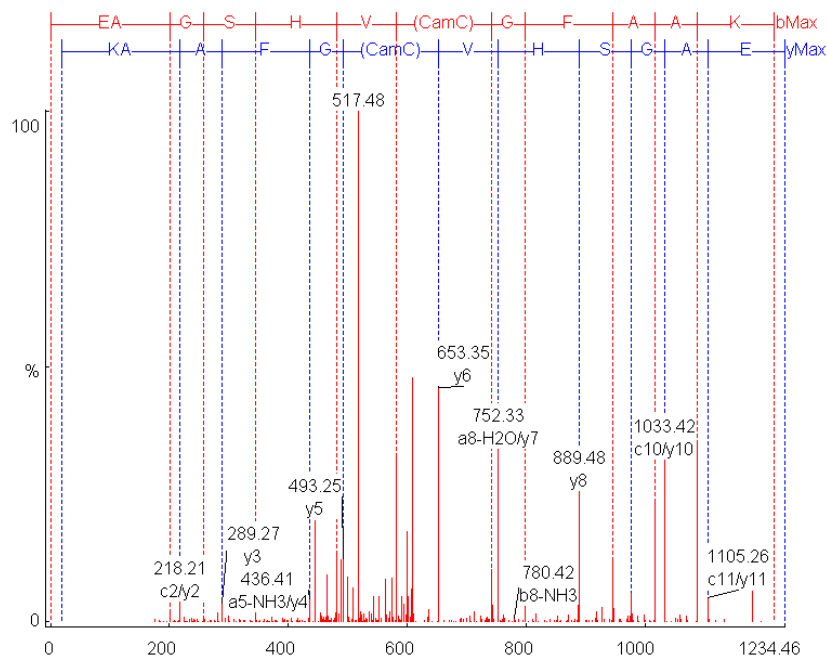
รูปที่ 4.2.4 2D-PAGE profile ของน้ำพิษมดคันไฟ สำหรับ first dimension ใช้ IPG strip ขนาด 7 cm โดยมี nonlinear gradient อยู่ระหว่าง pH 3-11 ส่วน second dimension นั้น ใช้ 13% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี coomassie ลูกศรชี้คือ spot ที่จะนำไปหา peptide mass fingerprint ด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass spectrometry



รูปที่ 4.2.5 Peptide Mass fingerprint ของเปปไทด์ ที่ได้จาก spot ของโปรตีนในน้ำพิษมดคันไฟไทย ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE ในรูปที่ 4.2.4

จากผลการหาลำดับกรดอะมิโนบางส่วนด้วย LC-MS/MS พบว่า ผลของการหาลำดับกรดอะมิโนบางส่วน (รูปที่ 4.2.6 และ 4.2.7 และตารางที่ 4.2.1) พบว่า spot S1 และ S2 ไม่สามารถจำแนกชนิดของโปรตีนได้ ส่วน spot S3 คล้ายกับ Sol i 3 ซึ่งเป็น allergen ในน้ำพิษของมดคันไฟในสหรัฐอเมริกา (*S. invicta*) และ S4 คล้ายกับ Sol i 2 ซึ่งเป็น allergen ในน้ำพิษของ *S. invicta* เช่นกัน

S1



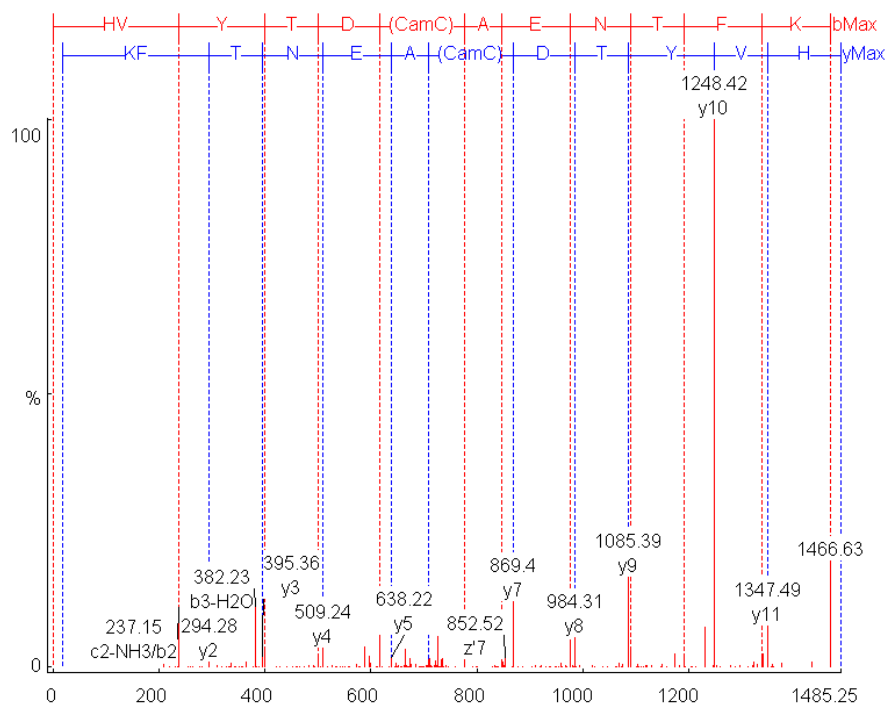
Source file: D:\raw-data\LC5100108-111\S1_S001_Ana.RAW
 Current file: D:\raw-data\LC5100108-111\S1_S001_Ana.anz
 Precursor MZ: 617.7084
 Charge: 2
 Peptide: EAGSHV(CamC)GFAAK
 Score: 73.6%

Position Confidence Table

Tag	Confidence
EA	98.6%
GSHV(CamC)G	100%
F	74.6%
AAK	100%

รูปที่ 4.2.6 ผลการจำแนก spot S1 ด้วย LC-MS/MS ลำดับนำจะคือ EAGSHVCGFAAK ซึ่งเมื่อนำไปตรวจชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม FASTA แล้วยังไม่สามารถจำแนกชนิดของโปรตีนได้

S2



Source file: D:\raw-data\LC5100108-111\S2_S003_Ana.RAW
 Current file: D:\raw-data\LC5100108-111\S2_S003_Ana.anz
 Precursor MZ: 743.19006
 Charge: 2
 Peptide: HVYTD(CamC)AENTFK
 Score: 50.8%

Position Confidence Table

Tag	Confidence
HVYTD(CamC)AENT	100%
F	51%
K	100%

รูปที่ 4.2.7 ผลการจำแนก spot S2 ด้วย LC-MS/MS ลำดับน่าจะคือ HVYTDCAENTFK ซึ่งเมื่อนำไปตรวจชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม FASTA แล้วยังไม่สามารถจำแนกชนิดของโปรตีนได้

ตารางที่ 4.2.1 แสดงผลการจำแนก spot S3 และ S4 ภายหลังการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Spot	Reference	Peptide	Score XC	MWsp
S3	1. gi 447712 prf 1915279C allergen sol i 3	K.DAIVNKHNELR.Q	40.20	24041.1
	2. gi 14424466 sp P35778 VA3_SOLIN Venom allergen 3 precursor (Venom allergen 3) (Allergen Sol i 3) (Sol i 3)	K.DAIVNKHNELR.Q	30.20	26350.9
S4	1. gi 63099697 gb AAY32928.1 queen venom protein Sol i 2 precursor [<i>Solenopsis invicta</i>]	K.CVNQPDDPLAR.V	106.28	15383.0

4.2.3 การหาลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติของ Solgem 4 ในน้ำพิษมดคันไฟไทย

4.2.3.1 การหาลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้นของ Solgem 4

ผลจากการทำ LC-MS/MS พบว่า ลำดับของ spot S4 มีส่วนเหมือนกับลำดับของ Sol g 2 (รูปที่ 4.2.8) จากนั้น นำไปหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลายอะมิโน (ปลาย N) ด้วยวิธี Automated Edman degradation ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พบว่า ได้ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N มา 10 ลำดับ คือ (A/D)NEEL(K/A/L)(I/V/Q)(I/T/L)RK (รูปที่ 4.2.9) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโน (ปลาย N) ของ Sol i 2 ในน้ำพิษของ *S. invicta* ซึ่งเป็นมดคันไฟในสหรัฐอเมริกา พบว่ามีความเหมือนถึง 80% (ตารางที่ 4.2.2) ซึ่งคาดได้ว่าโปรตีนที่กำลังศึกษาอยู่นี้น่าจะมีโครงสร้างคล้ายกับ Sol i 2

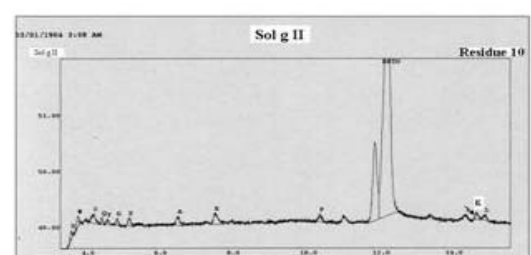
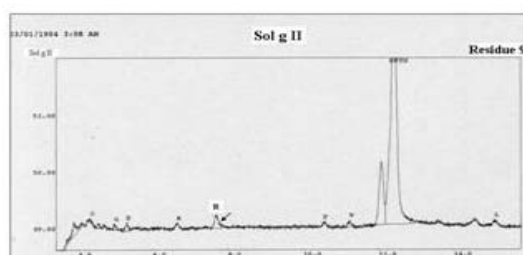
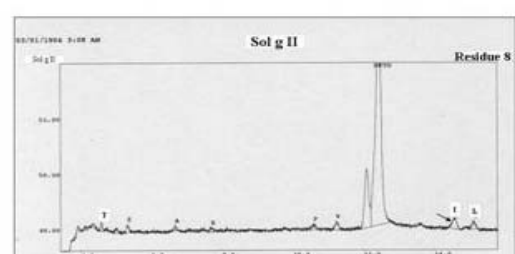
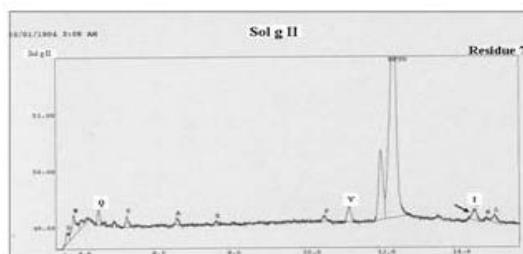
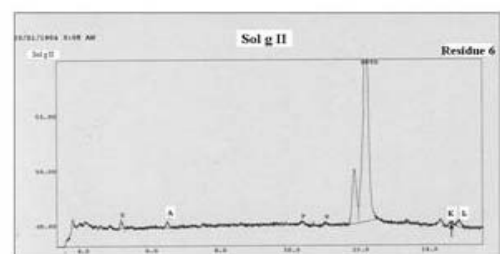
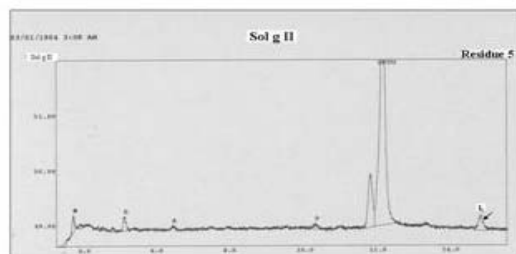
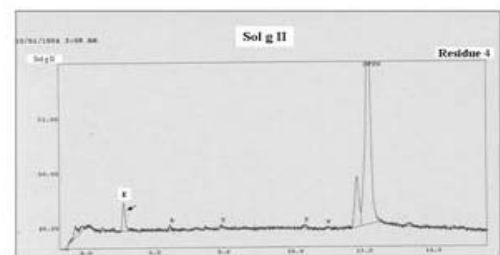
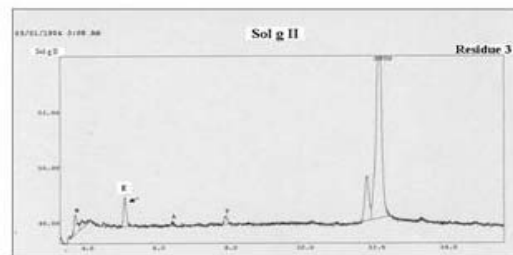
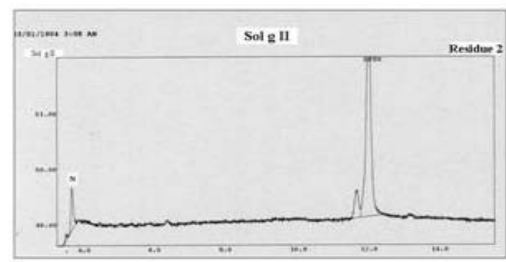
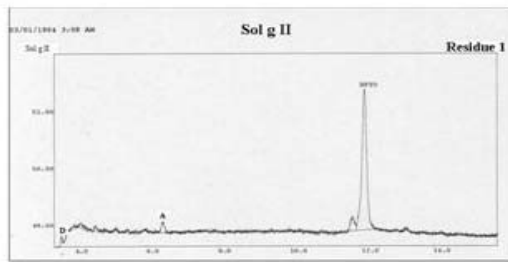
SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	S4	13	2	Soli2	138	92
1	S4	13	3	Solg2	138	92
1	S4	13	4	Solg4	136	38
2	Soli2	138	3	Solg2	138	75
2	Soli2	138	4	Solg4	136	40
3	Solg2	138	4	Solg4	136	41

S4	-----KCVNQ PDDPLARV-----	13
Soli2	MKS FVLATCLLGFAQIIYA-DNKE LKIIRKDVAECLRTLPKCGNQ PDDPLARVDVWHCAM	59
Solg2	MKS FVLATCLLVFAQIIYA-DTEKLKVL RKDIAECARTLPKCE NQ PDDPLARVDVLHCVL	59
Solg4	MKT FVLVSCLLVFTQIT YALDIKEI SIMNRILEKCI RTVPKREND PINPLRN VNVYCAF	60
	* * : * : * * *	

S4	-----	
Soli2	AKRGVYDNPDP AVIKERSMKMCTKIITDPANVENCKKVASRCVDRETQGP KSNRQKAVNI	119
Solg2	AKRGVFDDPAPAAIKKKDEKYCAITITDPADVENCKKVVSRVDKETQRP RSNRQKAINI	119
Solg4	TKRGIFTPKG--VNTKQYIN YCEKTAISPADIKLCKKIASKCVKKVYDRPGPIIERSKNL	118

S4	-----	
Soli2	IGCALRAGVAETT VLARKK	138
Solg2	VACILRSGVAETT VLARKK	138
Solg4	LSCV LKKGLLELT VYGKK-	136

รูปที่ 4.2.8 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ spot S4 กับ allergen protein ชนิดต่าง ๆ Sol i 2 เป็นของ *S. invicta* (Hoffman และคณะ, 1993), Sol g 2 และ Sol g 4 ของ *S. geminata* (จากฐานข้อมูล ExPASy : <http://au.expasy.org/>)



รูปที่ 4.2.9 ผลของการทำ Automated Edman degradation ของ spot S4 (หมายเลข 1-10 คือ residue ลำดับที่ 1 ถึง 10 จากปลายอะมิโนของเปปไทด์) อ่านได้คือ (A/D)NEEL(K/A/L)(I/V/Q)(I/T/L)RK

ตารางที่ 4.2.2 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโน (ปลาย N) ของ spot S4 ในน้ำพิษของ *S. geminata* กับ Sol i 2 ในน้ำพิษของ *S. invicta*, * แสดงชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน

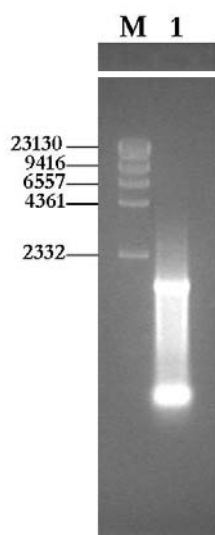
Residue ที่	ลำดับกรดอะมิโนของ โปรตีนที่กำลัง ศึกษาอยู่นี้ (<i>S. geminata</i>)	ลำดับกรดอะมิโนของ Sol i 2 (<i>S. invicta</i>)
1	A/D	D
2	N	N
3	E*	K*
4	E	E
5	L	L
6	K/A/L	K
7	I/V/Q	I
8	I/T/L	I
9	R	R
10	K	K

จากนั้น เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้นของโปรตีนที่กำลังศึกษาอยู่นี้ จึงได้ออกแบบ primer โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ Sol i 2 ของ *S. invicta* และ Sol r 2 ของ *S. richteri* ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์เป็น allergen เป็นต้นแบบ (ตารางที่ 4.2.3) โดยเริ่มจากการสกัด total RNA (รูปที่ 4.2.10) จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR ได้แถบ PCR product ขนาด 255 และ 418 bp (รูปที่ 4.2.11) และนำ PCR product ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย automated sequencer ที่ศูนย์อณูชีววิทยา ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.2.12 และ 4.2.13) สรุปได้ว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่กำลังศึกษาอยู่นี้ที่ได้จากการใช้ primer 2 คู่ คือ F₁R₅ และ F₁R₈ มีความแตกต่างกันอยู่บ้าง แต่ลำดับก็คล้ายคลึงกับ Sol i 2 ถึงร้อยละ 71-85 ทำให้เชื่อว่าโปรตีนที่กำลังศึกษาอยู่นี้ น่าจะเป็น homologue ของ Sol i 2 ใน *S. geminata* ซึ่งจากผลของความไม่แน่นอนดังกล่าว ทำให้ต้องทำ RT-PCR ซ้ำอีกครั้งโดยใช้ F₁R₅ เป็น primer แล้วส่งไป sequence พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้ในครั้งที่สามนี้ ก็ยังแตกต่างจากที่ sequence ได้ในครั้งแรก ๆ ทำให้ผลการหาลำดับกรดอะมิโนยังสรุปไม่ได้ อาจเป็นไปได้ว่า โปรตีนในกลุ่มนี้มีหลาย isoform นอกจากนี้ ยังได้ลำดับกรดอะมิโนของ Solgem 2 ไม่ครบ ทางด้านปลายอะมิโนขาดอีก 2 residue และทางด้านปลายคาร์บอกซีขาดอีก 21 residue จำเป็นต้องทำ Rapid Amplification of 3' cDNA Ends (3'-RACE)

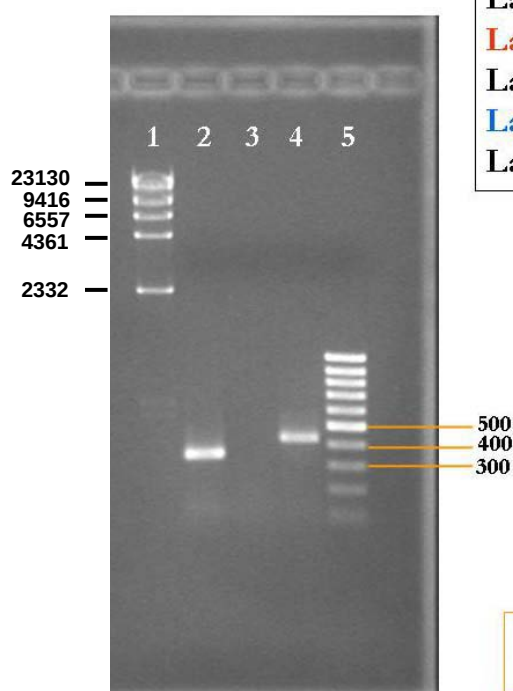
ตารางที่ 4.2.3 primer ที่ออกแบบได้และใช้ในการทำ PCR

Solgem 2F	5'-CAAAGATGTGGCGGAATGC-3'
Solgem 2R	5'-TTTCTGGCGGTTGCTTTTCG-3'
F ₁	5'-GTCCTTCGTGCTTGCTAC-3'
F ₃	5'-AGGATGTAGCAGAATGTC-3'
R ₅	5'-ACTGCTTTCTGTCTGTTGG-3'
R ₇	5'-GTCTGTTGGATTTTGGGC-3'
R ₈	5'-TGTGTCTCATTTTTTACGGGC-3'



รูปที่ 4.2.10 ผลการสกัด Total RNA ของมดคันไฟไทย บน 0.8% agarose gel electrophoresis (lane M คือ marker ส่วน lane 1 คือ RNA)

M = Lamda HindIII marker
1 = RNA of *S. germinata*

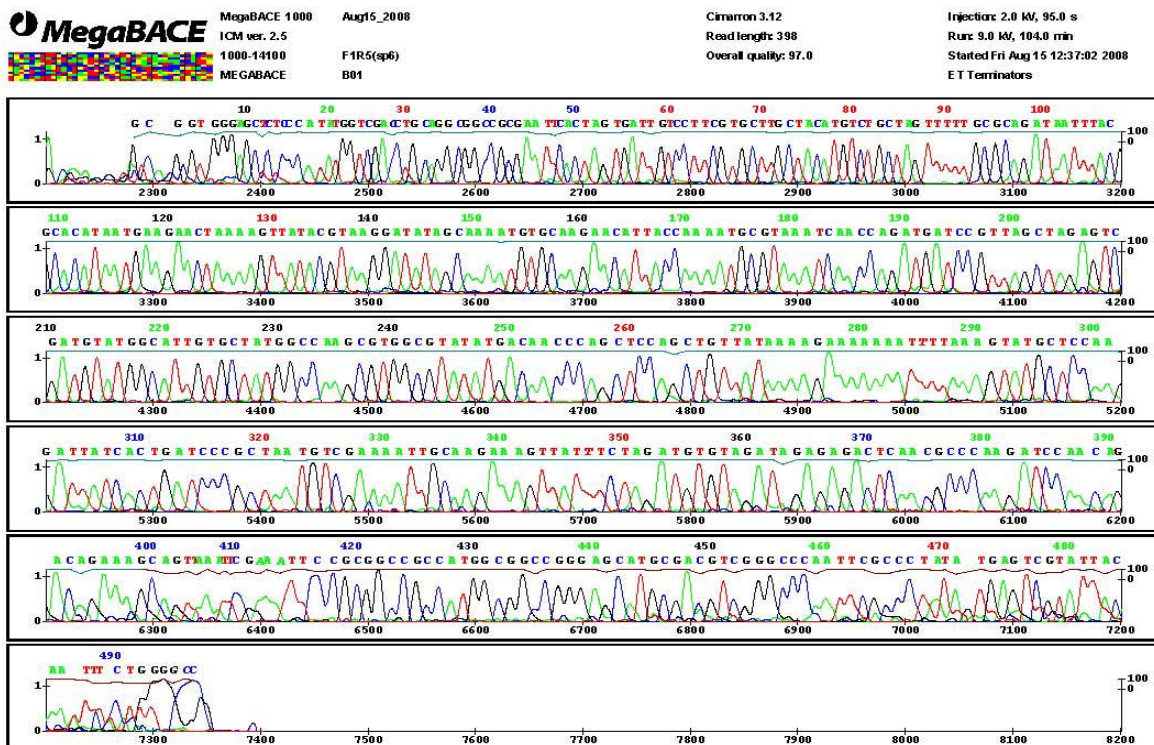


Lane 1 = Lamda HindIII marker
Lane 2 = PCR product of F₁R₅ primer
Lane 3 = PCR product of F₃R₇ primer
Lane 4 = PCR product of F₁R₈ primer
Lane 5 = 100 bp DNA ladder marker

Primer pair	Product size (bp)
F ₁ R ₅	345
F ₃ R ₇	255
F ₁ R ₈	418

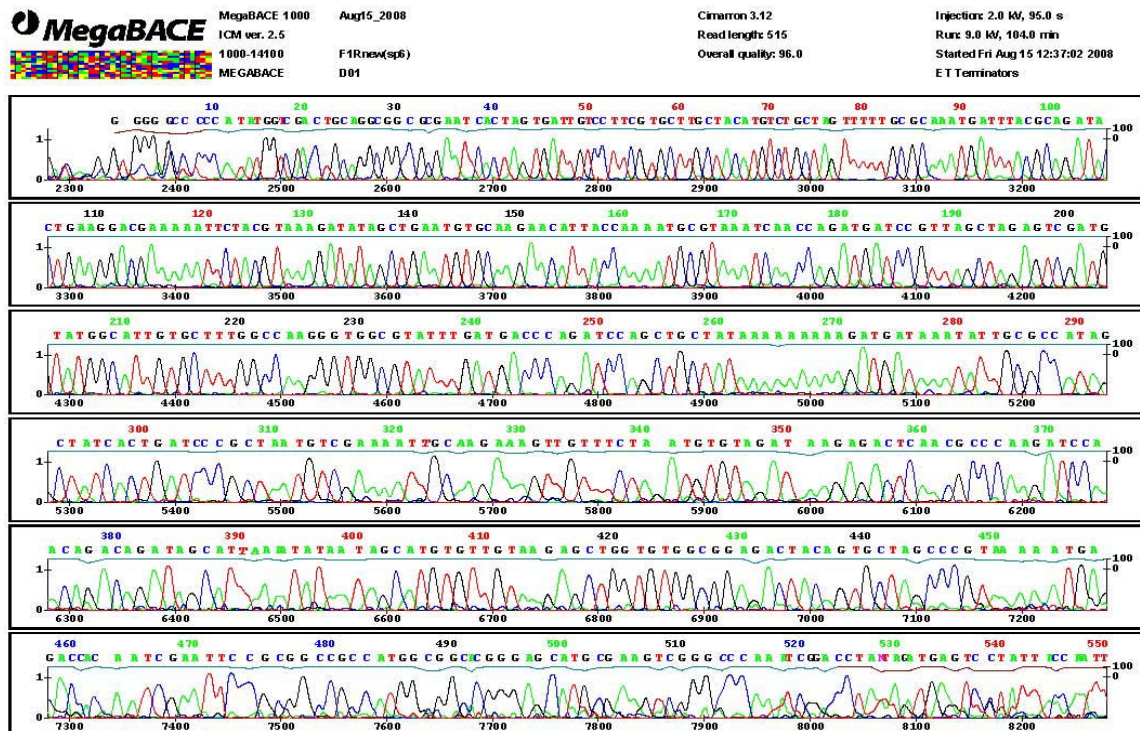
Purity was checked with 1.5% agarose gel electrophoresis

รูปที่ 4.2.11 PCR product ที่ได้จากการทำ RT-PCR โดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบ และใช้ F₁R₅, F₃R₇ และ F₁R₈ เป็น primer



GTCCTTCGTGCTTGCTACATGTCTGCTAGTTTTTGC GCAGATAATTTACGCACATAAT
 GAAGAACTAAAAGTTATACGTAAGGATATAGCAAAATGTGCAAGAACATTACCAAAT
 GCGTAAATCAACCAGATGATCCGTTAGCTAGAGTCGATGTATGGCATTGTGCTATGGC
 CAAGCGTGGCGTATATGACAACCCAGCTCCAGCTGTTATAAAAGAAAAAATTTTAA
 GTATGCTCCAAGATTATCACTGATCCCGCTAATGTCGAAAATTGCAAGAAAGTTATTT
 CTAGATGTGTAGATAGAGAGACTCAACGCCCAAGATCCAACAGACAGAAAGCAGTTAA

รูปที่ 4.2.12 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ในรูปที่ 4.2.11 เมื่อใช้ F₁R₅ เป็น primer ลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างล่างได้ตัดส่วนของ vector ออกไปแล้ว

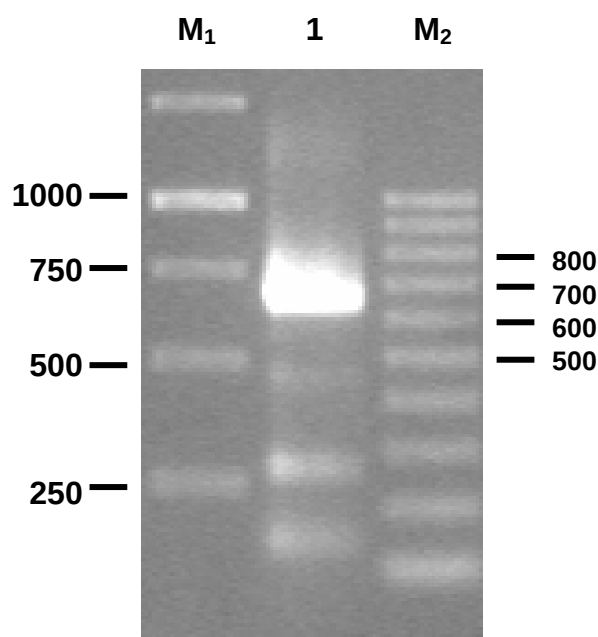


GTCCTTCGTGCTTGCTACATGTCTGCTAGTTTTTTCGCGCAAATGATTTACGCAGATAC
 TGAAGGACGAAAAATTCTACGTAAAGATATAGCTGAATGTGCAAGAACATTACCAA
 ATGCGTAAATCAACCAGATGATCCGTTAGCTAGAGTCGATGTATGGCATTGTGCTTT
 GGCCAAGGGTGGCGTATTTGATGACCCAGATCCAGCTGCTATAAAAAAAGATGAT
 AAATATTGCGCCATAGCTATCACTGATCCCGCTAATGTCGAAAATTGCAAGAAAGTT
 GTTCTAATGTGTAGATAAGAGACTCAACGCCCAAGATCCAACAGACAGATAGCATT
 AAAATATAATAGCATGTGTTGTAAGAGCTGGTGTGGCGGAGACTACAGTGCTAGCCC
 GTAAAAATGAGACCAC

รูปที่ 4.2.13 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ในรูปที่ 4.2.11 เมื่อใช้ F_1R_8 เป็น primer ลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างล่างได้ตัดส่วนของ vector ออกไปแล้ว

4.2.3.2 ผลการทำ 3'-RACE (Rapid amplification of 3' cDNA end)

ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่กำลังศึกษาอยู่นี้ยังขาดปลายด้าน carboxy ดังนั้นเพื่อให้ได้ลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้น จึงได้ทำการทดลองโดยใช้เทคนิค 3'-RACE โดยใช้ GSP คือ F₁, GTCCTTCGTGCTTGCTAC ผลการทดลองพบว่า ได้แถบขนาดราว 650 เบส เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis (รูปที่ 4.2.14) จากนั้น ได้นำ product ที่ได้ส่งไป clone แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 4.2.14 PCR product ของยีนที่กำลังศึกษาอยู่ในนมดกคันไฟไทย (*S. geminata*) โดยใช้ F₁ และ AUAP เป็น primer

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ (รูปที่ 4.2.15) ไปหาร้อยละความเหมือน (% homology) กับโปรตีนอื่นในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blastn ซึ่ง access online ได้ (รูปที่ 4.2.16) พบว่า มีความเหมือนกับ Sol g 4 ซึ่งเป็น allergen ในน้ำพิษมดคันไฟ (*S. geminata*) ที่มีรายงานมาแล้วถึงร้อยละ 94 แสดงว่า โปรตีนที่ได้เป็น isoform กับ Sol g 4 และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ Sol g 4 (รูปที่ 4.2.17) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนอื่น ๆ (รูปที่ 4.2.18) พบว่า เหมือนกับ Sol g 4 และ Sol i 4 (allergen จากน้ำพิษของ *S. invicta*) เกินร้อยละ 90 และยังคงคล้ายกับ allergen Sol i 2 และ Sol g 2 เกินร้อยละ 60 อีกด้วย ดังนั้น โปรตีนชนิดนี้จึงตั้งชื่อว่า **Solgem 4**

จากนั้น นำไป deduce เป็นลำดับกรดอะมิโน (รูปที่ 4.2.19) พบว่า ได้เส้นโพลีเปปไทด์มีความยาว 132 กรดอะมิโน โดยที่ 17 ตัวแรกเป็น leading sequence ถ้าหากตัด leading sequence ออกไป แล้วนำไปคำนวณค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลด้วยโปรแกรม Expasy พบว่ามีค่า pI = 9.76 และมีน้ำหนักโมเลกุล = 13275.84 ดาลตัน ซึ่งค่า pI ที่ได้มีความใกล้เคียงกับที่วิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE มาก คือ 9.77 (รูปที่ 4.2.4) และค่าน้ำหนักโมเลกุลก็ใกล้เคียงกับที่วิเคราะห์ด้วย MALDI TOF Mass

spectroscopy มาก คือ 13273.435 ดาลตัน (รูปที่ 4.2.22) จึงเชื่อว่า ลำดับกรดอะมิโนของเส้นโพลีเปปไทด์นี้ถูกต้อง และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปค้นหาความเหมือนกับโปรตีนอื่น (รูปที่ 4.2.20 และรูปที่ 4.2.21) พบว่าเหมือนกับ Sol g 4 ด้วยคะแนนสูงมาก และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอื่น ๆ (รูปที่ 4.2.22) พบว่า เหมือนกับ Sol g 4 และ Sol i 4 เกินร้อยละ 70 และยิ่งคล้ายกับ allergen Sol i 2 ราวร้อยละ 40 อีกด้วย

GTCCTTCGTGCTTGCTACATGTCTGCTAGTGTTTACGCAGATAATTTACGCAGCTGATATT
AAGGAAATAAATATCATGAATAGAATTTTAGAAAAATGTATAAAAACAGTACCAAAAGGCG
AAAATGATCCAATAAATCCTTTGAGAAGAGTCAATGTGTGGTATTGTACACTCACTAAGCG
TGGCATATTTACTCCAAAAGGTGTAAATACGAAACAATATATTAGCTATTGCGAAAAGACG
ATCATTAATCCTGCTAATATAAAACAGTGCAAGAAATTAGTTTCTAAATGCATAAAGAAAG
TGTATGACCGCCCGGGACCAATCATTGAGAGAAGCAAAAAT**TTCT**ATTGTCATGTGTTATAA
AAAAGGGTGTGCTCGAATTGACAGTGTATGGC

รูปที่ 4.2.15 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากทำ 3'-RACE โดยการใช้ primer F1 เป็น gene specific primer (GSP) พบว่า ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 380 ลำดับ ชีดเส้นใต้สีแดง คือ ตำแหน่งจับของ primer

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

(Click headers to sort columns)

AF230383.1	Solenopsis geminata venom allergen Sol g 4.01 precursor mRNA, complete cds	614	614	99%	1e-172	94%
AF230384.1	Solenopsis geminata venom allergen Sol g 4.02 precursor mRNA, complete cds	597	597	99%	1e-167	93%
AF103805.1	Solenopsis invicta venom allergen Sol i 4 precursor, mRNA, complete cds	580	580	99%	1e-162	93%
AY963562.1	Solenopsis geminata queen venom protein Sol g IV precursor, mRNA, partial cds	575	575	99%	6e-161	92%
AF103806.1	Solenopsis invicta venom allergen Sol i 4.02 precursor, mRNA, complete cds	564	564	99%	1e-157	92%
AY963564.1	Solenopsis invicta queen venom protein Sol i IV precursor, mRNA, partial cds	558	558	99%	6e-156	92%
DQ016037.1	Solenopsis invicta allergen Sol i 1 precursor-like mRNA, complete sequence	490	490	86%	2e-135	92%
L09560.1	Fire ant venom protein (Sol i II) mRNA	99.0	99.0	42%	2e-17	78%
DQ342279.1	Solenopsis saevissima Sol s 2 allergen mRNA, complete cds	93.5	93.5	42%	8e-16	77%
AY963561.1	Solenopsis geminata queen venom protein Sol g II precursor, mRNA, partial cds	87.9	87.9	13%	4e-14	96%
AY963563.1	Solenopsis invicta queen venom protein Sol i II precursor, mRNA, partial cds	82.4	82.4	42%	2e-12	76%

รูปที่ 4.2.16 การหาร้อยละความเหมือน ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Solgem 4 กับโปรตีนอื่นในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blastn

```

>gb|AF230383.1|AF230383 Solenopsis geminata venom allergen Sol g 4.01 precursor mRNA,
complete cds
Length=414

Score = 614 bits (332), Expect = 1e-172
Identities = 376/397 (94%), Gaps = 3/397 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 3 CCTTCGTGCTTGCTACATGTCTGCTAGTGTTTACGCAGATAATTTACGCAGCTGATATTA 62
Sbjct 8 CCTTCGTGCTTGCTTTCATGTCTGCTAGTGTTTACGCAGATAATTTACGCAGTTGATATTA 67

Query 63 AGGAAATAAATATCATGAATAGAATTTTAGAAAAATGTATAAAAAACAGTACCAAAAGGCG 122
Sbjct 68 AGGAATTAAAAATTATGAATAGAATTTTAGAAAAATGTATAAGAACAGTACCAAAAGGCG 127

Query 123 AAAATGATCCAATAAATCCTTTGAGAAGA-GTCAATGTGTGGTATTGTACACTCACTAAG 181
Sbjct 128 AAAATGATCCAATAAATCCTTTAAAAA-ATGTCAATGTATTGTATTGTGCATTCTCTAAG 186

Query 182 CGTGGCATATTTACTCCAAAAGGTGTAAATACGAAACAATATATTAGCTATTGCGAAAAAG 241
Sbjct 187 CGTGGCATATTTACTCCAAAAGGTGTAAATACGAAACAATATATTAATACTATTGCGAAAAAG 246

Query 242 ACGATCATTAAATCCTGCTAATATAAAACAGTGCAAGAAATTAGTTTCTAAATGCATAAAG 301
Sbjct 247 ACGATCATTAAATCCTGCTGATATAAAACAGTGCAAGAAATTAATTCTAAATGCATAAAG 306

Query 302 AAAGTGATGACCGCCCGGGACCAATCATTGAGAGAAGCAAAAATTCTATTGTCATGTGT 361
Sbjct 307 AAAGTGATGACCGCCCGGGACCAATCATTGAGAGAAGCAAAAAT-CTATTGTCATGTGT 365

Query 362 TATAAAAAAGGGTGTGCTCGAATTGACAGTGTATGGC 398
Sbjct 366 TCTAAAAAAGGGTGTGCTCGAATTGACAGTGTATGGC 402

```

รูปที่ 4.2.17 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Solgem 4 กับ Sol g 4.01 ด้วยโปรแกรม Blastn

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 solgem4	398	2 solil1	1189	9
1 solgem4	398	3 solil2	605	67
1 solgem4	398	4 solil3	705	4
1 solgem4	398	5 solil4	414	92
1 solgem4	398	6 solg2	414	67
1 solgem4	398	7 solg4	408	92
2 solil1	1189	3 solil2	605	5
2 solil1	1189	4 solil3	705	2
2 solil1	1189	5 solil4	414	10
2 solil1	1189	6 solg2	414	9
2 solil1	1189	7 solg4	408	10
3 solil2	605	4 solil3	705	4
3 solil2	605	5 solil4	414	67
3 solil2	605	6 solg2	414	88
3 solil2	605	7 solg4	408	65
4 solil3	705	5 solil4	414	8
4 solil3	705	6 solg2	414	6
4 solil3	705	7 solg4	408	9
5 solil4	414	6 solg2	414	67
5 solil4	414	7 solg4	408	99
6 solg2	414	7 solg4	408	65

รูปที่ 4.2.18 การหาร้อยละความเหมือน ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Solgem 4 กับโปรตีนอื่นในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม ClustalW

```

GTCCTTCGTGCTTGCTACATGTCTGCTAGTGTTTACGCAGATAAATTTACGCA -1
S F V L A T C L L V F T Q I I Y A -1
GCTGATATTAAGGAAATAAATATCATGAATAGAATTTTAGAAAAATGTATA 51
A D I K E I N I M N R I L E K C I 17
AAACAGTACCAAAGGCGAAAATGATCCAATAAATCCTTTGAGAAGAGTC 102
K T V P K G E N D P I N P L R R V 34
AATGTGTGGTATTGTACTACTACTAAGCGTGGCATATTTACTCCAAAAGGT 153
N V W Y C T L T K R G I F T P K G 51
GTAAATACGAAACAATATATTAGCTATTGCGAAAAGACGATCATTAATCCT 204
V N T K Q Y I S Y C E K T I I N P 68
GCTAATATAAAACAGTGCAAGAAATTAGTTTCTAAATGCATAAAGAAAGTG 255
A N I K Q C K K L V S K C I K K V 85
TATGACCGCCCGGACCAATCATTGAGAGAAGCAAAAATCTATTGTCATG 306
Y D R P G P I I E R S K N L L S C 102
TGTTATAAAAAAGGGTGTGCTCGAATTGACAGTGTATGGCAA 345
V I K K G V L E L T V Y G K 116

```

รูปที่ 4.2.19 ผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Solgem 4 ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน ได้ 132 กรดอะมิโน โดยที่กรดอะมิโนที่เป็นลำดับคือ leading sequence ซึ่งมีขนาดรวม 17 ลำดับ

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
sp Q9NH75.1 VA4 SOLGE RecName: Full=Venom allergen 4; AltName...	211	3e-53
gb AAF65313.1 AF230384.1 venom allergen Sol g 4.02 precursor ...	206	5e-52
sp P35777.2 VA4 SOLIN RecName: Full=Venom allergen 4; AltName...	206	8e-52
gb AAY32927.1 queen venom protein Sol g IV precursor [Solenop...	204	3e-51
gb AAC97370.1 venom allergen Sol i 4.02 precursor [Solenopsi...	202	6e-51
gb AAY32929.1 queen venom protein Sol i IV precursor [Solenop...	202	7e-51
prf 1915279B allergen sol i IV	172	8e-42
gb AAY32926.1 queen venom protein Sol g II precursor [Solenop...	107	3e-22
gb AAY32928.1 queen venom protein Sol i II precursor [Solenop...	101	2e-20
sp P35775.1 VA2 SOLIN RecName: Full=Venom allergen 2; AltName...	101	2e-20
sp A5X2H7.1 VA2 SOLSV RecName: Full=Venom allergen 2; AltName...	99.4	9e-20
prf 1915279A allergen sol i II	75.9	1e-12
sp P35776.2 VA2 SOLRI RecName: Full=Venom allergen 2; AltName...	73.2	7e-12
ref ZP_02615019.1 putative surface protein [Clostridium botu...	35.0	2.4
ref YP_002804117.1 leucine rich repeat protein [Clostridium ...	35.0	2.5
ref YP_002862745.1 putative surface protein [Clostridium bot...	34.7	2.6
ref XP_382378.1 hypothetical protein FG02202.1 [Gibberella z...	34.7	3.0
ref NP_001122276.1 si:ch211-217k17.10 [Danio rerio] >gb AAI6...	34.3	4.4
ref XP_001240703.1 predicted protein [Coccidioides immitis R...	34.3	4.4
ref YP_001522341.1 hypothetical protein AM1_F0035 [Acaryochl...	33.5	7.4
ref ZP_02619727.1 ABC transporter permease protein [Clostrid...	33.5	7.6

รูปที่ 4.2.20 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Solgem 4 กับโปรตีนอื่นในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blastp

```
>sp|Q9NH75.1|VA4_SOLGE RecName: Full=Venom allergen 4; AltName: Full=Venom allergen
IV; AltName: Allergen=Sol g 4; Flags: Precursor
gb|AAF65312.1|AF230383_1 venom allergen Sol g 4.01 precursor [Solenopsis geminata]
Length=137

Score = 211 bits (536), Expect = 3e-53, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 102/124 (82%), Positives = 112/124 (90%), Gaps = 0/124 (0%)

Query 1 SFVLATCLLVFTQIIYAADIKEINIMNRILEKCIKTVPKGENDPINPLRRVNVWYCTLT 60
      +FVL +CLLVFTQIIYA DIKE+ IMNRILEKCI+TVPKGENDPINPL+ VNV YC +K
Sbjct 3 TFVLVSCLLVFTQIIYAVDIKELKIMNRILEKCIKTVPKGENDPINPLKNVNVLYCAFSK 62

Query 61 RGIFTPKGVNKQYIISYCEKTIINPANIKQCKKLVSCKIKKVYDRPGPIIERSKNSIVMC 120
      RGIFTPKGVNKQYI+YCEKTIINPA+IKQCKKL+SKCIKKVYDRPGPIIERSKN +
Sbjct 63 RGIFTPKGVNKQYINYCEKTIINPADIKQCKKLISKCIKKVYDRPGPIIERSKNLLSCV 122

Query 121 YKKG 124
      KKG
Sbjct 123 LKKG 126
```

รูปที่ 4.2.21 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Solgem 4 กับ Sol g 4.01 ด้วยโปรแกรม Blastp

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
1	solgemII	132	2	soli1	346	6
1	solgemII	132	3	soli2	138	39
1	solgemII	132	4	soli3	234	7
1	solgemII	132	5	soli4	137	75
1	solgemII	132	6	solg4	137	77
2	soli1	346	3	soli2	138	4
2	soli1	346	4	soli3	234	4
2	soli1	346	5	soli4	137	7
2	soli1	346	6	solg4	137	6
3	soli2	138	4	soli3	234	4
3	soli2	138	5	soli4	137	41
3	soli2	138	6	solg4	137	42
4	soli3	234	5	soli4	137	5
4	soli3	234	6	solg4	137	5
5	soli4	137	6	solg4	137	89

soli4	-----MKTFLVLSCLLVFTQIIYALDIKEIS-----IMNRILEKCIKT	38
solg4	-----MKTFLVLSCLLVFTQIIYAVDIKELK-----IMNRILEKCIKT	38
solgemII	-----SFVLATCLLVFTQIIYAADIKEIN-----IMNRILEKCIKT	36
soli2	-----MKSFVLATCLLGFQAIIYA-DNKELK-----IIRKIDVAECLRT	37
soli1	NLGNQQSCQDINASLPVVFITHGFTSSAQVSTFKDLANAFVQKGHTAFIVDWSEAACTDG	120
soli3	-----PTPGMCLEYSNVGFTDAEKDAIVNKHN-----ELRQVVASGKEM	85
	.. : *.. .. :	

soli4	VPKRENDP---INPLRRNVNVWYCAFTKR---GIFTPKG--VNTKQYIN--YCEKTAISPA	88
solg4	VPKGENDP---INPLKNVNVLYCAFSKR---GIFTPKG--VNTKQYIN--YCEKTIINPA	88
solgemII	VPKGENDP---INPLRRNVNVWYCTLTKR---GIFTPKG--VNTKQYIS--YCEKTIINPA	86
soli2	LPKCGNQF---DDPLARVDVWHCAMAKR---GVYDNPDPFAVIKERSMK--MCTKIITDPA	89
soli1	LPGVQFAE---YNAAASNTYDIGQLMAKYTVDLMNCKIPLNNIQYVG--HSLGSHVCGF	175
soli3	RGTINGPQPPAVKMPNLTWDFELATIAQRWANQCTFEHDACRNVERFAVGQNIATSSSGK	145
	. : :	

soli4	DINLCKNIASKCVKGVYDRPGPIIERSKNLLSCVLKNGVLELTVYGKKK-----	137
solg4	DINQCKNLISKCIKKVYDRPGPIIERSKNLLSCVLKNGVLELTVYGKKK-----	137
solgemII	NIKQCKNLVSKCIKKVYDRPGPIIERSKNSIVMCYKNGCARIDSVW-----	132
soli2	NVENCHKVASRCVDRTEQGFKNRQKAVNIIGCALRAGVAETTVLARKK-----	138
soli1	AAKHVKNLINKTMPYIILALDFADPSFGSNKCGERICKSDAKRIVVFKTSILGIGENIGH	235
soli3	NKSTPNEMILLWYNEVVKDFDNRWISSPSSDDNILLKGVGHYTVQVWAKTTKIGCGR----	201
	- : : - - - -	

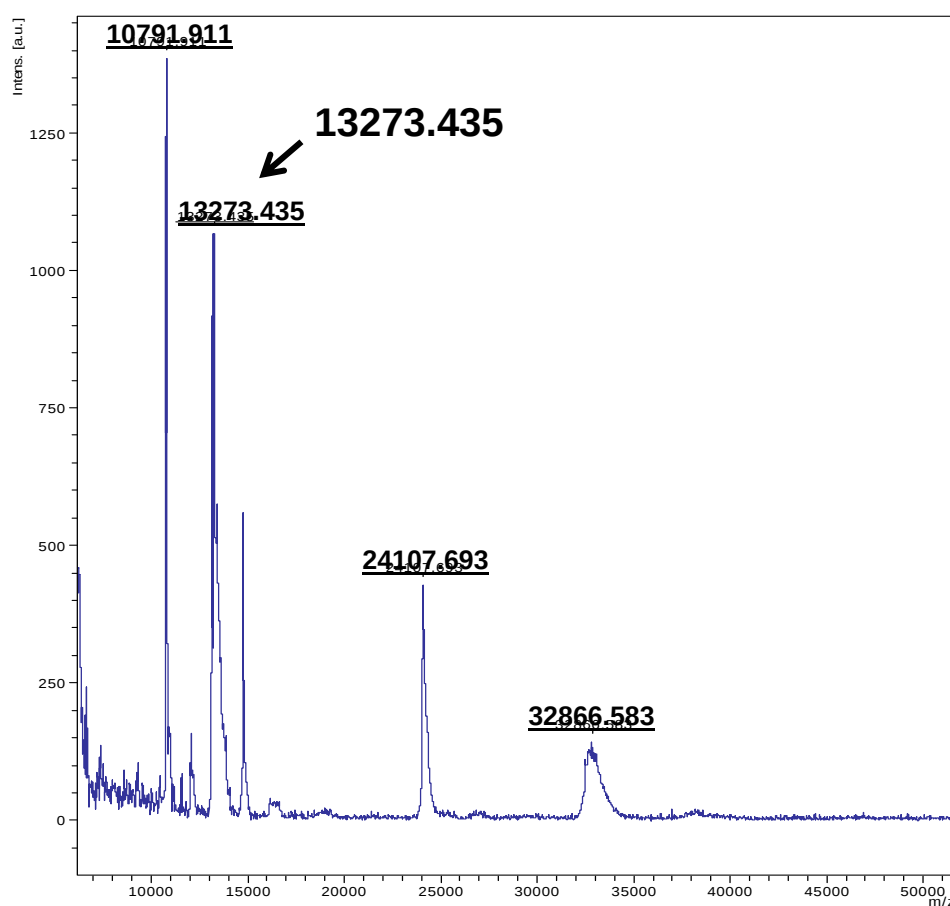
รูปที่ 4.2.22 การหาร้อยละความเหมือน (บน) และ การเปรียบเทียบ (ล่าง) ลำดับกรดอะมิโนของ Solgem II กับโปรตีนอื่นในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม ClustalW

4.2.3.3 การวิเคราะห์มวลของ Solgem 4 ด้วย MALDI-TOF Mass spectroscopy

เพื่อให้แน่ใจว่า sequence ที่ได้ถูกต้อง จึงได้นำน้ำพิษของมดคันไฟ เมื่อนำไปหามวลด้วยการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF Mass spectroscopy ที่สถาบันจีโนม สวทช. พบ 4 peak ใหญ่ คือ 10791, 13273, 24107 และ 32866 ดาลตัน (รูปที่ 4.2.22 และตารางที่ 4.2.4) พบว่า มวลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF Mass spectroscopy มีค่าแตกต่างจากมวลที่ได้ตามทฤษฎีเพียง 2 ดาลตัน (13573 ดาลตัน) จึงเชื่อว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้นั้นถูกต้องแล้ว ตามตารางที่ 4.2.5

ตารางที่ 4.2.4 ผลการวิเคราะห์พิษมดคันไฟด้วย MALDI-TOF Mass spectroscopy

m/z	SN	Res.	Intens.	Area
10791.911	29	1263	1387.68	21038
13273.435	28.6	1132	1067.53	24649
14766.537	16.7	1178	562.23	11835
24107.693	32	769	426.49	17463
32866.583	14.6	4476	130.62	2151



รูปที่ 4.2.22 Profile ของการวิเคราะห์พิษมดคันไฟด้วย MALDI-TOF Mass spectroscopy พบ 4 peak หลัก

ตารางที่ 4.2.5 แสดงสรุปค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของ Solgem 4 เปรียบเทียบกันระหว่างที่คำนวณได้ทางทฤษฎี กับที่หาได้จริงจากการนำไปวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS

parameter	pI	Molecular weight
theoretical	9.76*	13275.84*
practical	9.77**	13273.43***

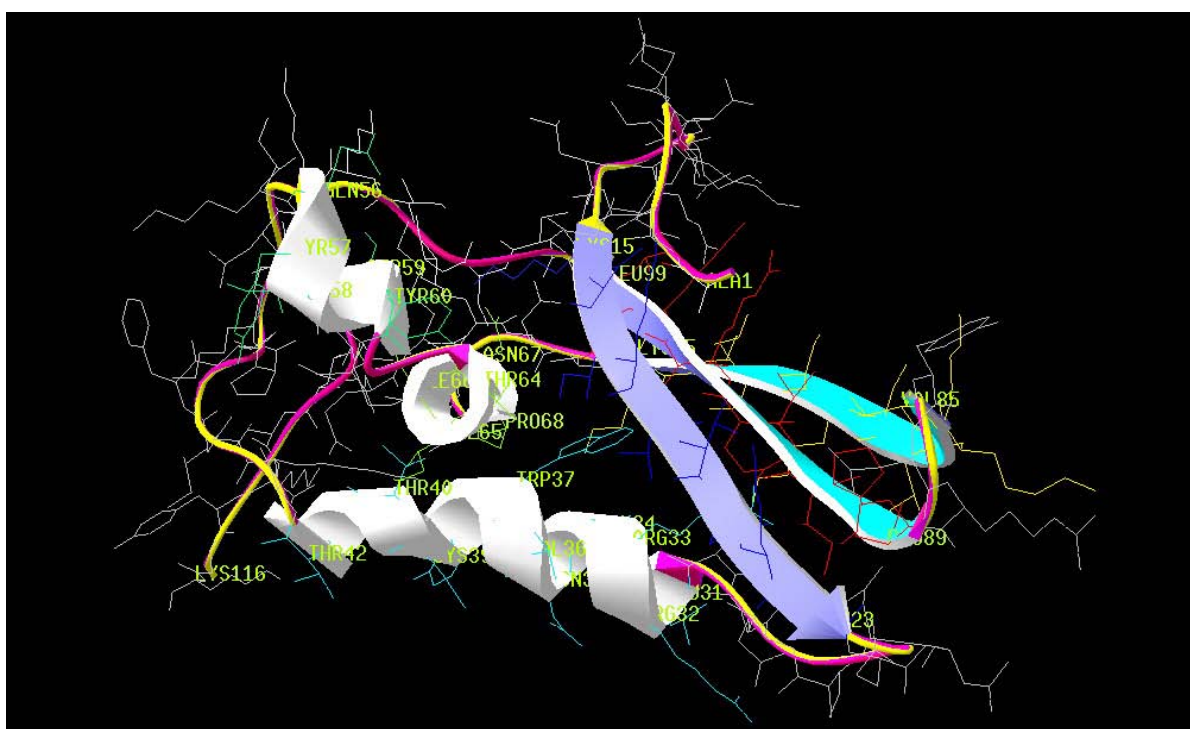
* จากรูปที่ 4.2.19

** จากการวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE ในรูปที่ 4.2.4

*** จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ในรูปที่ 4.2.22

4.2.3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของ Solgem 4 ด้วย DeepView / Swiss-PdbViewer 3.7 software

จากการหาโครงสร้างสามมิติของ Solgem 4 (รูปที่ 4.2.23) พบว่ามี 3 alpha helixs คือ (1) Leu31 ถึง Thr42, (2) Gln56 ถึง Thr60, และ (3) Thr64 ถึง Pro68 และ 3 beta strands คือ (1) Lys15 ถึง Gly23, (2) Lys75 ถึง Val85, และ (3) Pro89 ถึง Leu99 และยังประกอบขึ้นจาก cysteine 6 residue ซึ่งสร้างได้ 3 disulfide bridge เนื่องจากปัจจุบันโปรตีน Solgem 4 และโปรตีนในกลุ่มเดียวกันยังไม่ทราบฤทธิ์แน่นอน ทราบแต่เพียงว่าเป็น allergic protein ดังนั้น จำเป็นต้องวิเคราะห์ความสำคัญของโครงสร้างเหล่านี้ต่อไป

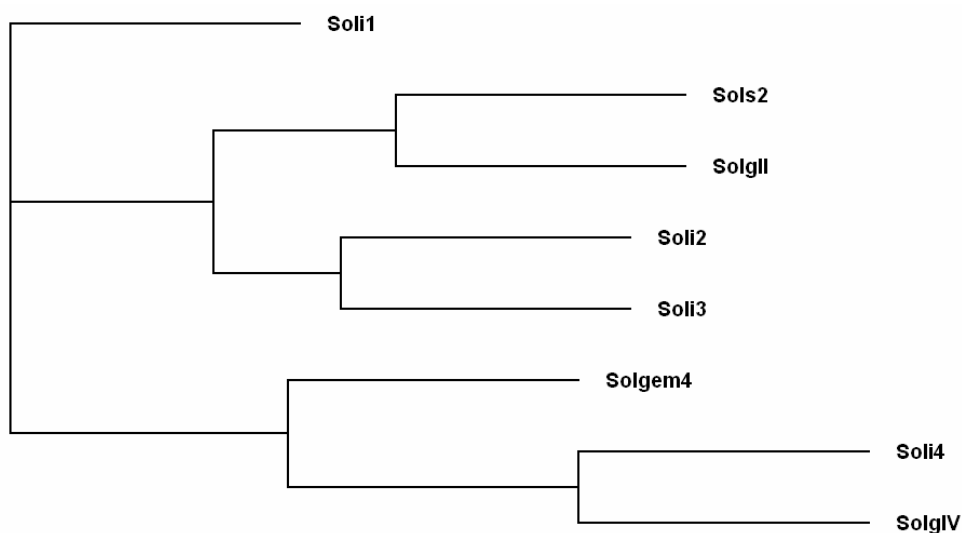


10 20 30 40 50 60
 ADIKEINIMNRILEKCIKTVPKGENDPINELRRVNVWYCTLT~~TK~~RGIFT~~PK~~GVNTKQYISY
 70 80 90 100 110 116
 CEKTIIN~~PA~~NIKQCKKL~~VSK~~CIKKVYDRPGPIIERSKNL~~LS~~CVIKKGVLELT~~VY~~GK

รูปที่ 4.2.23 แสดงโครงสร้างสามมิติของ Solgem 4 วิเคราะห์ด้วย DeepView / Swiss-PdbViewer 3.7 software พบว่า มี 3 alpha helix (เน้นด้วยสีชมพู) และ 3 beta strands (เน้นด้วยสีเขียว)

4.2.3.5 การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของ Solgem 4 โดยใช้ PHYLIP program

จากการ วิเคราะห์ Phylogenetic tree ของ Solgem 4 โดยใช้ PHYLIP program (Phylogeny Inference Package version 3.69) (รูปที่ 4.2.24) พบว่า Solgem 4 มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ใกล้ชิดกับ Sol g IV และ Sol i 4 ซึ่งเป็น protein ในกลุ่ม allergen ในน้ำพิษมดคันไฟสายพันธ์ต่าง ๆ



รูปที่ 4.2.24 แสดง Phylogenetic tree ของ Solgem 4 โดยใช้ PHYLIP program โดยที่ Sol i มาจาก น้ำพิษของ *Solenopsis invicta* (red imported fire ant), Sol g มาจาก *Solenopsis geminata* (tropical fire ant) และ Sol s มาจาก *Solenopsis saevissima* (black fire ant)

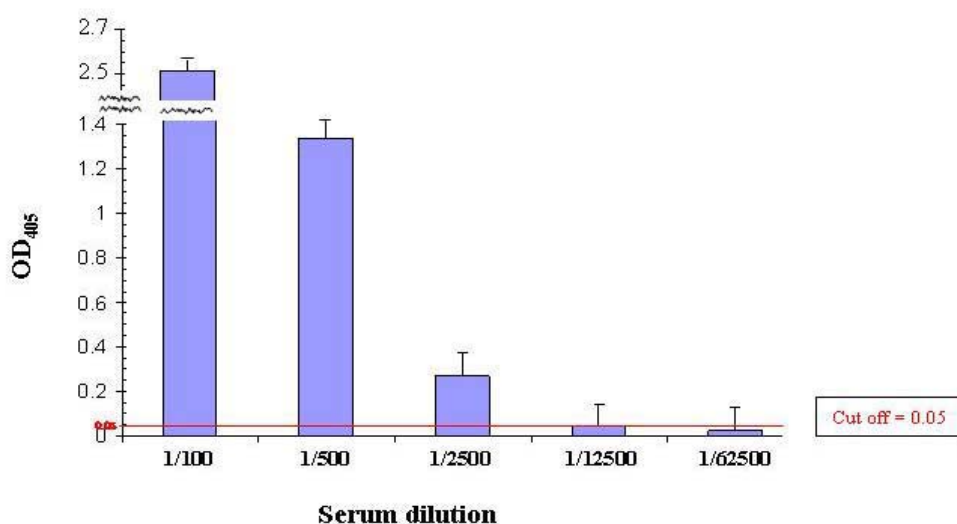
4.2.4 การสร้างแอนติบอดีต้านต่อ Solgem 2 (anti-Solgem 2 antibody)

Solgem 2 ซึ่งมีฤทธิ์เป็น allergen ถูกนำไปกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูถีบจักร แล้วทำการตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี ELISA (ตารางที่ 4.2.6 และรูปที่ 4.2.25) พบว่าให้ค่าไตเตอร์อยู่ระหว่าง 1:2500 ถึง 1:12500 จึงทำการตรวจความจำเพาะด้วยวิธี Western immunoblotting (รูปที่ 4.2.26) พบว่าให้ค่าไตเตอร์สูงถึง 1:1000 และมีความจำเพาะสูง คือจับแต่เฉพาะ Solgem 2 ไม่พบการจับกับโปรตีนอื่นเลย

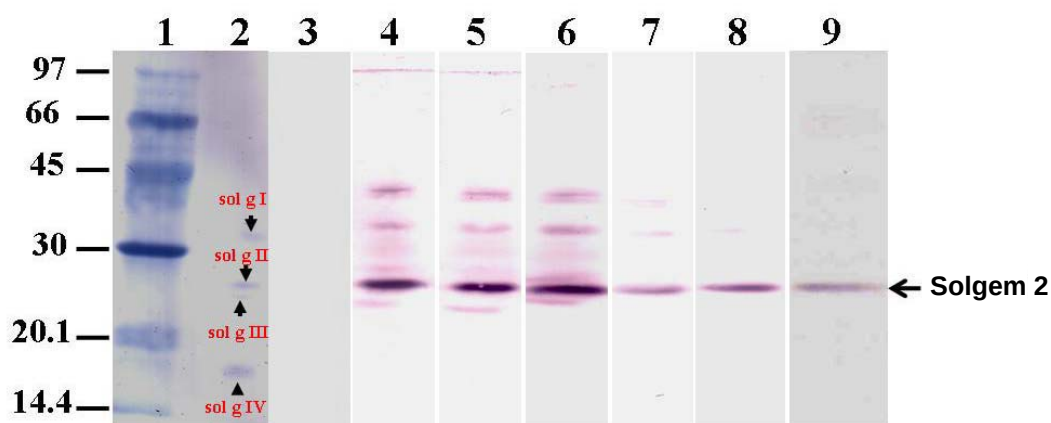
ผลของการใช้ anti-Solgem 2 antibody เพื่อลดล้างพิษของ Solgem 2 พบว่า น้ำพิษมดคันไฟให้ค่า PD_{50} เท่ากับ 0.18 mg ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม (ตารางที่ 4.2.7 และรูปที่ 4.2.27) แต่เมื่อผสมแอนติบอดีลงไป พบว่า หากมีแอนติบอดีอยู่ในปริมาณ 0.18 mg จะต้องใช้แอนติเจนถึง 0.90 mg จึงจะทำให้จิ้งหรีดเป็นอัมพาตครึ่งหนึ่ง (ตารางที่ 4.2.8) จึงคาดว่าแอนติบอดีสามารถลดล้างพิษได้ จริง ๆ แล้วฤทธิ์ของพิษมดส่วนใหญ่แล้วมาจากฤทธิ์ของ piperidine derivatives ซึ่งมีสัดส่วนเกิน 90% ในน้ำพิษ ดังนั้นจึงคาดว่า Solgem 2 นอกจากจะมีฤทธิ์เป็น allergen แล้ว น่าจะมีฤทธิ์ช่วยในการแพร่กระจายของ piperidine derivatives ด้วย ดังนั้น การสร้างเซรุ่มอาจไม่จำเป็นต้องสร้างต่อน้ำพิษทั้งหมด เพียงสร้างต่อ Solgem 2 ก็อาจได้ประสิทธิภาพสูงพอที่จะป้องกันพิษของน้ำพิษได้

ตารางที่ 4.2.6 การตรวจไตเตอร์ของ anti-Solgem 2 antibody ด้วยเทคนิค ELISA

Serum dilution				
1:100	1:500	1:2500	1:12500	1:62500
2.564	1.336	0.272	0.043	0.027



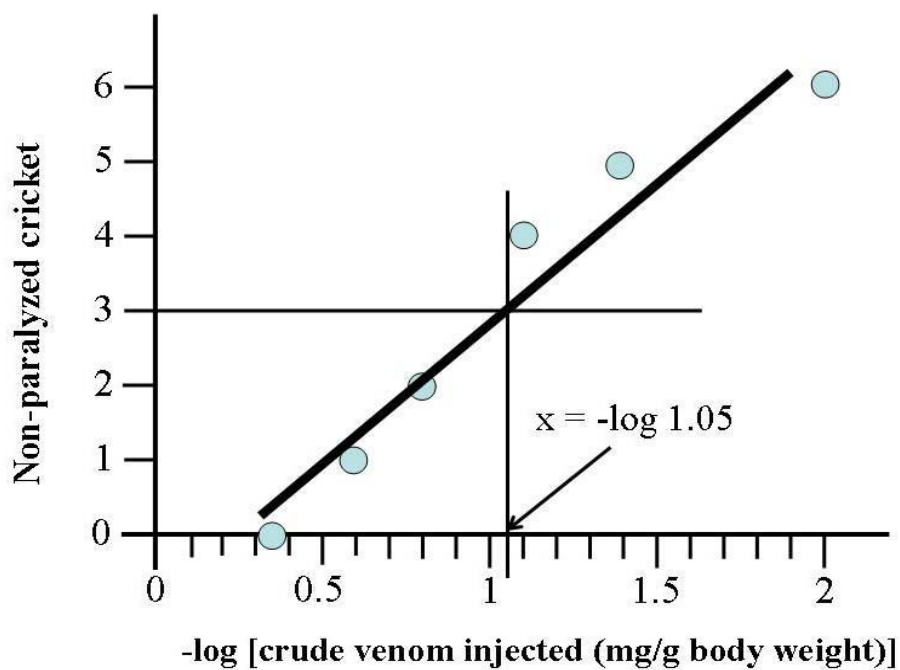
รูปที่ 4.2.25 แสดงค่าการตรวจไตเตอร์ของ anti-Solgem 2 antibody ด้วยเทคนิค ELISA



รูปที่ 4.2.26 การตรวจความจำเพาะของ anti-Solgem 2 antibody ที่ผลิตได้ในหนูถีบจักรด้วยวิธี Western immunoblotting (Lane 1, molecular weight marker, Lane 2, crude venom ย้อมด้วย amido black, Lane 3, preimmunized serum, Lane 4-9 คือซีรัมที่มีค่าการเจือจาง 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 และ 1:1000 ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.2.7 ปริมาณน้ำพิษของ *S. geminata* ที่ใช้แล้วทำให้จิ้งหรีด (*Gryllus* sp.) เป็นอัมพาต

ปริมาณน้ำพิษมดคันไฟที่ฉีด (mg/g body weight)	จำนวนของ paralyzed crickets / total crickets ภายหลังฉีดด้วยน้ำพิษ <i>S. geminata</i>
0.01	0 / 6
0.04	1 / 6
0.08	2 / 6
0.15	4 / 6
0.26	5 / 6
0.43	6 / 6



รูปที่ 4.2.27 กราฟแสดงค่า Paralytic Dose 50 (PD₅₀) ของน้ำพิษมดคันไฟในจิ้งหรีด (*Gryllus* sp.)

ตารางที่ 4.2.8 ตารางแสดงค่าจำนวนจิ้งหรีดเป็นอัมพาตต่อจำนวนรอดชีวิต ของภายหลังได้รับน้ำพิษมดคันไฟเมื่อผสมกับแอนติบอดี

ปริมาณน้ำพิษที่ฉีด : ปริมาณแอนติบอดี (mg/g body weight)	จำนวนของ paralyzed crickets / total crickets ภายหลังฉีดด้วยน้ำพิษผสมกับแอนติบอดี
0.18 : 0.18	0 / 6
0.90 : 0.18	3 / 6

ตอนที่ 4.3 รูปแบบโปรติโอมส์ของโปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสือ (*Vespa affinis*) การทำ
บริสุทธิ์, การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออก
ฤทธิ์ในน้ำพิษ และการผลิตแอนติบอดีต้านพิษ

4.3.1 ต่อหัวเสือ และการริดพิษ

ต่อหัวเสือได้จากหมู่บ้านเชียงเซา ตำบลบ้านเอื้อง อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม โดยมี
คุณพงษ์ศักดิ์ ลานนท์ เป็นหัวหน้าทีมจับตัวต่อหัวเสือ เป็นผู้รับการติดต่อ ต่อหัวเสือนับได้ว่าเป็น
แมลงที่มีอันตรายมาก หากถูกต่อยเพียงแมตัวเดียว ก็อาจเสียชีวิตได้ หมู่บ้านเชียงเซาแห่งนี้เลี้ยงต่อ
อันตรายนี้ไว้ในหมู่บ้าน ในสวนหลังบ้านของตน และโดยรวมแล้วทั้งหมู่บ้าน มีรังต่อหัวเสืออยู่ไม่น้อย
กว่า 10 รัง แต่ละรังมีขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.3.1) มีจุดประสงค์เพื่อนำเอาตัวอ่อนของต่อมาทำอาหาร
รับประทานกัน คณะของคุณพงษ์ศักดิ์เคยออกรายการ “เรื่องจริงผ่านจอ” ที่ออกอากาศทางทีวีช่อง 7
มาแล้วเมื่อราวกลางปี 2549 เมื่อคราวที่ทีมงานเรื่องจริงผ่านจอได้ไปสัมภาษณ์และถ่ายทำวิธีการเลี้ยง
และการเก็บตัวอ่อน



รูปที่ 4.3.1 รังต่อหัวเสือที่ชาวบ้านเลี้ยงไว้ในหมู่บ้านเชียงเซา ตำบลบ้านเอื้อง อำเภอศรีสงคราม
จังหวัดนครพนม



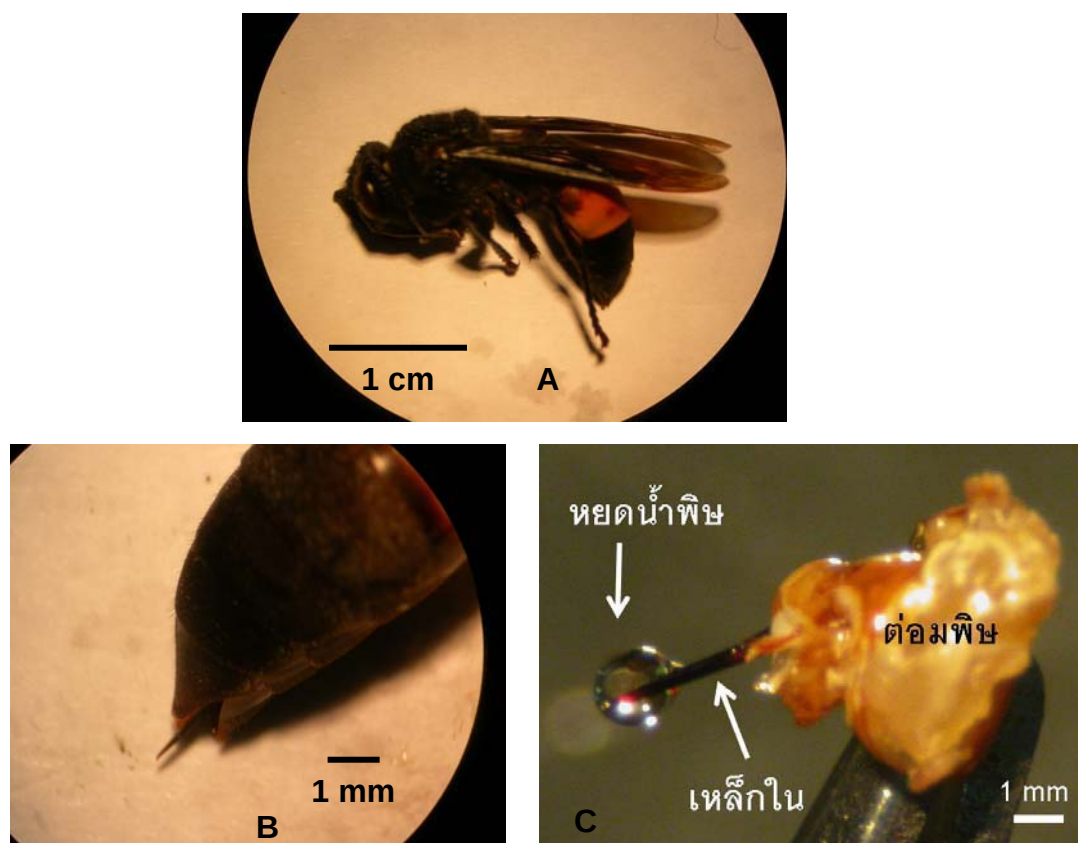
รูปที่ 4.3.2 ทีมชาวบ้านผู้เชี่ยวชาญในหมู่บ้านเชียงเซา ตำบลบ้านเอื้อง อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนมกำลังช่วยเก็บตัวต่อหัวเสือในรังขนาดใหญ่ในชุดพิเศษที่ประดิษฐ์ขึ้นเองด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่น

วิธีการเก็บน้ำพิษ ก็คือ ในครั้งแรก ๆ ที่ไปติดต่อกับคณะของคุณพงษ์ศักดิ์ วิธีการเก็บตัวต่อจะนำเอาน้ำมันเบนซินไปอุดรูทางเข้าออกของรังต่อ ผู้ที่ทำได้ต้องเชี่ยวชาญ และมีการป้องกันตัวอย่างดี (รูปที่ 4.3.2) เมื่อสลบ ก็จะใช้โกยมาใส่ถังน้ำแข็งให้เรา ทางเราเมื่อรับมาจะนำมาที่ห้องวิจัย ในสภาพแช่เย็น จะจัดการตัดปีกทันที เพื่อมิให้บินไปทำอันตรายผู้ใดได้ แต่น้ำพิษที่ได้มีปริมาณน้อยมาก เหตุเนื่องจากต่อเกิดอาการตกใจและปลดปล่อยน้ำพิษทิ้งไปหมด ต่อมา ได้เปลี่ยนวิธีใหม่ โดยการเก็บตัวต่อในตอนกลางคืน ค่อย ๆ นำเอาถุงขนาดใหญ่ไปสวมทั้งรัง แล้วนำลงถึงน้ำแข็ง เมื่อต่อสลบแล้วจึงค่อย ๆ เก็บเอาตัวต่อออกมา วิธีการนี้ ทำให้รังต่อค่อย ๆ เย็นลง ต่อไม่ตกใจ จึงได้น้ำพิษมากพอจะทำงานได้

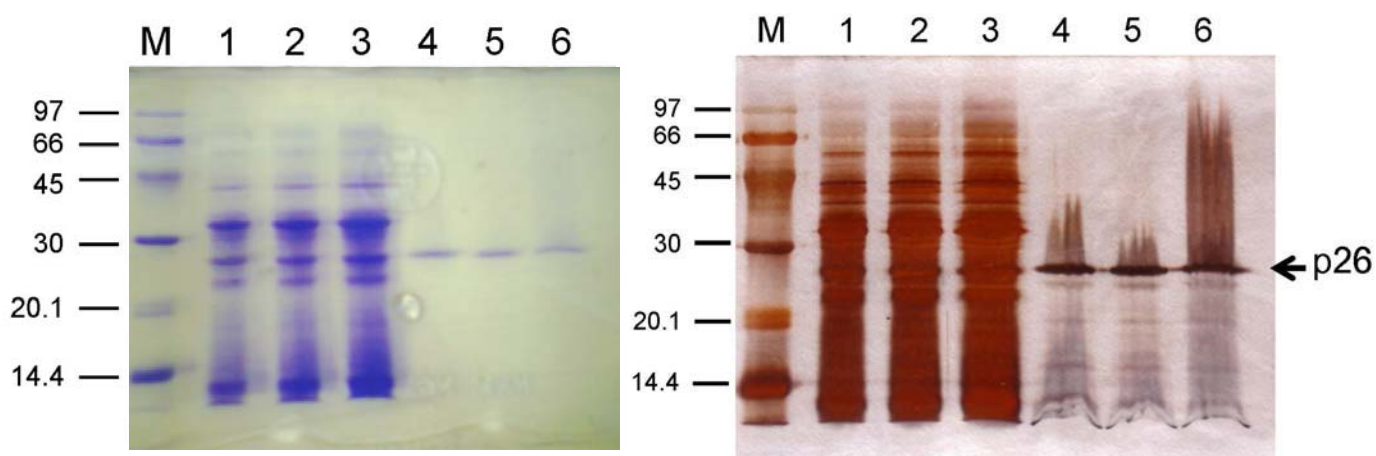
ตัวต่อเต็มวัยมีขนาดใหญ่กว่า 2 ซม. (รูปที่ 4.3.3A) การรีดพิษจะใช้เข็มดึงเอาเหล็กในที่อยู่ที่กัน (รูปที่ 4.3.3B) ต่อมพิษก็จะหลุดออกมา (รูปที่ 4.3.3C) และเมื่อบีบต่อมพิษด้วยเข็ม จะเห็นน้ำพิษหยดออกมา พบว่า ต่อ 1 ตัวให้น้ำพิษราว 5-10 ไมโครลิตร

4.3.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสือ

เมื่อนำสารสกัดจากต่อมพิษ (gland extract) และน้ำพิษ (crude venom) จากต่อหัวเสือ มาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 13% polyacrylamide gel พบว่าใน gland extract (รูปที่ 4.3.4 lane 1, 2 และ 3) ซึ่งเตรียมโดยนำ supernatant จากการนำต่อมพิษมาบดด้วย homogenizer แล้วนำไปปั่นที่ 5000g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา จะพบแถบจำนวนมาก ส่วนในน้ำพิษ (crude venom) (รูปที่ 4.3.4 lane 4, 5 และ 6) จะพบแถบโปรตีนไม่กี่แถบ ซึ่งแถบหลักแถบหนึ่งคือที่มีขนาดราว 26 kDa

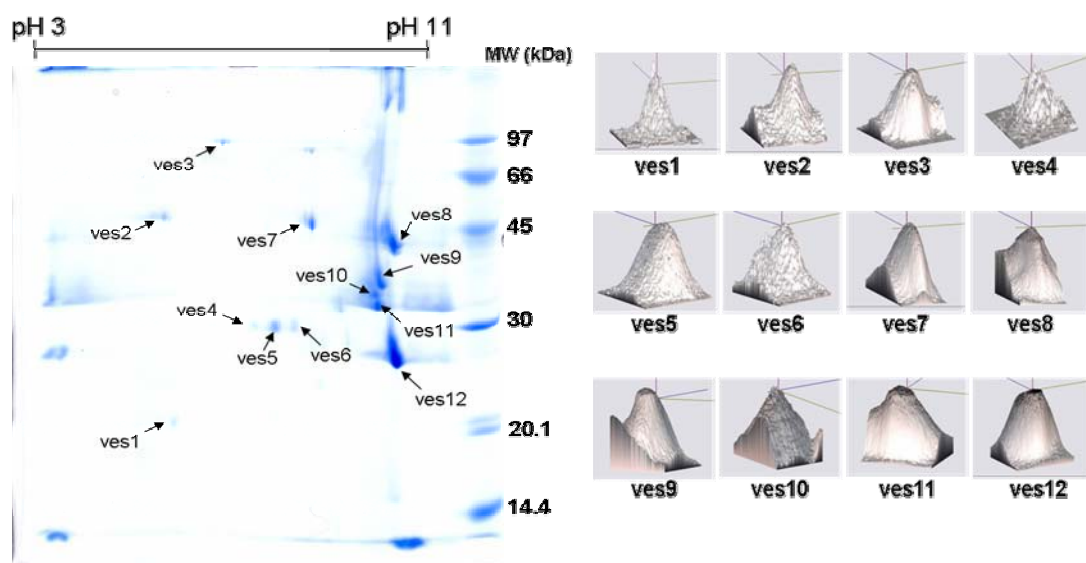


รูปที่ 4.3.3 ตัวต่อหัวเสือ (A) และการรีดน้ำพิษ (B และ C) จะเห็นเหล็กไนที่ก้นของตัวต่อ (B) เมื่อตึงเหล็กไนจะมีต่อมพิษติดออกมามีน้ำพิษอยู่ภายใน (C)



รูปที่ 4.3.4 โปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสือ ภายหลังจาก run 13% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie blue (รูปซ้าย) หรือ Silver staining (รูปขวา) (lane M คือ marker, 1, 2 และ 3 คือ gland extract ส่วน lane 4, 5 และ 6 crude venom)

ต่อมา ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี 2D-PAGE โดยใช้ strip 7 เซนติเมตร pH 3-11 nL พบว่า spot หลักของโปรตีนในน้ำพิษมีสี 12 spot มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ประมาณ 20-91 kDa และมีค่า pI ตั้งแต่ 5.3-10.2 (รูปที่ 4.3.5 และตารางที่ 4.3.1) จากนั้นตัด spot ที่ได้ส่งทำ peptide mass fingerprint ด้วย MALDI-TOF MS (รูปที่ 4.3.6) และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Mascot ในฐานข้อมูล Swissprot พบว่า spot VA2 มีคะแนนความเหมือนกับ ovalbumin ของไข่ไก่ (*Gallus gallus*) ถึง 87 คะแนน (รูปที่ 4.3.7) และเมื่อนำไปตรวจสอบการจับกับ anti-ovalbumin antibody ด้วยวิธี Western immunoblotting พบแถบและ spot ของ ovalbumin ทั้งโดยการทำ SDS-PAGE-immunoblotting และ 2D-PAGE-immunoblotting (รูปที่ 4.3.8 และ 4.3.9) จึงคาดว่า spot VA2 น่าจะมีส่วนคล้ายคลึงกับ ovalbumin

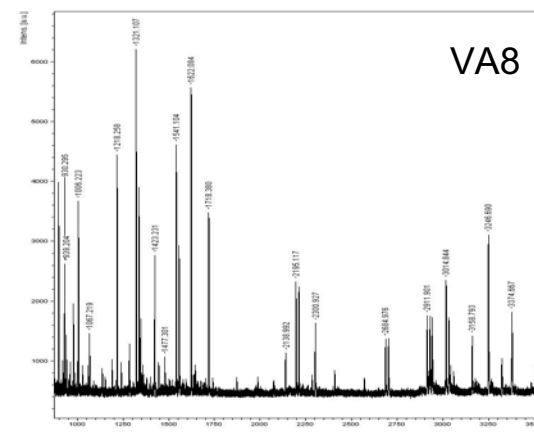
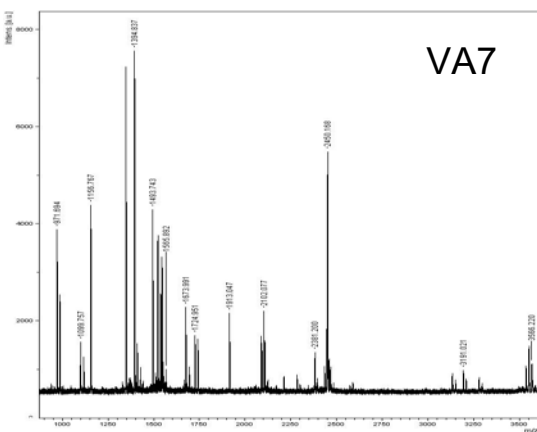
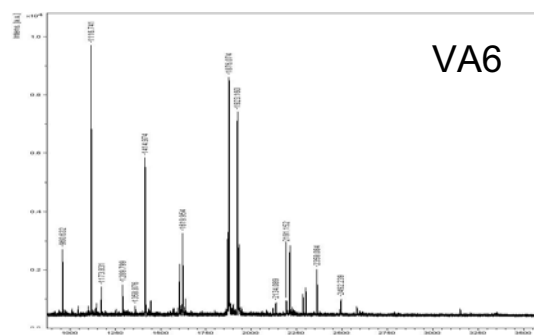
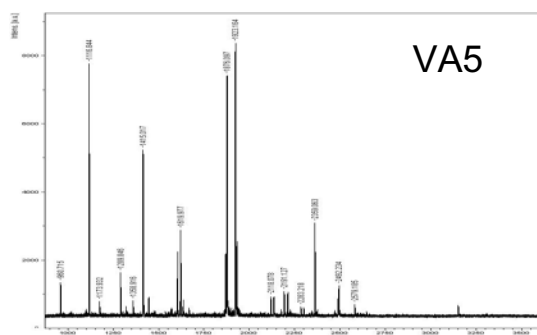
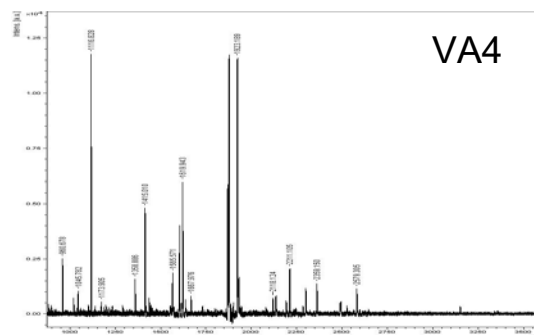
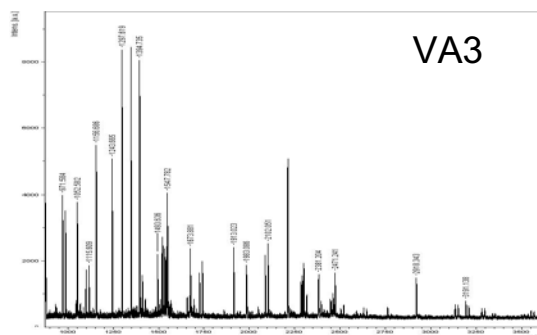
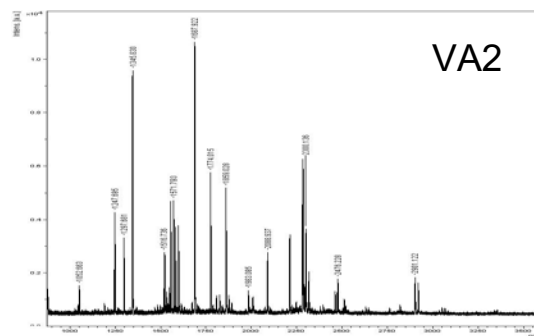
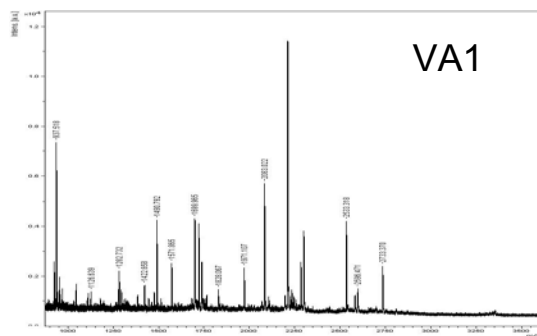


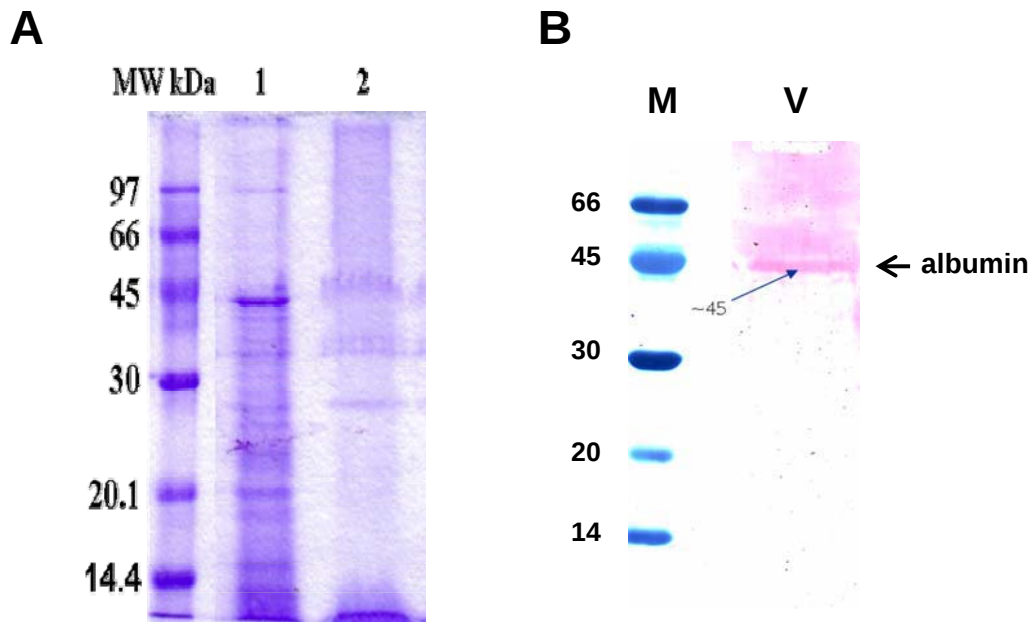
รูปที่ 4.3.5 (รูปซ้าย) ผลการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำพิษด้วย 2D-PAGE พบ รว 12 major spot คือ VA1-VA12 ซึ่งมีค่า pI 5.34-10.20 และน้ำหนักโมเลกุลราว 20-91 kDa (รูปขวา) ผลของการวิเคราะห์ spot ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D platinum (ves คือ VA)

ตารางที่ 4.3.1 แสดงค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของ spot VA1-VA12

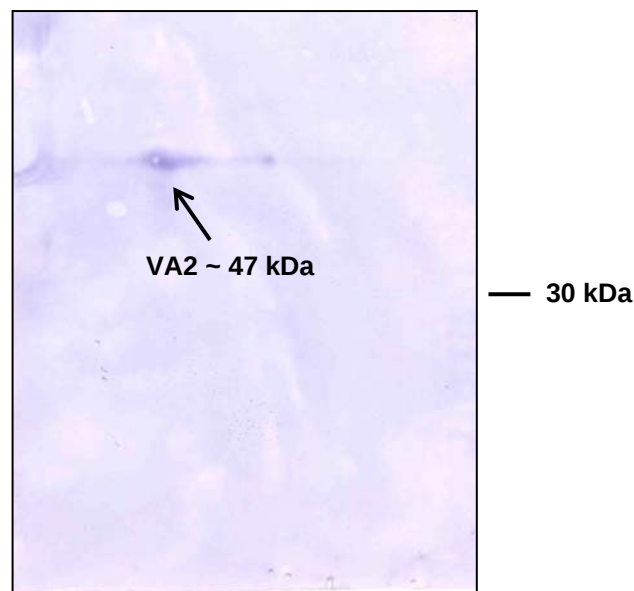
Spot	pI	MW (kDa)
VA1	5.50	20
VA2	5.34	47
VA3	5.83	91
VA4	6.10	29
VA5	6.25	29
VA6	6.54	29

Spot	pI	MW (kDa)
VA7	6.83	44
VA8	10.17	42
VA9	9.50	35
VA10	9.10	34
VA11	9.31	32
VA12	10.19	27



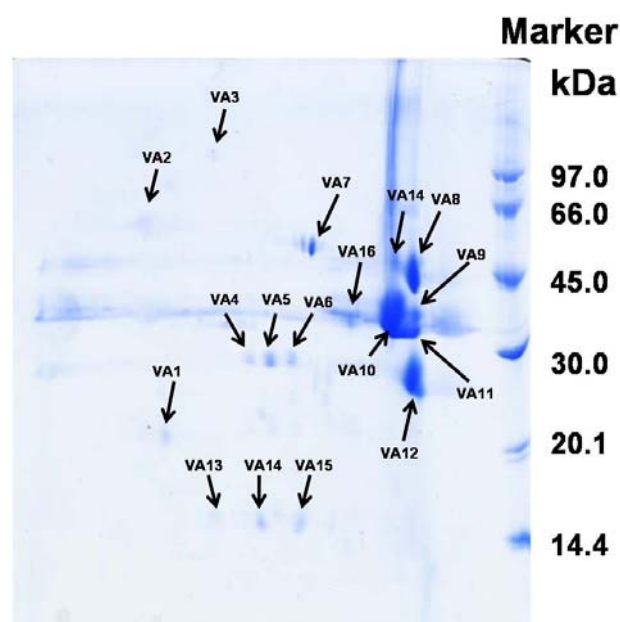


รูปที่ 4.3.8 (A) ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE (lane 1 คือโปรตีนจากต่อมพิษ, lane 2 คือโปรตีนในน้ำพิษ) (B) ผลของการวิเคราะห์ด้วย Western immunoblotting โดยใช้ anti-ovalbumin antibody



รูปที่ 4.3.9 Western immunoblotting ของโปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสือภายหลังแยกด้วย 2D-PAGE โดยใช้ anti-ovalbumin antibody

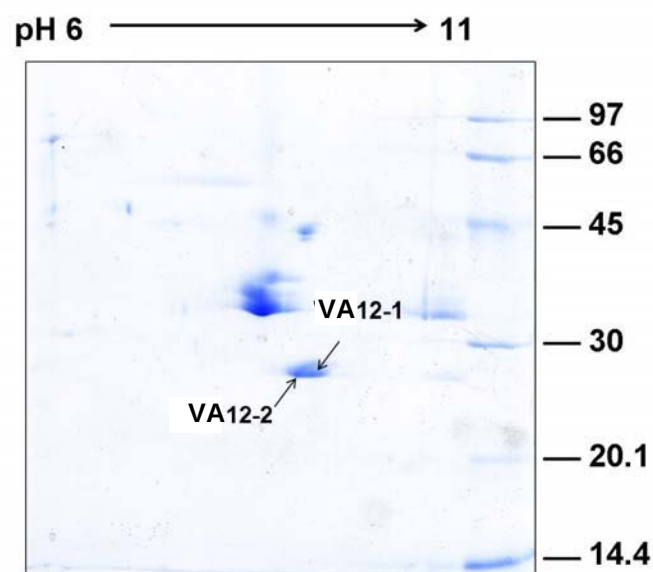
ต่อมา ได้ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี 2D-PAGE ซ้ำ (รูปที่ 4.3.10) จากนั้น ตัด spot ที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนด้วย LC-MS/MS พบโปรตีนสำคัญหลายชนิด ได้แก่ dipeptidylpeptidase IV, Hyaluronidase, Phospholipase, Venom allergen 5 (ตารางที่ 4.3.2) ต่อมา ได้ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี 2D-PAGE ซ้ำอีก ด้วยวิธี 2D-PAGE โดยใช้ strip 7 เซนติเมตร pH 6-11 nL (รูปที่ 4.3.11) ซึ่งพบว่า major spot คือ VA12 มองเห็นเป็น 2 spot แยกกัน จึงได้แบ่ง spot ออกเป็น VA12-1 และ VA12-2 แล้วนำส่งวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS (ตารางที่ 4.3.3) พบว่าทั้ง VA12-1 และ VA12-2 น่าจะเป็น allergen 5 ในน้ำพิษของต่อหัวเสือ



รูปที่ 4.3.10 รูปแบบ spot ของ 2D-PAGE น้ำพิษต่อหัวเสือ

ตารางที่ 4.3.2 ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสื่อ จากการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากฐานข้อมูล

Spot no.	Matched protein / MW (Da)/pI	Peptide mass	Peptide sequence	Species	Score XC
VA2, VA7	dipeptidylpeptidase IV 88493.90/5.57	1298.35 1053.19 2316.51 831.98 2646.03 1548.72 2920.22 2630.03 2646.03 1244.46 2520.84 2504.84 1674.88 1546.70 2445.74 2461.74 1116.36 1347.50 1741.99 1157.30 809.93 1725.99 988.19 972.19 2451.74	R.FSNNGFNDVQR.V K.TEIVWYNK.Y (2) R.VIDKDNLDGILETQDGQNLSK.E (2) K.NLFFYK.Q (2) R.LTVIVDSSVM*DDYIVSHYM*LSPK.G (2) R.YVIYDIELGGYDK.I (2) R.NVQEILYLHYGEPGNLVDQYPTVK.I R.LTVIVDSSVMDDYIVSHYM*LSPK.G (4) R.LTVIVDSSVM*DDYIVSHYM*LSPK.G R.FLLIGYDFQK.G K.WAPLTDDLIYILDNDIYYM*R.F K.WAPLTDDLIYILDNDIYYMR.F (2) R.KLGTVEVEDQISVTR.K (6) K.LGTVEVEDQISVTR.K (17) K.FMLIHGSGDDNVHYQQSLALAK.A (4) K.FM*LIHGSGDDNVHYQQSLALAK.A (4) K.M*LFEIYRK.L R.LFLPHNFDESK.S (18) K.SYPM*LVNVYAGPNTAK.I (11) R.SVIYAYIDGR.G (10) K.DLTSVFK.C (4) K.SYPMLVNVYAGPNTAK.I (6) K.M*LFEIYR.K (13) K.MLFEIYR.K (3) K.CGIAPVPVSSWIYYDSIYTER.Y (4)	<i>Vespa basalis</i>	128.27
VA8	Hyaluronoglucosaminidase B (Hyaluronidase B) (Allergen Ves v 2b) 40072.07/.....	1286.50	K.INKDISIDLVR.K (4)	<i>Vespula virgatus</i>	10.23
VA9, VA10, VA11, VA13	Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02) (Dol m I) 33781.87/8.92	1264.46 1253.50 1540.79 1490.73	R.NECVCVGLNAK.E (12) R.AVKYLTECIR.R (3) R.LIGHSLGAQIAGFAGK.E (21) K.LVPPEISFVLSTR.E (21)	<i>Dolichovespula maculata</i>	38.27
VA12	Venom allergen 5 (Antigen 5) (Ag5) (Allergen Ves s 5) (Ves s V) 23113.94/8.91	1093.28 963.07 864.00 1350.57 1334.57	K.TKEIGCGSIK.Y (2) R.GNPGPQPPAK.N K.EIGCGSIK.Y K.IGHYTQM*VWAK.T (6) K.IGHYTQMVWAK.T (4)	<i>Vespula squamosa</i>	50.19



รูปที่ 4.3.11 แสดงการแยกน้ำพิษของต่อหัวเสียดด้วย 2D-PAGE โดยใช้ strip pH 6-11 จะเห็นว่า spot VA12 แยกเป็น 2 spot คือ VA12-1 และ VA12-2

ตารางที่ 4.3.3 ผลจากการวิเคราะห์ spot VA12-1 และ VA12-2 ด้วยวิธี LC-MS/MS

ลำดับ	โมเลกุลที่เหมือนหรือคล้ายกับโปรตีนทั้ง spot ves12-1 และ ves12-2	น้ำหนัก โมเลกุล
1	Venom allergen 5 หรือ Antigen 5 หรือ Ag5 หรือ Allergen Ves s 5 หรือ Ves s V ของ <i>Vespula squamosa</i>	23.11
2	Venom allergen 5 หรือ Antigen 5 หรือ Ag5 หรือ Allergen Vesp m 5 ของ <i>Vespa mandarinia</i>	22.54
3	Venom allergen 5.01 หรือ Antigen 5-1 หรือ Ag5-1 หรือ Allergen Vesp c 5.01 หรือ Vesp c V.01 ของ <i>Vespa crabro</i>	22.72
4	Venom allergen 5.01 precursor หรือ Antigen 5 form 2 หรือ Ag5-2 หรือ Allergen Dol m 5.01 หรือ Dol m V-A ของ <i>Dolichovespula maculata</i>	26.00
5	Venom allergen 5 หรือ Antigen 5 หรือ Ag5 หรือ Allergen Pol f 5 หรือ Pol f V ของ <i>Polistes fuscatus</i>	23.07
6	Venom allergen 5 precursor หรือ Antigen 5 หรือ Ag5 หรือ Allergen Pol a 5 หรือ Pol a V ของ <i>Polistes annularis</i>	23.29
7	Venom allergen 5 หรือ Antigen 5 หรือ Ag5 หรือ Allergen Pol e 5 หรือ Pol e V ของ <i>Polistes exclamans</i>	22.94

4.3.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน และโครงสร้างสามมิติของ Vespapase-1 (VPase-1) ในน้ำพิษของต่อหัวเสือ

Phospholipase ถือได้ว่าเป็นโปรตีนหลักที่มีความสำคัญตัวหนึ่งในน้ำพิษของสัตว์กลุ่มนี้ พบมีรายงานในน้ำพิษของสัตว์ในกลุ่มนี้แทบทุกชนิด และจากการวิเคราะห์ spot โปรตีนในน้ำพิษยังพบ phospholipase อีกด้วย และได้ตั้งชื่อ phospholipase ที่พบในน้ำพิษของต่อหัวเสือว่า **Vespapase-1** และเขียนย่อเป็น **VPase-1**

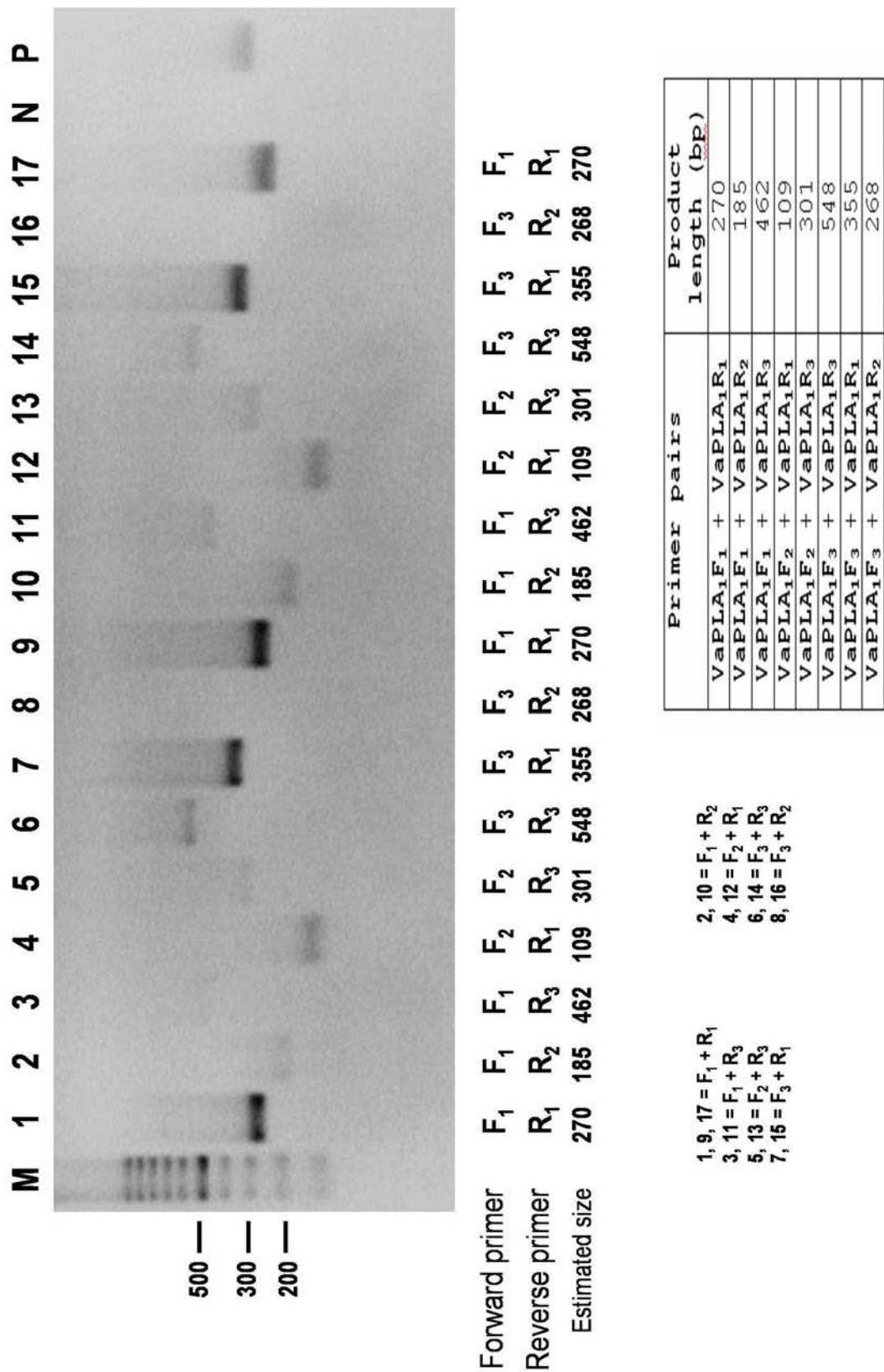
ในครั้งนี้ จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ phospholipase ในน้ำพิษของต่อหัวเสือ โดยเริ่มจากสกัด mRNA จากต่อหัวเสือด้วย illustra RNeasy Mini RNA Isolation Kit จากนั้นนำ mRNA ที่ได้มาทำ RT-PCR ด้วย primer ที่ออกแบบขึ้นจาก phospholipase จาก Vespa และ Vespula (ตารางที่ 4.3.4 และ 4.3.5) ปรากฏว่าได้ PCR product ขนาดตามที่คาดไว้ (รูปที่ 4.3.12) จึงได้ส่ง PCR product ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ศูนย์อณูชีววิทยา ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้ลำดับออกมาไม่เต็มเส้น จึงได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ด้วย 3' RACE ด้วยการใช้ primer F1, F2 และ AUAP (รูปที่ 4.3.13) ผลการทำ 3' RACE ได้แถบดีเอ็นเอมีขนาดใกล้เคียงกับที่คาดไว้ (รูปที่ 4.3.14) จึงได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และในที่สุดได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนปลาย 3' ทั้งสิ้น 558 ลำดับ (รูปที่ 4.3.15) พบว่า เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ความเหมือนกับยีนต่าง ๆ ด้วยโปรแกรม blastn และ ClustalW (รูปที่ 4.3.16 และ 4.3.17) พบว่า เหมือนกับ phospholipase จากน้ำพิษของแมลงในตระกูล Vespa และ Vespula หลายชนิด และเมื่อแปลงมาเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า ได้ 186 ลำดับ และมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ phospholipase อื่น ๆ ของสัตว์ใน family เดียวกัน (รูปที่ 4.3.18) จากนั้น ทำการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของ VPase-1 โดยใช้ PHYLIP program (Phylogeny Inference Package version 3.69) (รูปที่ 4.3.19) พบว่า VPase-1 มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ phospholipase อื่น ๆ ของสัตว์ใน family เดียวกัน และเมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของ VPase-1 (รูปที่ 4.3.20) พบว่า โครงสร้างหลักประกอบด้วย α -helices 4 ส่วน คือ H1 (Ilu22 ถึง Tyr33), H2 (Try51 ถึง Gln75), H3 (Gly91 ถึง Val102) และ H4 (Tyr178 ถึง Arg184) และ 8 beta strands คือ B1 (Val6 ถึง Lys11), B2 (Ala37 ถึง Glu41), B3 (Asn82 ถึง Ser89), B4 (Leu107 ถึง Asp117), B5 (Tyr135 ถึง Val140), B6 (Ilu142 ถึง Ser146), B7 (Leu149 ถึง Thr154) และ B8 (Tyr161 ถึง Asn163) โครงสร้างสามมิตินี้สัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของ phospholipase

ตารางที่ 4.3.4 Primer ที่ออกแบบมาเพื่อเพิ่มจำนวนยีน Vespapase-1 (VPase-1) ในน้ำพิษต่อหัวเสือ

Primer name	Nucleotide sequence (5'→3')	Length (bp)	Tm (°C)	% GC
VaPLA ₁ F ₁	GGT CGA TTG GCG GAT GGC TGC	21	68.8	66.7
VaPLA ₁ F ₂	TGG TGG GAC ACA GTT TGG GCG	21	67.3	61.9
VaPLA ₁ F ₃	CAT GGT TTT ACT TCG TCT GC	20	54.8	45.0
VaPLA ₁ R ₁	GGC CCA GCA GGA TCA AGC CC	20	70.3	70.00
VaPLA ₁ R ₂	GCG CCC AAA CTG TGT CCC ACC	21	69.2	66.7
VaPLA ₁ R ₃	CAC GGC TCT CGT ATG AGA GC	20	62.8	60.0

ตารางที่ 4.3.5 ขนาดของ PCR product ที่คาดว่าจะได้จากการใช้ primer แต่ละคู่

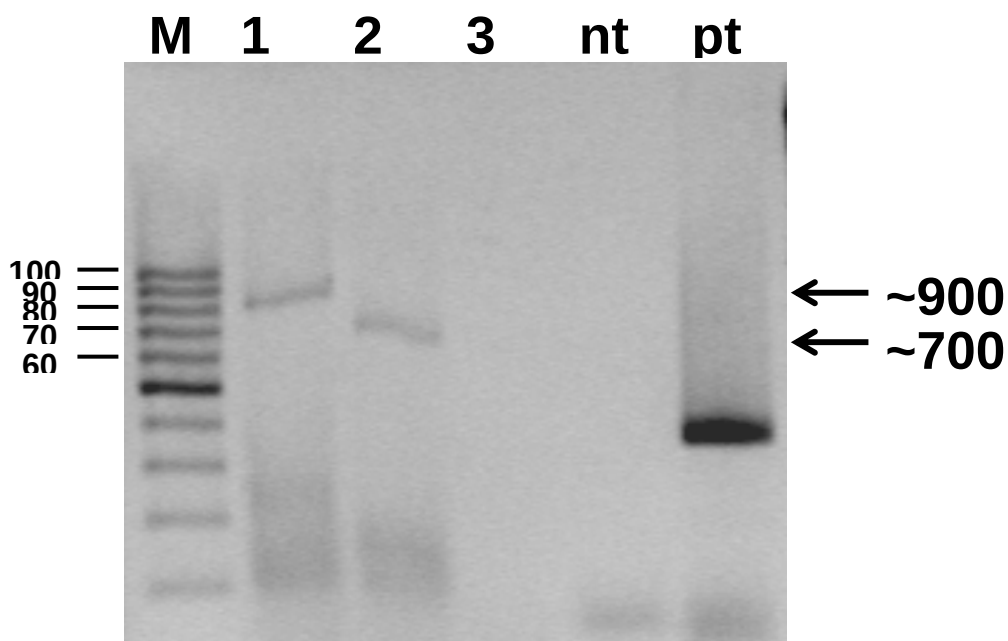
Primer pairs	Product length (bp)
VaPLA ₁ F ₁ + VaPLA ₁ R ₁	270
VaPLA ₁ F ₁ + VaPLA ₁ R ₂	185
VaPLA ₁ F ₁ + VaPLA ₁ R ₃	462
VaPLA ₁ F ₂ + VaPLA ₁ R ₁	109
VaPLA ₁ F ₂ + VaPLA ₁ R ₃	301
VaPLA ₁ F ₃ + VaPLA ₁ R ₃	548
VaPLA ₁ F ₃ + VaPLA ₁ R ₁	355
VaPLA ₁ F ₃ + VaPLA ₁ R ₂	268



รูปที่ 4.3.12 ผลจากการทำ RT-PCR ด้วยการใช้ mRNA เป็นแม่แบบ ด้วย primer คู่ต่าง ๆ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Vespapase-1 (VPase-1) ในน้ำพิษต่อหัวเสือ

AGATTAAATAATGTTTCGTAGGTGATCCGTCGTCATCAAATGAATTAGATAGATTCTCCGTATGTCCCTTTA 70
 GTAATGATACAGTTAAGATGATTTTTTTTAACAAGGGAAAACCGAAAACATGATTTTTTATACGCTAGATAC 140
 AATGAACAGGCACAATGAATTTAAGAAGTCAATCATAAAACGTCCAGTTGTATTTCATTACGCATGGTTTTT 210
 ACTTCGCTCGCAACCGAAAAAATTTCTGTTGCTATGTCAGAGGCTCTTATGCATACAGGTGATTTTCTTA 280
 TAATTTAT^{F₁}**GGTCGATTGGCGGATGGCTGC**TTGTACTGATGAATACCCAGGTCGAAAGTATATGTTTTATAA 350
 GGC TGCCGTTGGTAATACACGCTTAGTTGGAAAATTTATCGCTATGATCGCAAAGAACTTGTAGAACAA 420
 TATAAAGTGCCGATGACAAATATACGACT^{F₂}**TGGTGGGACACAGTTTGGGCG**CACACATTTTCAGGTTTCGCAG 490
 GCAAAAGAGTTCAAGAGTTAAAATTAGGAAAATTTCTGAAATTATTGGGCTT**GAT**CCTGCTGGGCCTAG 560
 TTTCAAGAAAAATGATTGTTCCGAGAGAATCTGCGAGACAGACGCACATTATGTACAAATTTTACATACA 630
 TCGAGCAATTTAGGAACAGAGAGAATCTTGGCACCCTCGATTTCTACATAAATAACGGAAGTAATCAAC 700
 CCGGTTGCAGATATATTATTGGAGAACTTGCCTC**CAT**ACGAGAGCCGTGAAATACTTTACCGAGTGCAT 770
 AAGACGCGAATGTTGTTTAAATTGGGGTCCCGCAGTCCAAGAATCCGCAGCCTGTTTCGAAGTGCACAAGA 840
 AACGAGTGCCTTTGCGTTGGATTAAACGCAAAGAAATATCCTAAAAGGGGCTCATTTTATGTACCGGTTG 910
 AAGCTGAAGCTCCATATTGCAATAACAACGGGAAAAATAATT**TAA**TTATATAAAAAAACATTACTATTGAC 980
 ACAAGTGCATTTGTTAATGATGAAATGAATAAATTACGATTCAAGAAATAATTGTATATGCTGAATGTCG 1050
 CCTGGTATAATCGTCAAAATATTTAATGGGTGATTCTTAGTGAATTTAAAAAATAAAAAATGTTATATA 1120
 AACGTAAAAA^{AP, AUAP} 1143

รูปที่ 4.3.13 ลำดับของ primer F1, F2 และ AUAP สำหรับงาน 3' RACE บนลำดับของยีนไกล์เคียงอื่น



รูปที่ 4.3.14 Product ที่ได้จากการทำ 3' RACE โดยที่ lane M คือ ladder marker, lane 1 คือ Product จากการใช้ primer คู่ F1 + AUAP มีขนาดราว 900 bp ตามที่คาดไว้, lane 2 คือ Product จากการใช้ primer คู่ F2 + AUAP มีขนาดราว 700 bp ตามที่คาดไว้, ส่วน lane 3 ใช้ primer คู่ F3 + AUAP ไม่พบ Product

catgggttttacttttctgtctgcaaccgcagaaaatttcttagctatggccgaagctttgttaagataaaggtaa
 ttacctcgtaatctttgatcgatggcggtggctgcttgactaacgaaatggcaggtgtgaaactgtgcta
 tatttacagttatgccgccagtaatacacgcttggttggaattatatacgtctacggttaccaagatgcttgta
 caacaatataatgtaccgatggcaaatatacgaattgatcgacacagtttgggcgcacatacttcagggttttg
 caggcaaaaaagttcaagagttaagattaggaaaatatctgaaattattgggcttgatcctgctgggccttc
 gttcaagtcacaggaatgttctcagagaatctgcgagacagacgcaaattatgttcaaattatacatatca
 aatcatttaggaacactggtaaccttggaaactgtcgatttctacatgaataacggatataatcaacccggtt
 gcgggtcttctattatttggagaaacttgcctcatcacgagagccgtg

รูปที่ 4.3.15 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vespapase-1 (VPase-1) ที่ได้จากทำ RT-PCR และ 3' RACE เมื่อสรุปแล้ว ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ทั้งสิ้น 558 ลำดับ

Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
sp Q3ZU95.1 PA1 VESGE	RecName: Full=Phospholipase A1; AltName...		251	3e-65
sp P49369.1 PA1 VESVU	RecName: Full=Phospholipase A1; AltName...		245	2e-63
sp Q647B.1 PA11 DOLMA	RecName: Full=Phospholipase A1 1; AltN...		244	3e-63
sp P51528.1 PA1 VESMC	RecName: Full=Phospholipase A1; AltName...		242	1e-62
sp P53357.1 PA12 DOLMA	RecName: Full=Phospholipase A1 2; AltN...		217	6e-55
sp Q6Q249.1 PA14 POLDO	RecName: Full=Venom phospholipase A1 4...		206	8e-52
sp Q6Q250.1 PA13 POLDO	RecName: Full=Venom phospholipase A1 3...		206	8e-52
sp Q6Q251.1 PA12 POLDO	RecName: Full=Venom phospholipase A1 2...		206	1e-51
sp A2VBC4.1 PA1 POLPI	RecName: Full=Venom phospholipase A1; A...		206	1e-51
sp Q6Q252.1 PA11 POLDO	RecName: Full=Venom phospholipase A1 1...		206	1e-51
sp Q9U6W0.1 PA1 POLAN	RecName: Full=Phospholipase A1; AltName...		195	1e-48
ref XP_971532.1 	PREDICTED: similar to AGAP011121-PA [Triboli...		117	5e-25 UG
ref XP_310281.6 	AGAP003749-PA [Anopheles gambiae str. PEST] ...		115	3e-24 G
ref XP_001599427.1 	PREDICTED: similar to CG6847-PA [Nasonia ...		113	8e-24 UG
ref XP_001964598.1 	GF22964 [Drosophila ananassae] >gb EDV303...		113	1e-23 G
ref XP_974137.1 	PREDICTED: similar to lipase [Tribolium cast...		110	5e-23 UG
gb AAT95008.1 	allergen Sol i 1 precursor [Solenopsis invicta]		109	1e-22
ref XP_313740.4 	AGAP004449-PA [Anopheles gambiae str. PEST] ...		108	3e-22 UG
ref XP_396831.2 	PREDICTED: similar to CG6847-PA [Apis mellif...		106	1e-21 UG
ref XP_780900.1 	PREDICTED: similar to pancreatic triglycerid...		106	1e-21 G

รูปที่ 4.3.16 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ VPase-1 กับยีนต่าง ๆ ด้วยโปรแกรม blastn พบว่า เหมือนกับ phospholipase จากน้ำพิษของแมลงในตระกูล Vespa และ Vespula หลายชนิด

SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score
1	VPase-1	186	2 Dolm1.01	317 64
1	VPase-1	186	3 Vesm1	300 66
1	VPase-1	186	4 Vesv1	336 67
1	VPase-1	186	5 Vesg1	300 68
1	VPase-1	186	6 Pola1	301 54
1	VPase-1	186	7 Pold1.01	337 56
1	VPase-1	186	8 Polyp1	322 58
1	VPase-1	186	9 PS-PLA1	456 22
1	VPase-1	186	10 PLRP2	468 29
1	VPase-1	186	11 HPL	465 27

รูปที่ 4.3.17 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ VPase-1 กับยีนต่าง ๆ ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า เหมือนกับ phospholipase จากน้ำพิษของแมลงในตระกูล Vespa และ Vespula หลายชนิด

Pol a 1 -----MSPDCTFNEKDIVFYVYSR 19
 Pol d 1.01 -----MNFKYSILFICFVKVLDNDCYAADDLTLRNGTLDRGITPDCTFNEKDIELHVYSR 55
 Poly p 1 -----MNFKYSILFICFG-----TLDRGLIPECPFNEYDILFFVYTR 37
 Ves m 1 -----GPKCPFNSDTSIIETR 18
 Ves v 1 -----MEENMNLKYL L LFVYFVQVLNCCYGHG DPLSYELDR--GPKCPFNSDTSIIETR 54
 Ves g 1 -----GPKCPFNTDTSVMIIETR 18
 Dol m 1.01 -----RLIMFVG-----DPSSSNELDR--FSVCPFSNDTVKMIFLTR 35
VPase-1 -----
 PLRP2 MLLCWIVSLLLATVGGKEVCYGHLCGFSNDKPWAGMLQRPLKIFPWSPEDIDTRFLLYTN 60
 HPL MLPLWTL SLLLGA VAGKEVCYERLGCFSDDSPWSGITERPLHILPWSPKDVNTRFLLYTN 60
 PS-PLA1 --MPPGPWESC F WVGGLILWLSVGSSGDAPPTPQPKCADFQSANLFEGTDLKVQFLLFVP 58

Pol a 1 DKRDGIILKKETLTNYDLFTKSTISKQVFLIHGFLSTGNNNFVAMSKALIE-KDDFLV 78
 Pol d 1.01 DKRNGIILKKEILKNYDLFQKSQISHQIAILIHGFLSTGNNNFDAMAKALIE-IDNFLV 114
 Poly p 1 QQRDGIVL TEETLQNYDLFKKSTISRQVVFIDHGFLSNGNNNFIA MAKALIE-KDNFLV 96
 Ves m 1 ENRNRDLYTLQTLQNHPEFKKKITIRPVVFITHGFTSSASEKNFINLAKALVD-KDNYMV 77
 Ves v 1 ENRNRDLYTLQTLQNHPEFKKKITIRPVVFITHGFTSSASETNFINLAKALVD-KDNYMV 113
 Ves g 1 ENRNRDLYTLQTLQNHPEFKEKTITRPVVFITHGFTSSASETNFINLSKALVD-KDNYMV 77
 Dol m 1.01 ENRKHDFYTLDTMNRHNEFKKSIKRPVVFITHGFTSSATEKNFVAMSEALMH-TGDFLI 94
VPase-1 -----HGFTFVCNRRKFPSYGRSFVKIKVIYLV 28
 PLRP2 ENPNNYQKISATEPDTIKFSNFQLDRKTRFIVHGFDKGEDGWLLDMCKKMFQ-VEKVNC 119
 HPL ENPNNFQEAADS-SSISGSNFKTRNRKTRFIIHGFDKGEENWLANVCKNLFK-VESVNC 118
 PS-PLA1 SNPSCGQLVEGSSDLQNSGFNATLG--TKLIIHGFRVLGTPKPSWIDTFIRTLRLRATNANV 116

Pol a 1 ISVDWKKGACN-AFASTKDALGYSKAVGNTRHVGKFVADFTKLLVEKYKVLISNIRLIGH 137
 Pol d 1.01 ISVDWKKGACN-AFASTNDVLGYSQAVGNTRHVGKYVADFTKLLVEQYKVPMSNIRLIGH 173
 Poly p 1 ISVDWKKGACN-AFASTLDLYGYSTAVGNTRHVGKYVADFTKLLVEQYKVSMSNIRLIGH 155
 Ves m 1 ISIDWQTAAC TNEYPGLKYAY-YPTAASNTRLVGQYIATITQKLVKDYKISMANIRLIGH 136
 Ves v 1 ISIDWQTAAC TNEAAGLKLY-YPTAASNTRLVGQYIATITQKLVKHYKISMANIRLIGH 172
 Ves g 1 ISIDWQTAAC TNEAAGLKLY-YPTAASNTRLVGQYIATITQKLVKQYKISMANIRLIGH 136
 Dol m 1.01 IMVDWRMAACTDEYPGLKMYF-YKAAVGNTRLVGNFIAMIAKKLVEQYKVPMTNIRLVGH 153
VPase-1 IFDRWRVAACTNEMAGVKLCYIYSYAASNTRLVGNYIATVTKMLVQYQNVPMANIRLIGH 88
 PLRP2 ICVDWRRGSRT-----EY TQASYNTRVVGAEIAFLVQVLSTEMGYSPENVHLIGH 169
 HPL ICVDWKGG SRT-----GY TQASQNI RIVGAEVAYFVEFLQSAFGYSPSNVHVIGH 168
 PS-PLA1 IAVDWIYGSTG-----VY FSAVKNVIKLSLEISLFLNKLVLVG-VSESSIHIIGV 165
 * * . : * * * : . : . : * : : : *

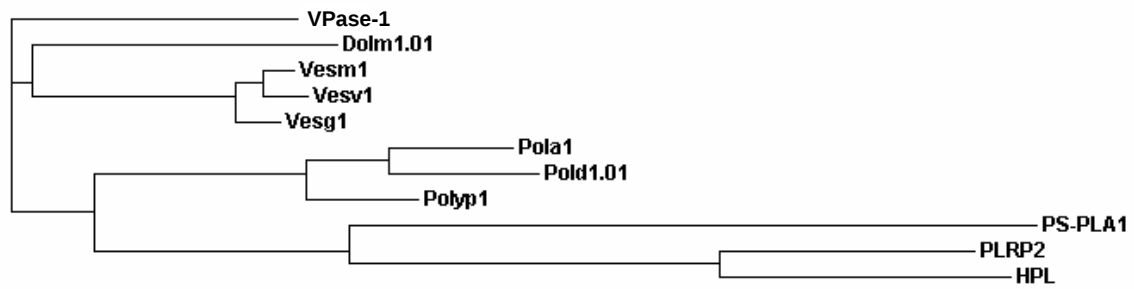
Pol a 1 SLGAHTSGFAGKEVQKLKLGKYKEIIGLDPAGPYFHRSDCPDRLCVTDAEYVQVIHTS-- 195
 Pol d 1.01 SLGAHTSGFAGKEVQRLKLGKYKEIIGLDPAGPSFLT NKC PNRLCETDAEYVQAIHTS-- 231
 Poly p 1 SLGAHTSGFAGKEVQELKLNKYSNIDGLDPAGPSFDSND CPERLCETDAEYVQIIHTS-- 213
 Ves m 1 SLGAHVSGFAGKRVQELKLGKYSEIIGLDPARPSFDSNHCSERLCETDAEYVQIIHTS-- 194
 Ves v 1 SLGAHASGFAGKKVQELKLGKYSEIIGLDPARPSFDSNHCSERLCETDAEYVQIIHTS-- 230
 Ves g 1 SLGAHVSGFAGKKVQELKLGKYSEIIGLDPAGPSFSSNKCSDRLCETDAEYVQILHTS-- 194
 Dol m 1.01 SLGAHISGFAGKRVQELKLGKFSEIIGLDPAGPSFKKND CSERICETDAHYVQILHTS-- 211
VPase-1 SLGAHTSGFAGKKVQELRLGKYSEIIGLDPAGPSFKSQECSQRICETDANYVQIIHTS-- 146
 PLRP2 SLGAHVVG EAGRRLE---GHVGRITGLDPAEPCFQGLPEEVRLDPSDAMFVDVIHTDSA 225
 HPL SLGAHAAGEAGRRTN---GTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAKFVDVIHTDGA 224
 PS-PLA1 SLGAHVGGMVGQLFG---GQLGQITGLDPAPEYTRASVEERLDAGDALFVEAHTDT- 220
 ***** * . * : * * * * * : * : * : * : * : * : *

Pol a 1 -----IILGVYYNVGSDVFYNYGKNQPGCN-----EPSCSHTKAV 231
 Pol d 1.01 -----AILGVYYNVGSDVFYNYGKSQPGCS-----EPSCSHTKAV 267
 Poly p 1 -----NILGVYSKIGTVDFYMNNGSHQPGCGR-FF-----SPSCSHTKAV 252
 Ves m 1 -----NYLGTEKILGTVDYFYMNGKNNP GCGR-FF-----SEVCSHSRAV 233
 Ves v 1 -----NYLGTEKTLGTVDYFYMNGKNQPGCGR-FF-----SEVCSHSRAV 269
 Ves g 1 -----NHLGTERILGTVDYFYMNGKNQPGCGR-FF-----TEVCSHSRAV 233
 Dol m 1.01 -----SNLGTERTLGTVDYFINNGSNQPGCRY-II-----GETCSHTRAV 250
VPase-1 -----NHLGTLVTLGTVDYFYMNGYNQPGCGLPII-----GETCSHTRAV 186
 PLRP2 PIIPYLGF GMSQKVGHLDFFPNNGGKEMP GCKNILSTIVDINGIWEGTQNFVACNHLRSY 285
 HPL PIVPNLGF GMSQVVGHLDFFPNGGVEMP GCKNLSQIVDIDGIWEGTRDFAACNHLRSY 284
 PS-PLA1 -----DNLGIRIPVGHVDYFVNGGQDQPGCPTFFYAG-----YSYLICDHMRV 264
 : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

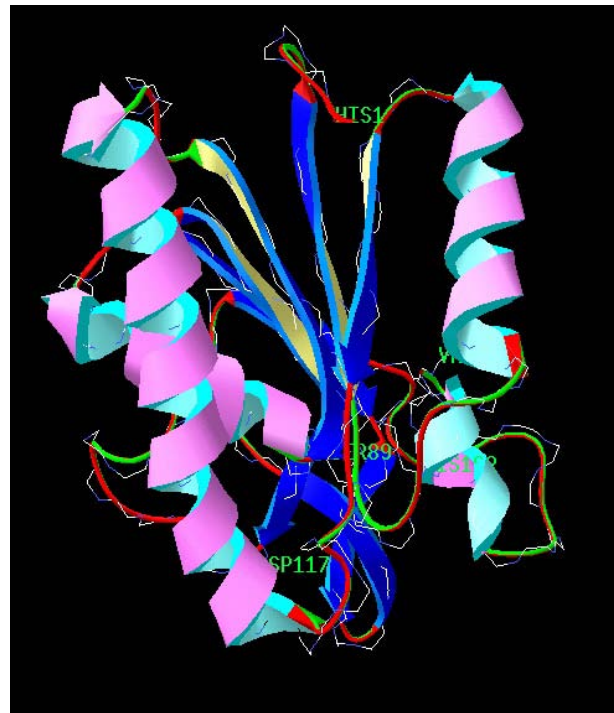
Pol a 1 KYLTECIKHECCLIGTPWKY-FSTPKPISQCRG---DTCVCVGLN-AKSYP-----ARG 281
 Pol d 1.01 KYLTECIKRECC LIGTPWKSY-FSTPKPISQCKR---DTCVCVGLN-AQSYP-----AKG 317

Poly p 1	KYLTECIKHECCLIGTPWKY-FSTPKPISQCTK---DTCVCVGLN-AKSYP-----ARG	302
Ves m 1	IYMAECIKHECCLIGIPRSK----SSQPISRCTK---QECVCVGLN-AKKYP-----SRG	280
Ves v 1	IYMAECIKHECCLIGIPKSK----SSQPISSCTK---QECVCVGLN-AKKYP-----SRG	316
Ves g 1	IYMAECIKHECCLIGIPKSK----SSQPISSCTK---QECVCVGLN-AKKYP-----SRG	280
Dol m 1.01	KYFTECIRRECCCLIGVPQSK----NPQPVSKCTR---NECVCVGLN-AKKYP-----KRG	297
VPase-1	-----	
PLRP2	KYYASSILNPDGFLGYPCSSYEKFQQNDCFPCPE--EGCPKMGHY-ADQFEGKTATVEQ	341
HPL	KYYTDSIVNPDGFAGFPCASYNVFTANKCFPCPS---GGCPQMGHY-ADRYPGKTNDVGQ	340
PS-PLA1	HLYSISALENSCPLMAFPCASYKAFLAGRCLDCFNPFLLSCPRIGLVEQGGVKIEPLPKEV	324
Pol a 1	AFYAPVEANAPYCHNEGIKL-----	301
Pol d 1.01	SFYVPVDKDAPYCHNEGIKL-----	337
Poly p 1	SFYVPVEATAPYCHNEGIKL-----	322
Ves m 1	SFYVPVESTAPFCNNKGKII-----	300
Ves v 1	SFYVPVESTAPFCNNKGKII-----	336
Ves g 1	SFYVPVESTAPFCNNKGKII-----	300
Dol m 1.01	SFYVPVEAEAPYCNNGKII-----	317
VPase-1	-----	
PLRP2	TVYLNTGDSGNFTRWRYKVSVTLSGAKKLSGYILVALYGNNGNSKQYEIFKGLKPEARH	401
HPL	KFYLDTGDSNFARWRYKVSVTLSG-KKVTGHILVSLFGNKGNSKQYEIFKGTLPDSTH	399
PS-PLA1	KVYLLTTSSAPYCMHSLVEFHLKELRNKDTNIEVTLSSNITSSSKITIPKQRYGKGI	384
Pol a 1	-----	
Pol d 1.01	-----	
Poly p 1	-----	
Ves m 1	-----	
Ves v 1	-----	
Ves g 1	-----	
Dol m 1.01	-----	
VPase-1	-----	
PLRP2	VRDIDVDINVGEIQVKVFLWNNKVINLFRPTLGASQITVQSGVDGKEYNFCSSDVTREDV	461
HPL	SNEFDSVDVGDLMQVKFIWYNNVINPTLPRVGASKIIVETNV-GKQFNFCSPETVREEV	458
PS-PLA1	IAHATPQCQIN-QVKFKFQSSNRVWKKDRTTIIGKFACTALLPVNDREKMVCLPEPVNLQA	443
Pol a 1	-----	
Pol d 1.01	-----	
Poly p 1	-----	
Ves m 1	-----	
Ves v 1	-----	
Ves g 1	-----	
Dol m 1.01	-----	
VPase-1	-----	
PLRP2	LQSLYPC-----	468
HPL	LLTLTPC-----	465
PS-PLA1	SVTVSCDLKIACV	456

รูปที่ 4.3.18 การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VPase-1 เป็นลำดับกรดอะมิโน และการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนต่าง ๆ ด้วยโปรแกรม ClustalW ลำดับที่เน้นด้วยสีม่วงเป็นลำดับที่เหมือนกัน ส่วน catalytic triad คือ Ser, Asp and His แสดงไว้ด้วยตัวอักษรสีน้ำเงิน เอนไซม์ที่นำมาใช้เปรียบเทียบมีดังนี้ คือ human phosphatidylserine-specific PLA₁ (PS-PLA₁), Pancreatic lipase-related protein 2 (PLRP2), human pancreatic lipase (HPL), phospholipase จาก *Vesputa germanica* (Ves g 1), *Vesputa maculifrons* (Ves m 1), *Vesputa vulgaris* (Ves v 1), *Dolicovesputa maculata* (Dol m1.01), *Polistes anularis* (Pol a 1), *Polistes dominulus* (Pol d 1.01) และ *Polybia paulista* (Poly p 1)



รูปที่ 4.3.19 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน VPase-1 กับโปรตีนกลุ่ม Phospholipase A2 ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ



HGFTFVCNRRKFPSYGRSFVKIKVIYLVIFDRVRVA^{ACTNE}MAGVKLCYI^{PSYASNTIRVGNVLAIV}
^{IKKLVQV}YNVPMANIRLIGH^SLAHTSGFAGKKVQELRLGKYSEIIGL^DPAGPSFKSQECSQRICE^{TD}
 ANYVQIIHTSNHLGTLVT^LLGTVD^FYMNNGYNQPGCGLPIIGE^{TC}SH^{AV}

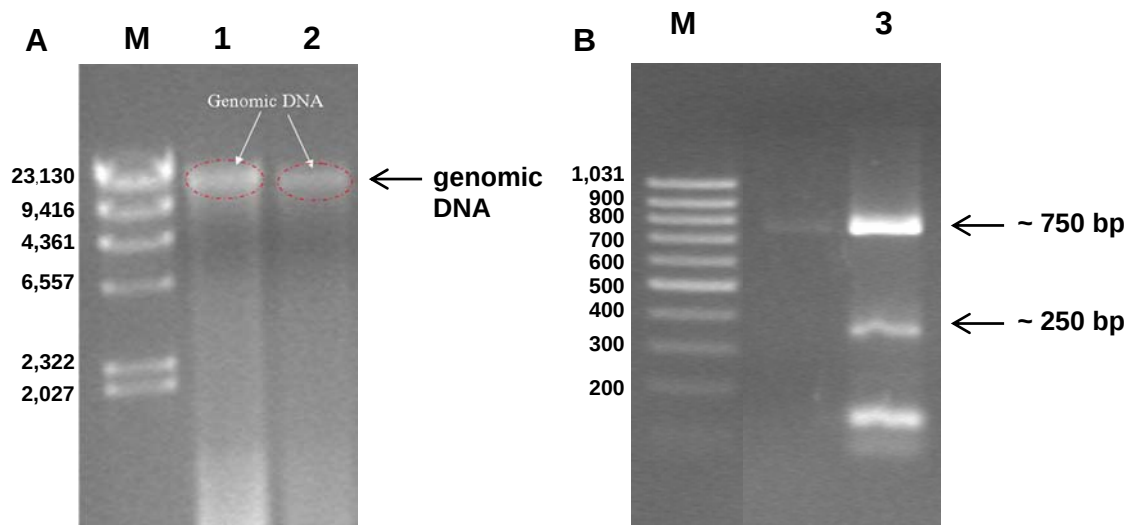
รูปที่ 4.3.20 โครงสร้างสามมิติของ VPase-1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย DeepView Swiss-PdbViewer โดยใช้ 1GPL (guinea pig lipoprotein lipase เป็นต้นแบบ พบว่า มี 4 alpha helix (เน้นด้วยสีเขียว) และ 8 beta strands (เน้นด้วยสีเหลือง) ส่วน catalytic triad คือ Ser89, Asp117 และ His182 แสดงไว้ด้วยตัวอักษรสีแดง

4.3.4 การหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Vespumin ในน้ำพิษต่อหัวเสือ

Albumin ที่พบในน้ำพิษต่อหัวเสือนับเป็นรายงานครั้งแรก เพื่อให้เข้าใจง่าย จึงตั้งชื่อว่า **Vespumin** โดยที่การหาลำดับกรดอะมิโนของ Vespumin เริ่มจากการออกแบบ primer โดยอาศัย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ovalbumin (ตารางที่ 4.3.6) จากนั้นก็สกัด genomic DNA ของต่อหัวเสือ (รูปที่ 4.3.21A) แล้วทำ PCR (รูปที่ 4.3.21B) และได้ส่ง PCR product ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.3.22 และ 4.3.23) พบว่า เมื่อนำไป align กับโปรตีนในฐานข้อมูล ยังไม่พบความเหมือนกับโปรตีน ตัวใดของ arthropod แสดงว่าการหา sequence ยังไม่ได้ผล

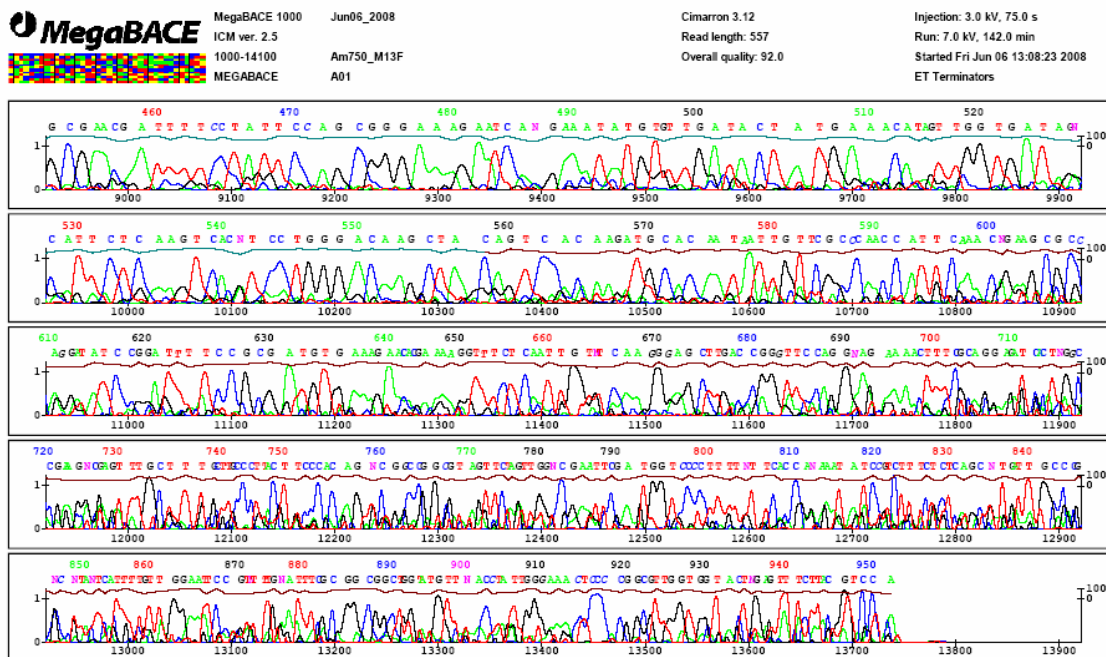
ตารางที่ 4.3.6 Primer ที่ออกแบบมาเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vespumin

primer	คุณสมบัติ
Forward primer : F1 TGCTGAAGAGAGATACCC	Length : 18 nt Tm (basic) : 50.3 °C GC % : 50.0 %
Forward primer : F2 GTGACTGAGCAAGAAAGC	Length : 18 nt Tm (basic) : 54.0 °C Tm (salt) : 53.8 °C Tm (NN) : 54.5 °C GC % : 50.0 % ΔG : -34.8 kCal/mol 3'-tail GC % : 42.9 % 3'-tail dG : -9.3 kCal/mol
Reverse primer : R1 CTGCCAAAGAAGAGAACGG	Length : 19 nt Tm (basic) : 53.6 °C GC % : 52.6 %
Reverse primer : R2 CCAAAGAAGAGAACGGCG	Length : 18 nt Tm (basic) : 56.0 °C Tm (salt) : 56.1 °C Tm (NN) : 56.4 °C GC % : 55.6 % ΔG : -34.7 kCal/mol 3'-tail GC % : 71.4 % 3'-tail dG : -12.0 kCal/mol



รูปที่ 4.3.21 (A) genomic DNA ที่สกัดได้จากส่วนท้องของต่อหัวเสือ มีขนาดประมาณ 23 kpb (B) PCR product ที่ได้จากการทำ PCR โดยการใช้ primer ในตารางที่ 4.3.6 และใช้ genomic DNA จาก รูป A เป็นแม่แบบ





>D:\MegaBACE.AnalyzedData\2008\Jun2008\Jun06_2008Run01_Cp312_MD1\Am750_M1
 3R.esd 853 MegaBACE
 AACGCTATGCTCCCGCTG6GAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCA6GCGGCCGCGAATTCAGTGTATTCC
 AAAGAAGAGAACGGCGGCAATATAGTTAGAGAAGAGATTATTCGGTGAAAAAAGGAGCATTTGATCGGCATTG
 ACTTGCCGGCGACTGTGGTAGAGGAGAAAGCAATTCGTTGCATGATTGTCGAAGTTTTTCTGAACCGGCAG
 CTCCTTGAACAATGAGAACTTTTGTCTTACATCGCGGATAATCTGATTTTGCCTTGTGAATGGTGGCGAC
 ATATTGTGATTTGTGGACTGCTAGCTTGTCCAGGACTGACTTGAGAATGTTATCACCAATGTTTTCATTAG
 TATCAACATATTCTTGATCTTTCCCGCTTGAATAGAAAATTGTCGCTTGCAGCTCAAACAGTTTGTG
 GACCGACCGAGTAGATGTATTAGGACTCGGACCAAGGTTCCGTTATAGTAACTTGCAGGCGATTGGAGACC
 GCCATCATNAACCAAGAAATTTGGTCATGATCGTTGAGAGAAGCCATGCCGATTTACAGTATCGGGTTTCA
 CCGTCTTCTTGGGATCTCCATGCCGGCCACAGTAAGGAGAACCCTAAGATGTAAGTTCTTTTCCCTTGTA
 CGTCACGATGTCTTCTTGGTCGTTGTCCAGCTAAGAGTTGTTTGGTGGTTGCCCGGTGGCCTCNGTTTCA
 TANTATCGCNCGTNCATATNGTTTGTCTCGAGTTTGGGACGATTGATTCCTTTGGGCCGTGTCTTCTTGGTT
 GATCCCCGCGNCTGTGCGGAGCTGCNAATTAGGCNTCCNNCNTGTGTTTA

รูปที่ 4.3.22 (รูปบนและกลาง) ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ขนาด 750 bp ใช้
 primer คู่ F2R2 โดยเริ่มทางด้านปลาย 5' (รูปล่าง) ลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบที่นำมาเขียนใหม่ให้
 เห็นชัดเจน



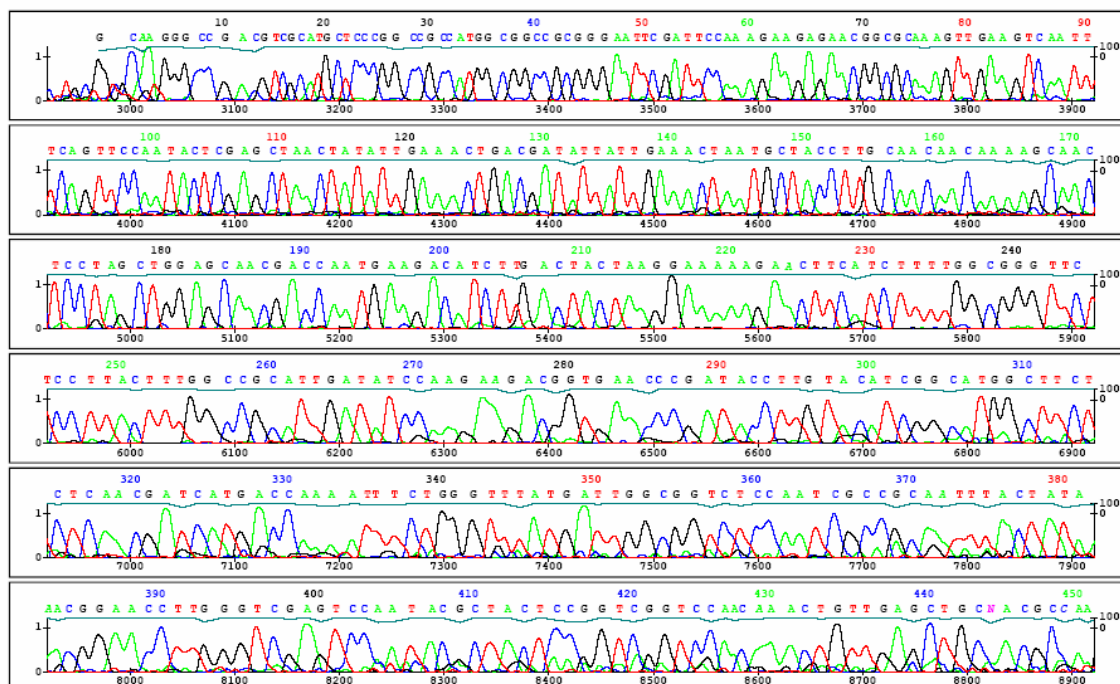
MegaBACE 1000
ICM ver. 2.5
1000-14100
MEGABACE
A01

Jun06_2008

Am750_M13F

Cimarron 3.12
Read length: 557
Overall quality: 92.0

Injection: 3.0 kV, 75.0 s
Run: 7.0 kV, 142.0 min
Started Fri Jun 06 13:08:23 2008
ET Terminators



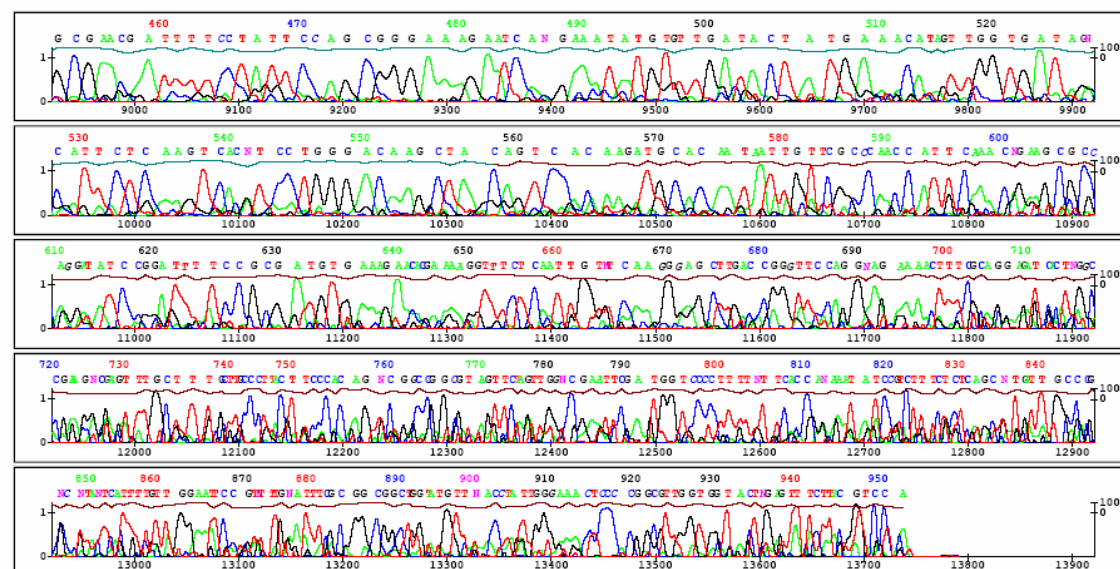
MegaBACE 1000
ICM ver. 2.5
1000-14100
MEGABACE
A01

Jun06_2008

Am750_M13F

Cimarron 3.12
Read length: 557
Overall quality: 92.0

Injection: 3.0 kV, 75.0 s
Run: 7.0 kV, 142.0 min
Started Fri Jun 06 13:08:23 2008
ET Terminators

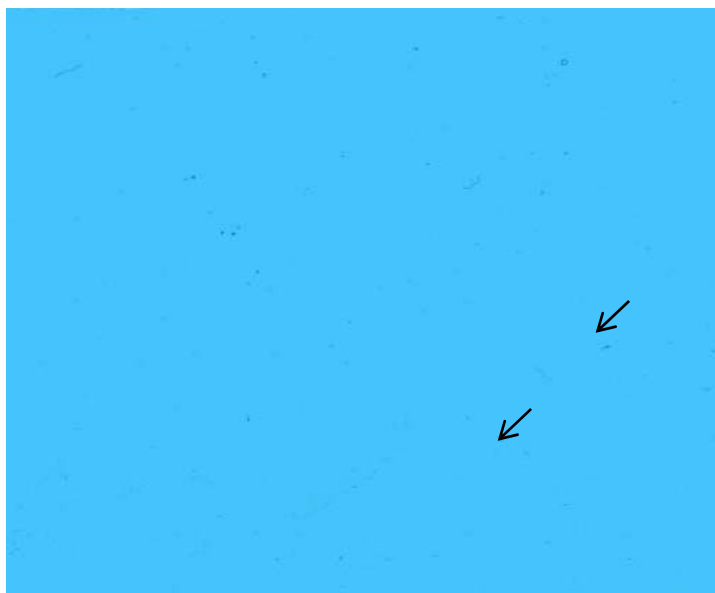


```
>D:\MegaBACE.AnalyzedData\2008\Jun2008\Jun06_2008Run01_Cp312_MD1\Am750_M1
3F.esd      951      MegaBACE
GCAAGGGCCGACGTCGCATGCTCCCCGGCCGCCATGGCGGGCCGCGGGAATTTCGATTCCAAAGAAGAGAACGGCG
CAAAGTTGAAGTCAATTTTCAGTTCCAATACTCGAGCTAACTATATTGAAACTGACGATATTATTGAAACTAAT
GCTACCTTGCAACAACAAAAGCAACTCCTAGCTGGAGCAACGACCAATGAAGACATCTTGACTACTAAGGAAA
AAGAACTTCATCTTTTGGCGGGTTCTCCTTACTTTGGCCGCATTGATATCCAAGAAGACGGTGAACCCGATAC
CTTGTACATCGGCATGGCTTCTCTCAACGATCATGACCAAAATTTCTGGGTTTATGATTGGCGGTCTCCAATC
GCCGCAATTTACTATAAACGGAACCTTG6GTCGAGTCCAATACGCTACTCCGGTCGGTCCAACAACTGTTGA
GCTGCNACGCCAAGCGAACGATTTTCTATTCCAGCGGGAAAGAATCANGAAATATGTGTTGATACTATGAAA
CATAGTTGGTGATAGNCATTCTCAAGTCACNTCCTGGGACAAGCTACAGTCACAAGATGCACAATAATTGTTTC
GCCCAACCATTCAAACNGAAGCGCCAGGATATCCGGATTTTCCGCGATGTGAAAGAACACGAAAAGGTTTCTC
AATTGTNTCAAGGGAGCTTGACCGGGTTCCAGGNAGAAAACTTTCGAGGAGATCACTNGGCCGAAGNCGAGT
TTGCTTTGCTTGCCCTTACTTCCACAGNCGGCCGGCGTAGTTCTAGTTGGNCGAATTCGATGGTCCCTTTT
NTTACCANAAATATCCGTCTTTCTCTCAGCNTGATTGCCCGNCTANTCATTTTGTGGAATTCGNTTTTG
NATTTGCGGGCGGCTGGTATGTTNACCTATTGGGAAACTCCCCGGCGTTGGTGGTACTNGAGTTTCTTACGTC
CA
```

รูปที่ 4.3.23 (รูปบนและกลาง) ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ขนาด 750 bp ใช้ primer คู่ F2R2 โดยเริ่มทางด้านปลาย 3' (รูปล่าง) ลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปบนที่นำมาเขียนใหม่ให้เห็นชัดเจน

4.3.5 การตรวจฤทธิ์ของเอนไซม์ Hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหัวเสือ

จากการวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ hyaluronidase โดย 2D-PAGE โดยเทคนิค substrate gel zymography โดยที่ second dimension มี hyaluronan หรือ hyaluronic acid เข้มข้น 0.4 mg/ml ผสมอยู่ พบ spot โปรตีนที่มีฤทธิ์เป็น hyaluronidase (รูปที่ 4.3.24) พบฤทธิ์ของเอนไซม์อย่างเด่นชัด 2 spot จึงคาดว่ามี 2 isoform



รูปที่ 4.3.24 การตรวจฤทธิ์ของเอนไซม์ Hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหัวเสือด้วยวิธี 2D-PAGE Activity gel assay มีการ Fix protein และตรวจฤทธิ์ของเอนไซม์ ด้วยการย้อมเจลด้วยสี Alcian blue (G = venom gland extract, V = venom)

ตอนที่ 4.4 รูปแบบโปรติโอมส์ของโปรตีนในน้ำพิษต่อหูลุม (*Vespa tropica*) การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออกฤทธิ์ในน้ำพิษและการผลิตแอนติบอดีเพื่อพัฒนาเซรุ่มต้านพิษ

4.4.1 ต่อหูลุมและการรีดพิษ

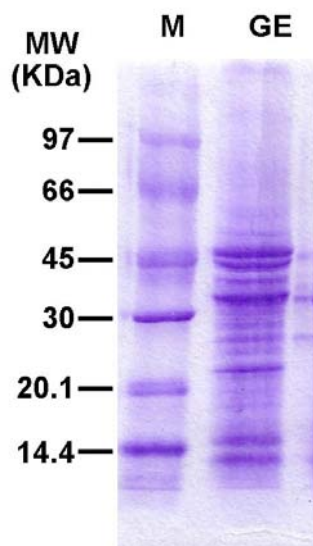
ต่อหูลุมได้จากหมู่บ้านเชียงเซา ตำบลบ้านเอื้อง อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม โดยมีคุณพงษ์ศักดิ์ ลานนท์ เป็นหัวหน้าทีม เช่นเดียวกับต่อหัวเสือ ซึ่งต่อหูลุมมีอันตรายมากกว่าต่อหัวเสือทางทีมงานไปจับให้โดยไม่ให้ร่วมสังเกตการณ์และถ่ายรูป เพราะอันตรายมาก จึงไม่มีรูปการเก็บมาแสดง ตัวต่อหูลุมมีรูปร่างและสีคล้ายกับต่อหัวเสือ แต่ตัวโตกว่าราว 1.5 เท่า (รูปที่ 4.4.1) วิธีการเก็บน้ำพิษก็คล้ายกับต่อหัวเสือ



รูปที่ 4.4.1 ต่อหูลุม (*Vespa* sp.) กับไข่และตัวอ่อนในรังของมัน ขนาดของมันเมื่อเทียบกับเหรียญ 1 บาท

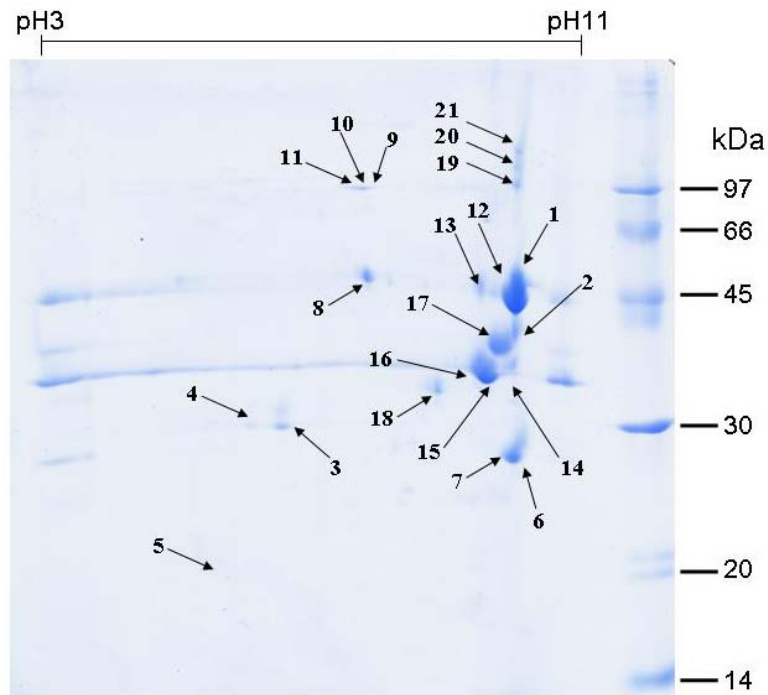
4.4.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษต่อหูลุม

เริ่มจากการนำ gland extract มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 4.4.2) พบแถบโปรตีนจำนวนมาก โปรตีนส่วนใหญ่มีขนาดน้อยกว่า 45 กิโลดาลตัน



รูปที่ 4.4.2 โปรตีนใน gland extract ของต่อหูลุม ภายหลังจาก run 13% SDS-PAGE (lane M คือ marker, 1 lane GE คือ gland extract)

ต่อมา นำตัวอย่างน้ำพิษต่อหูลุมมาวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE (รูปที่ 4.4.3) ผลการวิเคราะห์ พบโปรตีนจำนวน 21 spot โปรตีนที่พบส่วนมากมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 27-50 kDa และส่วนใหญ่เป็น basic protein มีค่า Isoelectric point (pI) อยู่ระหว่าง 8-10 (ตารางที่ 4.4.1) จากนั้น major spot ถูกตัดไปทำ mass peptide fingerprint LC-MS/MS ที่สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ แล้วทำการวิเคราะห์ผลที่ได้ จากจำนวน 11 spot ได้แก่ spot ที่ VT1, VT2, VT7, VT8, VT10, VT11, VT13, VT15, VT16, VT18 และ VT19 แต่มีเฉพาะ VT1, VT2, VT10, VT11, VT15 และ VT16 เท่านั้นที่ได้รูป profile (รูปที่ 4.4.4) และจากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (ตารางที่ 4.4.2) สามารถจำแนกชนิดของโปรตีนหลักในน้ำพิษของต่อหูลุม เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ดังนี้ spot VT1 และ VT13 คือ hyaluronidase, spot VT2, VT15 และ VT16 คือ phospholipase, spot VT10 และ VT11 คือ albumin, spot VT7 และ VT18 คือ antigen 5, และ spot VT8 และ VT19 คือ dipeptidylpeptidase



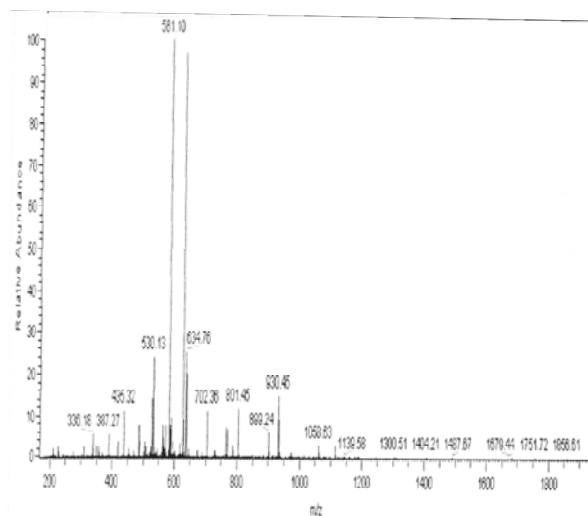
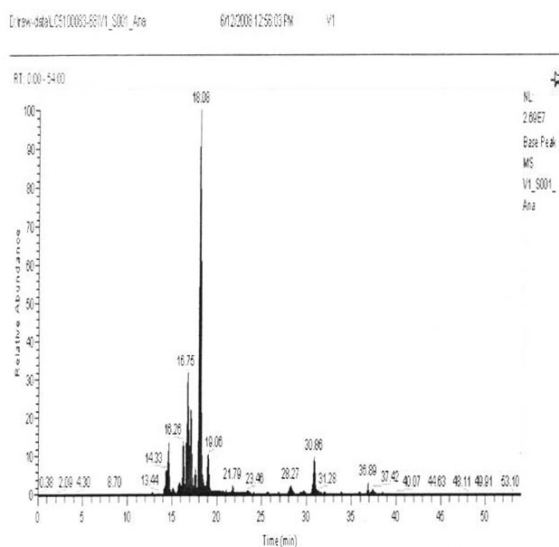
รูปที่ 4.4.3 การแยกโปรตีนในน้ำพิษต่อหูลุม (*V. tropica*) ด้วยเทคนิค 2D-PAGE โดยใช้โปรตีน 20 μg ใช้ IPG strip ขนาด 7 cm, pH 3-11 nonlinear โดยแยกใน second dimension ด้วย 13% SDS-PAGE ส่วนหมายเลข คือ spot VT1 ถึง VT21 ที่ได้นำไปวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วย LC-MS/MS

ตารางที่ 4.4.1 ค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในน้ำพิษต่อหูลุม จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี 2D-PAGE

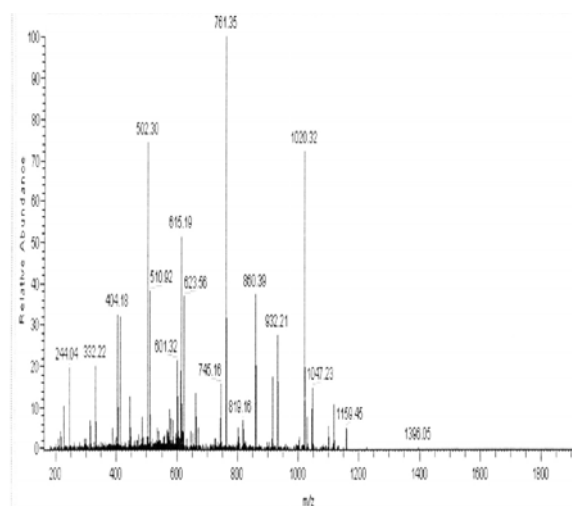
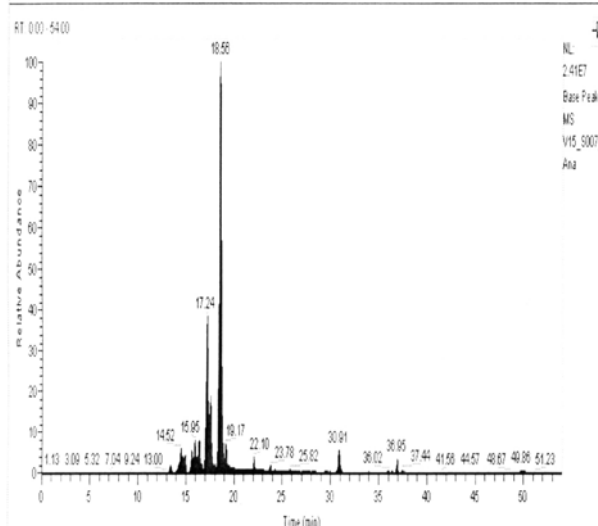
spot ที่	Isoelectric point (pI)	น้ำหนัก โมเลกุล
VT1	9.99	46
VT2	9.99	38
VT3	5.85	30
VT4	5.63	30
VT5	5.27	20
VT6	9.90	27
VT7	9.90	28
VT8	6.51	51
VT9	5.87	85
VT10	5.81	85
VT11	5.75	85

spot ที่	Isoelectric point (pI)	น้ำหนัก โมเลกุล
VT12	8.81	46
VT13	8.41	47
VT14	9.08	35
VT15	8.48	35
VT16	8.32	36
VT17	9.20	39
VT18	8.48	34
VT19	10.51	103
VT20	10.53	123
VT21	10.55	142

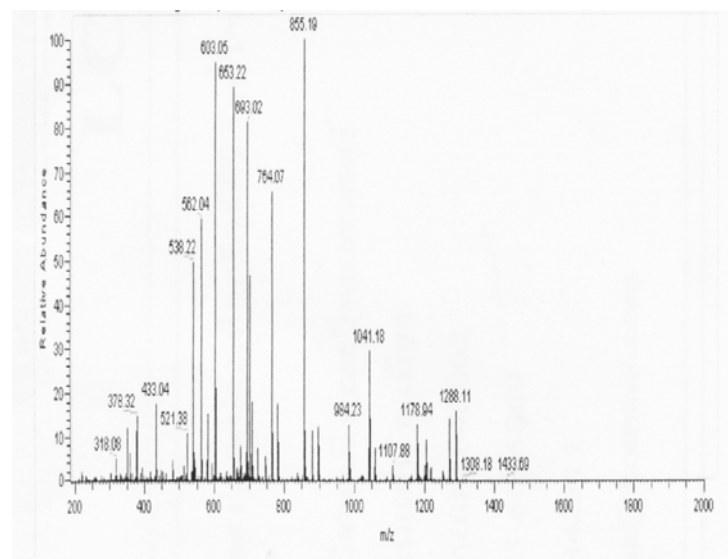
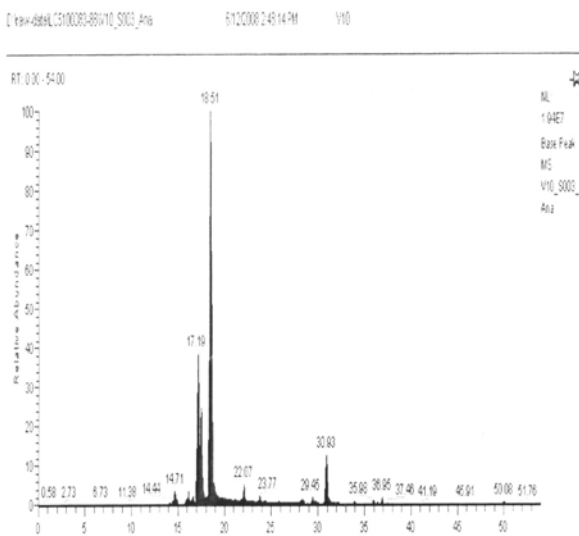
VT1



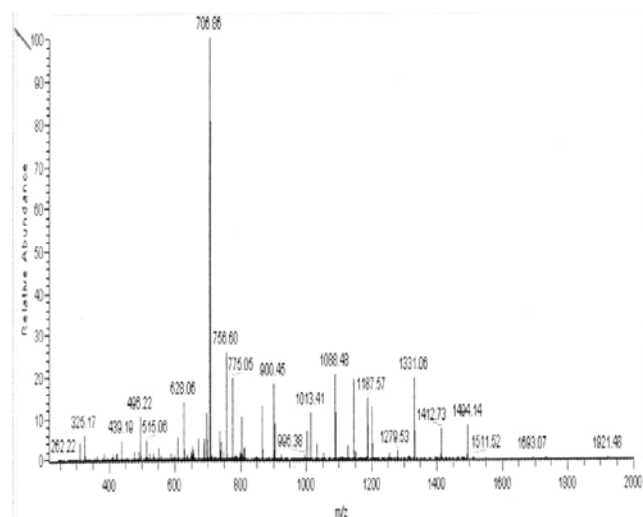
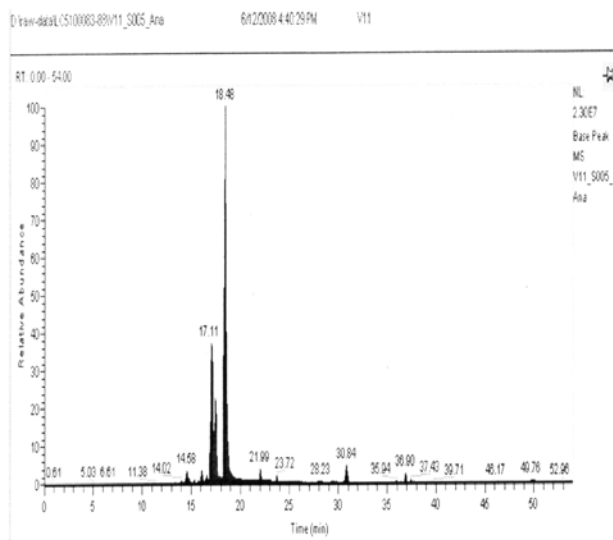
VT2



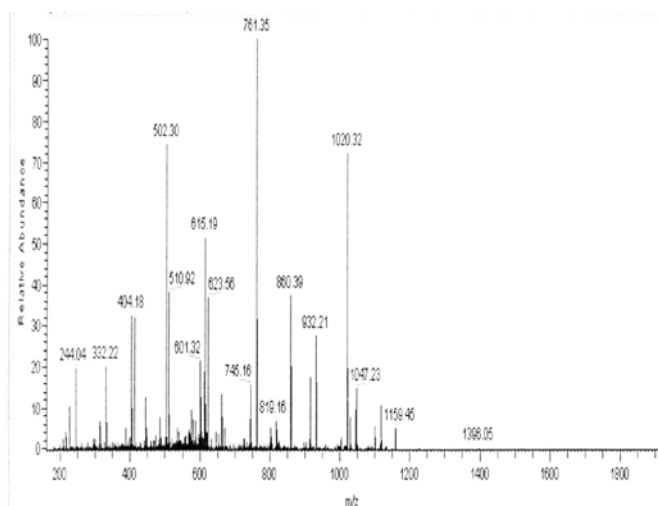
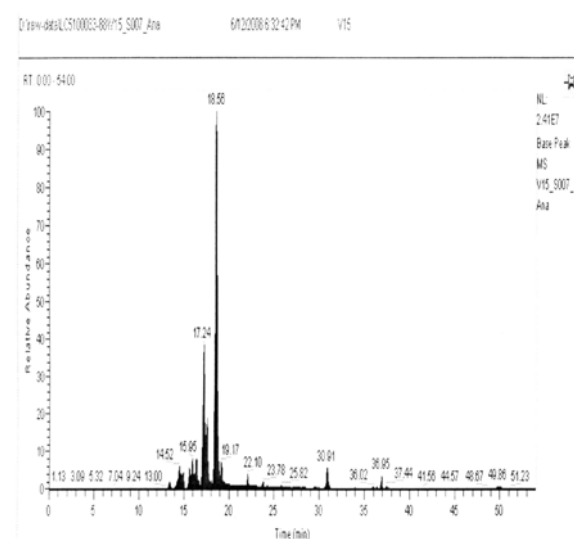
VT10



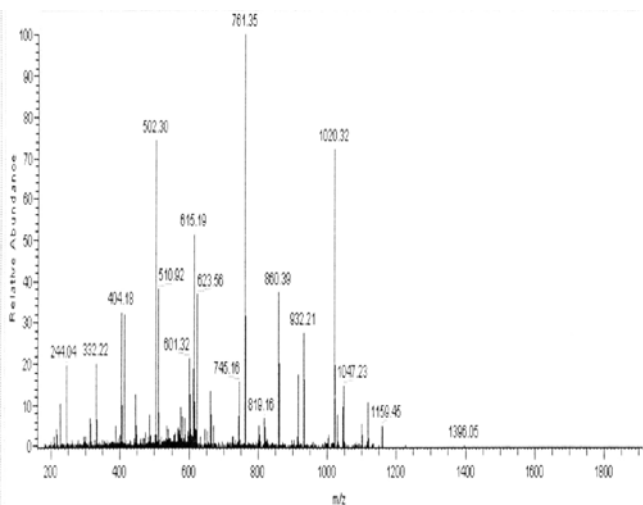
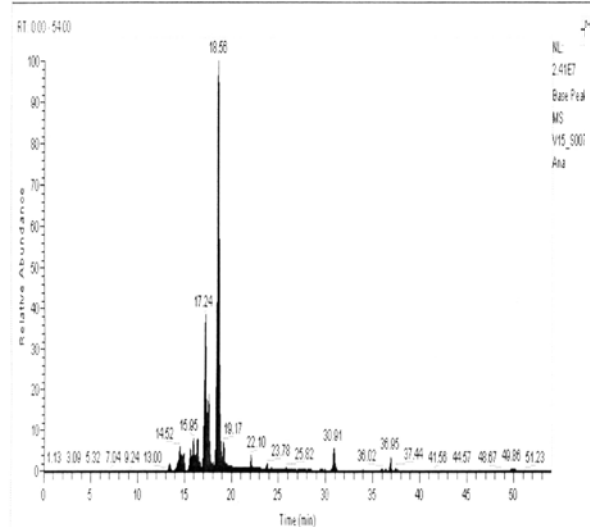
VT11



VT15



VT16



รูปที่ 4.4.4 ผลการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ของ spot ที่ VT1, VT2, VT10, VT11, VT15 และ VT16 จากการทำ 2D-PAGE ของน้ำพิษต่อหูลม (*V. tropica*)

ตารางที่ 4.4.2 ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ spot VT1, VT2, VT7, VT8, VT10, VT11, VT13, VT15, VT16, VT18 และ VT19 จากการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากฐานข้อมูล

Spot No.	Reference scan	Peptide	Score XC	MW
VT1	gi 74772895 sp Q5D7H4.1 HUGAB_VESV U Hyaluronoglucosaminidase B (Hyaluronidase B) (Allergen Ves v 2b) [<i>Vespula vulgaris</i>]	K.WDKSM*IEK.E	30.22	40.07
		K.ELDEIYPK.K		
VT2	gi 116174182 emb CAL59819.1 hyaluronidase homologue [<i>Vespula germanica</i>]	K.WDKSM*IEK.E	30.22	33.78
		K.ELDEIYPK.K		
VT7	gi 1709542 sp P53357 PA12_DOLMA Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02) (Dol m I) [<i>Dolichovespula maculata</i>]	K.YLTECIR.R, K.YIADFSK.I	38.33	38.07
		R.ICETDAHYVQILHTSSNLGTER.T		
VT7	gi 549184 sp P35781 VA51_VESCR Venom allergen 5.01 (Antigen 5-1) (Ag5-1) (Allergen Vesp c 5.01) (Vesp c V.01) [<i>Vespa crabro</i>]	R.LIGHSLGAQIAGFAGK.E	36.19	
		K.TKEIGCGSIK.Y		
VT8	gi 110277461 gb ABG57265.1 dipeptidylpeptidase IV [<i>Vespa basalis</i>]	K.YIENGWHR.H	134.25	
		K.VGHYTQM*VWAK.T		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.FGISTKPNCGK.N	298.27	69.39
		K.AEKLKILK.Q		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	R.QKVAQGLETR.G		
		R.FSNNGFNDVQR.V		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	R.IYYLATGPGKPSQR.N		
		R.KLGTVEVEDQISVTR.K		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.M*LFEIYRK.L, R.SVIYAYIDGR.G		
		R.LFLPHNFDESK.S		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.DLTSVFK.C		
		K.KVYSWEDNLSLR.S		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.TCVADESAENCDK.S		
		R.ETYGEM*ADCCAK.Q		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.ADDKETCFAEEGKK.L		
		K.DDNPNLPR.L		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.ADDKETCFAEEGK.K		
		K.YICENQDSISSK.L		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.AAFTECCQAADK.A		
		K.TYETTLEK.C		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.ECCEKPLLEK.S		
		K.AEFAEVSK.L		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.LKECCEKPLLEK.S		
		K.VHTECCHGDLLECADDR.A		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	R.FKDLGEENFK.A		
		K.KYLYEIAR.R		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.LVNEVTEFAK.K		
		K.KQTALVELVK.H		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.FQNALLVR.Y		
		R.RPCFSALEVDETYVPK.E		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.LVAASQAALGL		
		K.QNCELFEQLGEYK.F		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q		
		K.AVMDDFAAFVEK.C		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.DVFLGM*FLYEYAR.R		
		R.RHPYFYAPELFFAK.R		
VT10	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	K.LVAASQAALGL		
		R.RHPDYSVLLLR.L		

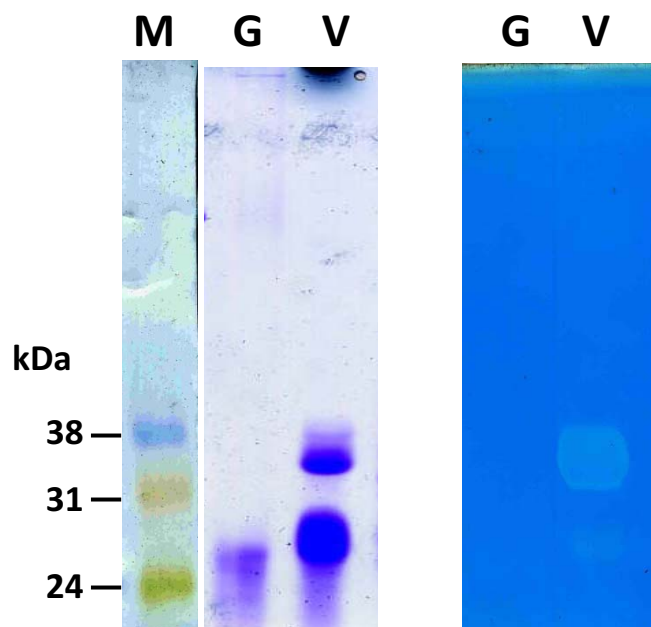
Spot No.	Reference scan		Peptide	Score XC	MW
VT11	gi 4502027 ref NP_000468.1 preproprotein [<i>Homo sapiens</i>]	albumin	K.TCVADESAENCDK.S K.CCAAADPHECYAK.V R.ETYGEM*ADCCAK.Q K.ADDKETCFAEEGKK.L K.YICENQDSISSK.L K.AAFTECCQAADK.A K.CCTESLVNR.R K.TYETTLEK.C K.ECCEKPLLEK.S K.AEFAEVSK.L K.VHTECCHGDLLECADDR.A R.FKDLGEENFK.A K.KYLYEIAR.R K.YLYEIAR.R K.KVPQVSTPTLVEVSR.N K.LVNEVTEFAK.K K.SLHTLFGDK.L K.VPQVSTPTLVEVSR.N R.RPCFSALEVDETYVPK.E K.LVAASQAALGL K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q K.AVMDDFAAFVEK.C R.RHPDYSVVLRL.L K.DVFLGM*FLYEYAR.R R.RHPYFYAPELLFFAK.R K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L K.DVFLGM*FLYEYAR.R	298.28	69.36
VT13	gi 1346322 sp P49371.1 HUGA_DOLMA Hyaluronoglucosaminidase (Hyaluronidase) (Allergen Dol m 2) (Dol m II) [<i>Dolichovespula maculata</i>]		K.KM*IELEASK.R K.M*IELEASKR.F R.LFM*EETLK.L	54.15	
VT15	gi 1709542 sp P53357 PA12_DOLMA Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02) (Dol m I) [<i>Dolichovespula maculata</i>]		K.YLTECIR.R R.NECVCVGLNAK.E	20.22	33.78
VT16	gi 1709542 sp P53357 PA12_DOLMA Phospholipase A1 2 (Allergen Dol m 1.02) (Dol m I) [<i>Dolichovespula maculata</i>]		R.NECVCVGLNAK.E K.YLTECIR.R R.ICETDAHVVQILHTSSNLGTER.T R.LIGHSLGAQIAGFAGK.E	40.19	33.78
VT18	gi 6136165 sp P81657 VA5_VESMA Venom allergen 5 (Antigen 5) (Ag5) (Allergen Vesp m 5) [<i>Vespa mandarinia</i>]		K.FGISTKPNCGK.N	10.16	
VT19	gi 167782086 gb ACA00159.1 dipeptidylpeptidase IV preproprotein [<i>Vespula vulgaris</i>]		R.FWSDCFSLSHAH K.VYSWENNLRLR.K R.QLQEM*FPWIDSK.R	50.21	

4.4.3 การทำบริสุทธิ์, การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนไซม์ Hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหูลุม และการสร้างแอนติบอดีต้านพิษ

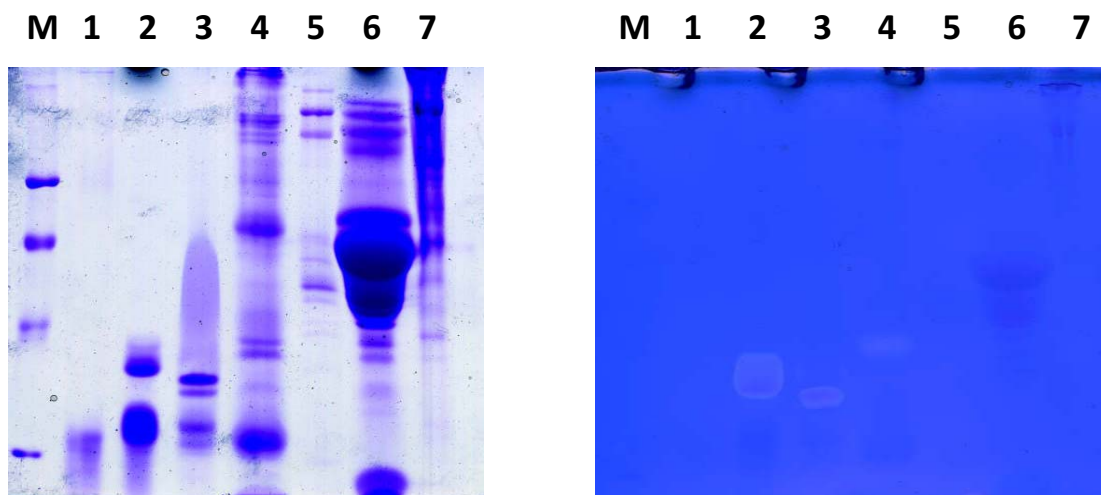
เอนไซม์ hyaluronidase เป็นองค์ประกอบหลักอย่างหนึ่งในน้ำพิษ ดังนั้น การศึกษาจะช่วยให้ทราบถึงกลไกการทำงาน ฤทธิ์ สมบัติ และอาจนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

4.4.3.1 การตรวจฤทธิ์ของเอนไซม์ hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหูลุม

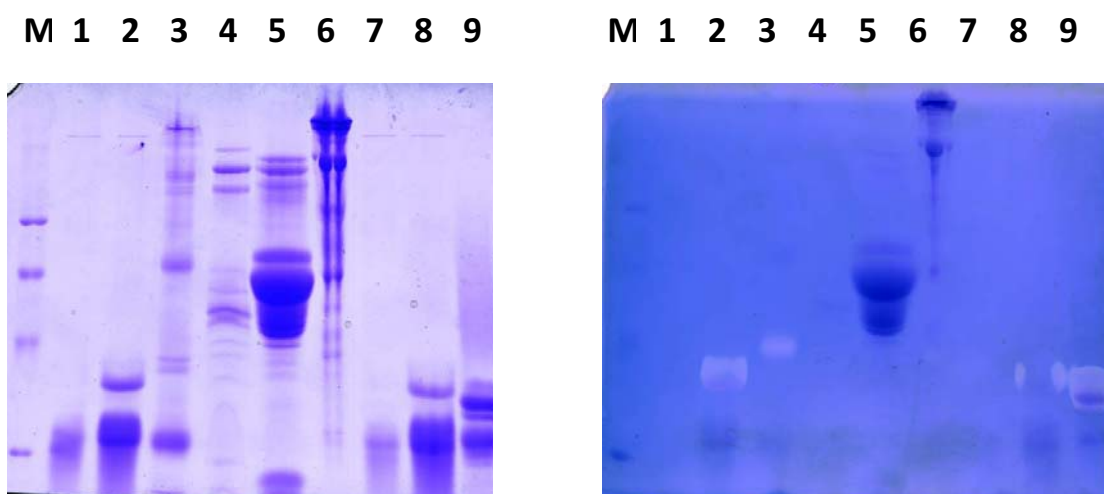
จากการศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหูลุม โดยเทคนิค substrate gel zymography (รูปที่ 4.4.5) พบฤทธิ์ของ hyaluronidase ในน้ำพิษ เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของเอนไซม์ในน้ำพิษของต่อหูลุมกับของสัตว์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ต่อหัวเสือ (*V. affinis*), แมงป่องช้าง (*Heterometrus laoticus*), งูเห่า (*Naja naja siamensis*), จูงอาน (*Ophiophagus hannah*), ตะขาบ (*Scolopendra subspinipes dehaani*) (รูปที่ 4.4.6 และ 4.4.7) พบว่า เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนในน้ำพิษใกล้เคียงกัน พิษต่อหูลุมมีฤทธิ์สูงสุด รองลงมาคือ น้ำพิษต่อหัวเสือ และน้ำพิษแมงป่องช้าง ที่น่าสนใจคือ พิษงูเห่า และจูงอาน เกือบไม่พบฤทธิ์ของเอนไซม์นี้เลย สาเหตุเป็นเพราะว่า พิษงูทั้งสองซึ่งอยู่ในกลุ่ม elapid ออกฤทธิ์ด้วย meurotoxin ที่อยู่ในน้ำพิษ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการส่งกระแสประสาทไปที่กล้ามเนื้อกระบังลมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สาเหตุของการเสียชีวิต คือ การหายใจไม่ได้ ฤทธิ์ของเอนไซม์ hyaluronidase จึงไม่โดดเด่นพอในน้ำพิษงูทั้งสอง



รูปที่ 4.4.5 การตรวจฤทธิ์ของเอนไซม์ Hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหูลุมด้วยวิธี substrate gel zymography รูปซ้าย เป็นการนำเจลมาย้อมด้วย Coomassie Brilliant blue ส่วนรูปขวา เป็นการหาฤทธิ์ของเอนไซม์ ด้วยการย้อมเจลด้วยสี Alcian blue (G = venom gland extract, V = venom)



รูปที่ 4.4.6 การตรวจฤทธิ์ของเอนไซม์ Hyaluronidase ด้วยวิธี substrate gel zymography รูปซ้าย เป็นการนำเจลมาย้อมด้วย Coomassie Brilliant blue ส่วนรูปขวา เป็นการหาฤทธิ์ของเอนไซม์ ด้วยการย้อมเจลด้วยสี Alcian blue (lane M คือ marker, lane 1 ต่อมพิษของต่อหูลุม (*V. tropica*), lane 2 น้ำพิษของต่อหูลุม (*V. tropica*), lane 3 น้ำพิษของต่อหัวเสือ (*V. affinis*), lane 4 น้ำพิษของแมงป่องช้าง (*H. laoticus*), lane 5 พิษงูเห่า (*N. n. siamensis*), lane 6 พิษงูจงอาง (*O. hannah*), lane 7 พิษตะขาบ (*S. s. dehaani*), ทุก lane ใช้ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัมเท่ากัน)



รูปที่ 4.4.7 การตรวจฤทธิ์ของเอนไซม์ Hyaluronidase ด้วยวิธี substrate gel zymography รูปซ้าย เป็นการนำเจลมาย้อมด้วย Coomassie Brilliant blue ส่วนรูปขวา เป็นการหาฤทธิ์ของเอนไซม์ ด้วยการย้อมเจลด้วยสี Alcian blue (lane M คือ marker, lane 1 ต่อมพิษของต่อหูลุม (*V. tropica*) 5 ไมโครกรัม, lane 2 น้ำพิษของต่อหูลุม 5 ไมโครกรัม, lane 3 น้ำพิษของแมงป่องช้าง 5 ไมโครกรัม, lane 4 พิษงูเห่า 5 ไมโครกรัม, lane 5 พิษงูจงอาง 5 ไมโครกรัม, lane 6 พิษตะขาบ 5 ไมโครกรัม, lane 7 ต่อมพิษของต่อหูลุม 10 ไมโครกรัม, lane 8 น้ำพิษของต่อหูลุม 10 ไมโครกรัม, lane 9 น้ำพิษของต่อหัวเสือ (*V. affinis*) 5 ไมโครกรัม)

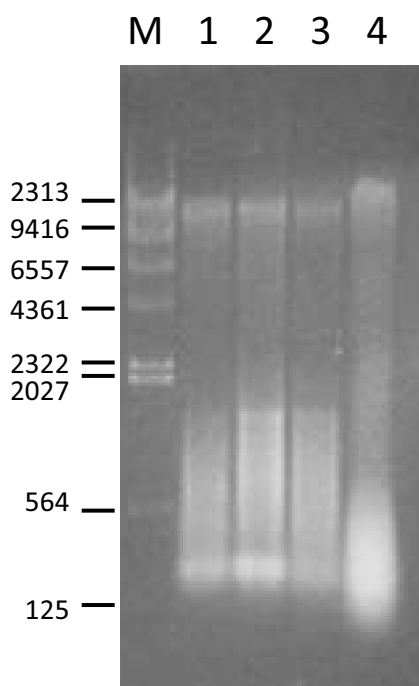
จากการศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหูลุม โดยเทคนิค 2D-PAGE Activity gel assay (รูปที่ 4.4.8) พบฤทธิ์ของเอนไซม์อย่างเด่นชัด 2 spot จึงคาดว่าน่าจะมี 2 isoform



รูปที่ 4.4.8 การตรวจฤทธิ์ของเอนไซม์ Hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหูลุมด้วยวิธี 2D-PAGE Activity gel assay (G = venom gland extract, V = venom)

4.4.3.2 การสกัด Genomic DNA ของต่อหูลุมเพื่อใช้เป็นแม่แบบในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ hyaluronidase

เพื่อเป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ hyaluronidase ด้วยวิธี PCR จึงได้มีการสกัด Genomic DNA จากอวัยวะต่าง ๆ ของตัวต่อด้วยวิธี phenol chloroform (รูปที่ 4.4.9) และมีการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ต้นแบบจากเอนไซม์ hyaluronidase ของ hymenoptera ชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 4.4.3) ส่วนผลการเพิ่มจำนวนยีนด้วยวิธี PCR (รูปที่ 4.4.10) นั้น ยังไม่ประสบผลสำเร็จ



รูปที่ 4.4.9 ผลการสกัด Genomic DNA จากอวัยวะต่าง ๆ ของต่อหูลุม โดยที่ lane M คือ marker, lane 1 และ 2 จากส่วน thorax, lane 3 จาก abdomen และ lane 4 จากต่อมพิษ

ตารางที่ 4.4.3 แสดง primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์ hyaluronidase ด้วยวิธี PCR

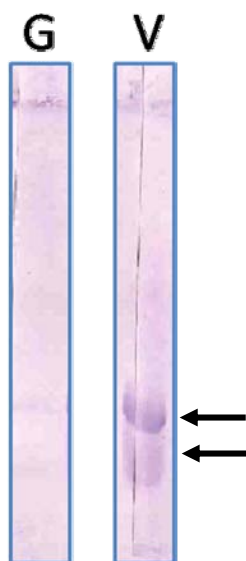
	Sequence (5'->3')	Product size	Length	Start	Stop
F1	CGAAAAGGAAGCGTCGAATAG	190	20	441	460
R1	CATCTTGTCGTTCTCGCTCA		20	630	611
F2	TC(G/C)TAAAGAACATCCAAA(A/G)TGG	226	22	405	426
R2	ACATCGGCTTCGGTAAGAAA		20	839	820
F3	CATTATTGGAACGTTCTACT	598	22	33	53
R3	CATCTTGTCGTTCTCGCTCA		20	630	611



รูปที่ 4.4.10 ผลการเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์ hyaluronidase ของต่อหูลุมด้วยวิธี PCR

4.4.3.3 การสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเอนไซม์ hyaluronidase ของน้ำพิษต่อหูลุม

เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเซรุ่มต้านพิษ จำเป็นต้องสร้างแอนติบอดีที่ต้านต่อโปรตีนที่มีฤทธิ์เด่นในน้ำพิษ แล้วนำไปทำ neutralization assay ดังนั้น ในครั้งนี้ได้ทำการสร้างแอนติบอดีที่ต้านต่อเอนไซม์ hyaluronidase ในน้ำพิษต่อหูลุม ผลการตรวจค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่มีต่อเอนไซม์ hyaluronidase (รูปที่ 4.4.11) พบว่า แอนติบอดีจับได้กับแถบโปรตีน hyaluronidase อย่างจำเพาะที่ค่าไตเตอร์ 1:10 ต่อมา ได้หาค่า PD_{100} ของน้ำพิษต่อหูลุม มีค่าเท่ากับ 0.011 mg/ g Body weight (ตารางที่ 4.4.5) ส่วนค่า PD_{100} ของน้ำพิษต่อหัวเสือมีค่าเท่ากับ 1.202 mg/g body weight (ตารางที่ 4.4.6) เมื่อทดสอบในจิ้งหรีด แสดงว่า น้ำพิษต่อหูลุมมีฤทธิ์รุนแรงกว่าน้ำพิษต่อหัวเสือกว่า 100 เท่าเลยทีเดียว (อย่างไรก็ตามค่าดังกล่าวยังนำมาใช้เทียบเคียงในคนไม่ได้) จากนั้น เมื่อทำการตรวจสอบการต้านฤทธิ์ของ anti-hyaluronidase antibody ด้วยวิธี Neutralization assay (รูปที่ 4.4.12 และตารางที่ 4.4.7) พบว่า เมื่อใช้ Venom ต่อ Serum ในอัตราส่วน 1:12 จะไม่พบการตายของจิ้งหรีดเลย แสดงว่า anti-hyaluronidase antibody สามารถต้านฤทธิ์ของน้ำพิษได้ แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ hyaluronidase ในน้ำพิษว่าเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญในน้ำพิษ



รูปที่ 4.4.11 ผลการตรวจไตเตอร์ในซีรัมหนูถีบจักรที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ hyaluronidase จากน้ำพิษต่อหูลุมด้วยวิธี Western immunoblotting (G = gland extract venom, V = venom)

ตารางที่ 4.4.5 ค่า PD_{100} ของน้ำพิษต่อหูลุม

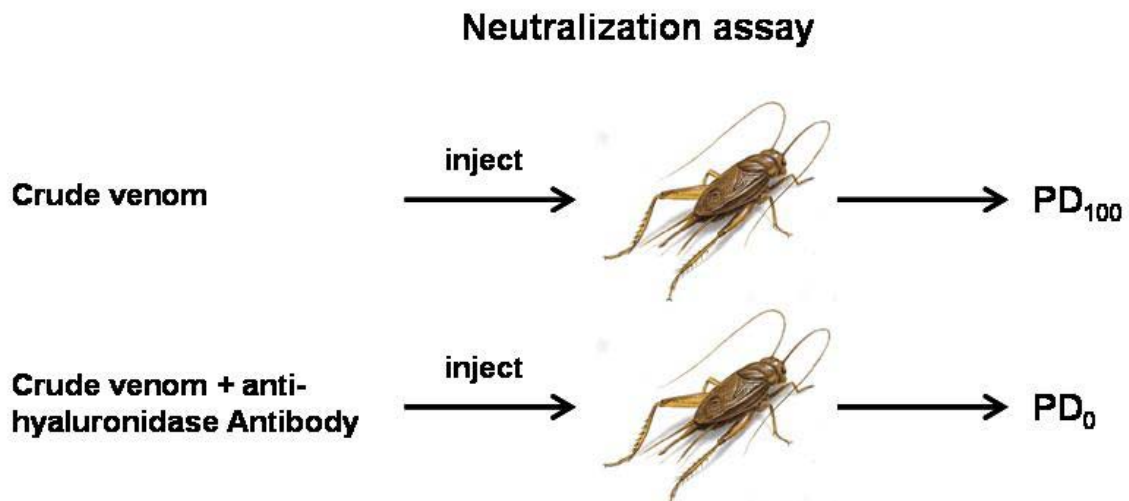
Venom (6.862 μ g Protein/ μ l)	Paralyzed crickets after injection with <i>V. tropica</i> venom
2 μ l	4/4
0.5 μ l	4/4
0.25 μ l	3/4

PD_{100} = 0.011 mg/ g Body weight

ตารางที่ 4.4.6 ค่า PD_{100} ของต่อหัวเสือ

Venom (72.13 μ g Protein/ μ l)	paralyzed crickets after injection with <i>V. affinis</i> venom
7 μ l	4/4
5 μ l	4/4
2 μ l	3/4

PD_{100} ต่อหัวเสือ 1.202 mg/g body weight



รูปที่ 4.4.12 การทำ Neutralization assay ของ anti-hyaluronidase antibody

ตารางที่ 4.4.7 แสดงจำนวนการรอดชีวิตของจิ้งหรีดภายหลังได้รับน้ำพิษต่อหลุมผสมกับ anti-hyaluronidase antiserum

Venom: Serum	paralyzed crickets after injection with <i>V. tropica</i> venom
1:4	2/4
1:8	1/4
1:12	0/4

4.4.4 การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนไซม์ Phospholipase ในน้ำพิษต่อหลุม และการสร้างแอนติบอดีต้านพิษ

เอนไซม์ phospholipase ก็เป็นองค์ประกอบหลักอีกอย่างหนึ่งในน้ำพิษ ดังนั้น การศึกษาจะช่วยให้ทราบถึงกลไกการทำงาน ฤทธิ์ สมบัติ และอาจนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ต่อไปเช่นกัน

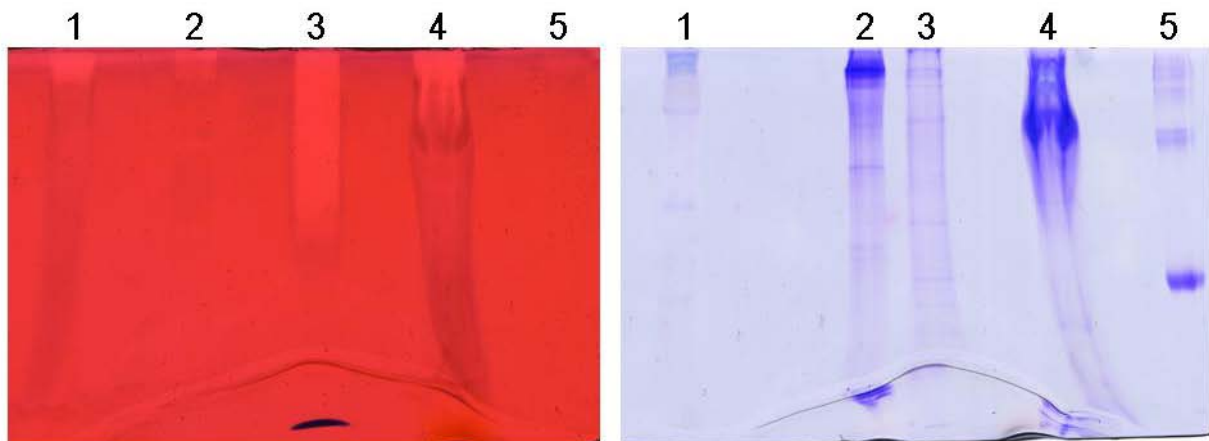
4.4.4.1 การตรวจสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ phospholipase ในน้ำพิษต่อหลุมด้วยวิธี colorimetric

เก็บตัวอย่างน้ำพิษจากต่อหลุม (*V. tropica*), งูจงอาง (*O. hannah*), งูเห่า (*N. samensis*), แมงป่องช้าง (*H. laoticus*), มดคันไฟ (*S. germinata*) และสารสกัดจากต่อมสะสมพิษของต่อหลุม น้ำพิษและสารสกัดจากต่อมสะสมพิษที่ได้มาผสมกับ PBS buffer, pH 7.4 15 μ l และ reaction solution นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วคำนวณ activity พบว่าได้ค่า activity ของเอนไซม์เท่ากับ $22,485.20 \pm 6,420.87$, $48,404.83 \pm 1,876.65$, $41,894.53 \pm 9,343.07$, $81,148.56 \pm 6,447.32$, $14,216.86 \pm 2,778.93$ และ $143,037.97 \pm 31,601.24$ U/mg ตามลำดับ

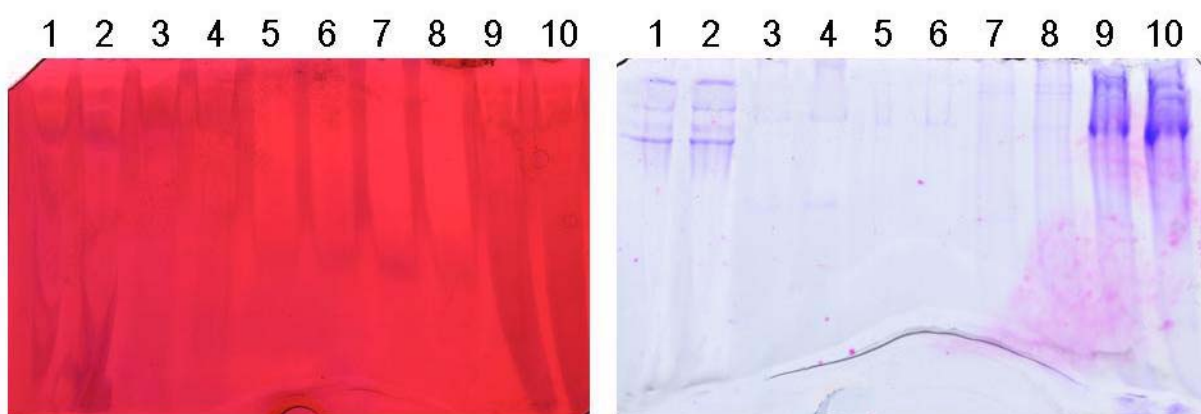
4.4.4.2 การตรวจสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ phospholipase ในน้ำพิษต่อหลุมด้วยวิธี zymography

เตรียม 13% separating gel และ 4% stacking gel แบบ native-PAGE ที่มี 5 mg/ml phosphatidylcholine ผสมใน separating gel ด้วย เตรียมตัวอย่างน้ำพิษจากต่อหลุม, งูจงอาง, งูเห่า, แมงป่องช้างและสารสกัดจากต่อมสะสมพิษของต่อหลุมใน solubilizing buffer นำมาแยกด้วย gel electrophoresis ย้อมเจล แล้วสังเกตแถบสีที่เกิดขึ้น (รูปที่ 4.4.13 และ 4.4.14) พบ clear zone ในเลนที่โหลดพิษงูจงอาง, พิษงูเห่า, น้ำถั่วเหลืองสกัด, สารสกัดจากต่อมสะสมพิษของต่อหลุมและพิษแมงป่อง โดยพบ clear zone ชัดที่สุดใน lane ที่เป็นสารสกัดจากต่อมสะสมพิษของต่อหลุม สำหรับเลนที่โหลดน้ำถั่วเหลืองสกัดพบ clear zone เป็นแถบหนึ่งแถบ ส่วนเลนที่โหลดโปรตีน BSA ซึ่งใช้เป็น negative control ไม่พบ clear zone ใดๆ แม้ว่าจะพบแถบโปรตีนหลายแถบจากการย้อมด้วย 0.1% coomassie brilliant blue R250 (รูปที่ 4.4.13) จากนั้นทำการตรวจสอบโดยฤทธิ์ของเอนไซม์ phospholipase ในพิษงูจงอาง, พิษงูเห่า, พิษต่อหลุม, สารสกัดจากต่อมสะสมพิษของต่อหลุมและพิษแมงป่อง โดยใช้ตัวอย่าง 1 และ 2 μ g ตามลำดับ (รูปที่ 4.4.14) พบ clear zone ชัดเจนที่สุดใน lane

ที่เป็นพิษต่อหูลุมและสารสกัดจากต่อมสะสมพิษของต่อหูลุม แม้ว่าจากการย้อมโปรตีนด้วย 0.1% coomassie brilliant blue R250 จะพบแถบโปรตีนไม่มากนัก จะเห็นได้ว่าผลการตรวจสอบฤทธิ์ของ เอนไซม์ด้วยวิธี zymography นั้นสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธี colorimetric



รูปที่ 4.4.13 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ phospholipase ด้วยวิธี zymography โดยใช้ตัวอย่าง 5 μ g (A: ย้อมด้วย 0.1% coomassie brilliant blue R250, B: ย้อมด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4 ที่มี 20 mM CaCl_2 และ 0.12% Rhodamine 6G, lane 1: พืชงูเห่า, lane 2: น้ำถั่วเหลืองสกัด, lane 3: สารสกัดจากต่อมสะสมพิษของต่อหูลุม, lane 4: พืชแมงป่อง และ lane 5: BSA)



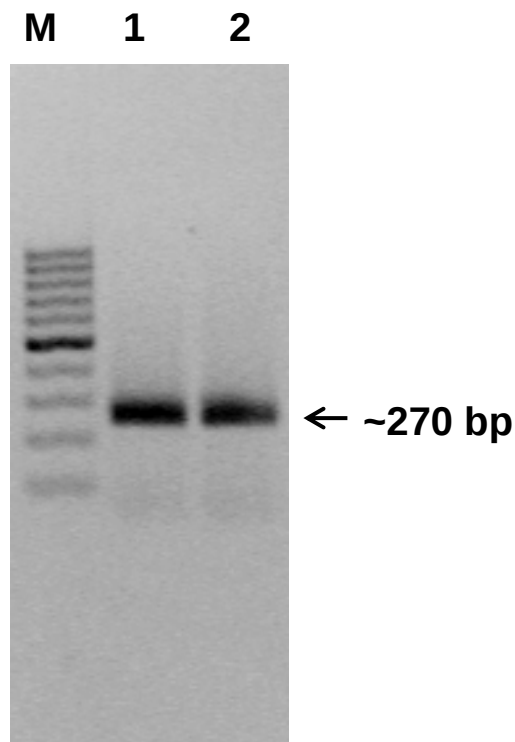
รูปที่ 4.4.14 การตรวจสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ phospholipase ด้วยวิธี zymography โดยใช้ตัวอย่าง 1 และ 2 μ g (A: ย้อมด้วย 0.1% coomassie brilliant blue R250, B: ย้อมด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4 ที่มี 20 mM CaCl_2 และ 0.12% Rhodamine 6G, lane 1, 2: พืชงูจงอาง, lane 3, 4: พืชงูเห่า, lane 5, 6: พืชต่อหูลุม, lane 7, 8: สารสกัดจากต่อมสะสมพิษของต่อหูลุม, lane 9, 10: พืชแมงป่อง)

4.4.4.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ phospholipase ในน้ำพิษของต่อหูลุม

เริ่มจากการสกัด RNA จากต่อมสะสมน้ำพิษของต่อหูลุม ทำการสกัด RNA จากต่อมสะสมน้ำพิษของต่อหูลุมด้วย RNeasy Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, UK) แล้วตรวจสอบ RNA ที่สกัดได้ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis เมื่อนำ RNA ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm พบว่า มีความบริสุทธิ์สูงพอสำหรับการเป็นแม่แบบ (template) ในการสังเคราะห์ cDNA จึงนำมาสังเคราะห์ first strand cDNA แล้วใช้เป็นแม่แบบในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, EU) ด้วย primer ที่ออกแบบจาก phospholipase A1 ของแมลงในวงศ์เดียวกัน คือ *Dolichovespula maculate*, *Vespula germanica* และ *Vespula vulgaris* (ตารางที่ 4.4.8) ได้ PCR product ขนาด 270 bp (รูปที่ 4.4.15) จึงได้ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ศูนย์อณูชีววิทยา (Biomolecular Analysis Service Unit) ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (รูปที่ 4.4.16) อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดยังไม่พบความเหมือนกับโปรตีนชนิดใด ๆ ในฐานข้อมูลที่เชื่อว่าจะเป็นโปรตีนในแมลง

ตารางที่ 4.4.8 Primer สำหรับ RT-PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน phospholipase A1 ของ *V. tropica*

Primer	ลำดับ
Forward primer PLAF1	CGGT(G/T)GG(C/A)TATAT(T/C)GC
Forward primer PLAF2	(C/A)GATGG(C/A)GT(G/T)TATCT(T/G)AC
Forward primer PLAF3	GCTGCTGGAAAA(C/T)AA(T/A)CG(C/A)
Forward primer PLAF4	GC(G/A)GGCAAAGA(A/G)TT(T/C)CA(G/A)
Forward primer PLAF5	(G/T)AAAGC(G/C/T)GT(G/T)GAAAA(C/T)AC
Forward primer PLAF6	AA(C/T)AT(T/A)CG(C/A)CTGATTGG(C/A)
Reverse primer PLAR1	AGGATA(T/C)TTCTTTGCGTT(T/C)
Reverse primer PLAR2	C(G/A)TCTGTCTCGCAAA(T/G)TC
Reverse primer PLAR5	T(C/T)GATGTATGTAAAATTTG



รูปที่ 4.4.15 แสดง RT-PCR product ของยีน phospholipase ของต่อหลุม ด้วย primer คู่ VPLA2F1 และ VPLA2R1 โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ

```

TGAAATGGCAAGTTAGCACAAACATTTGATATGTGTTCCACACTGAATCGACGGACACATTACGTTTCTTC 70
ATGCCGAAATACTGGAGAGACGACATCGATCCGATGCAGTTCAGCACTACTATCCTGAACTTACAATAGA 140
TGTTCTGGCTAACAACCGCCACTTCATCACCTGGACGGCGCAGGAAGCACAGCCAAGCGGTGTATGCCAC 210
AACAGAGGGTCAGTCTGTGCTGATCCTTGTTGTGCTTATGCGTATCTTGCATCTAACGACAAGAAATAC 280
CTTGAACCTGCTAAGTCTCTGCAGGC 306

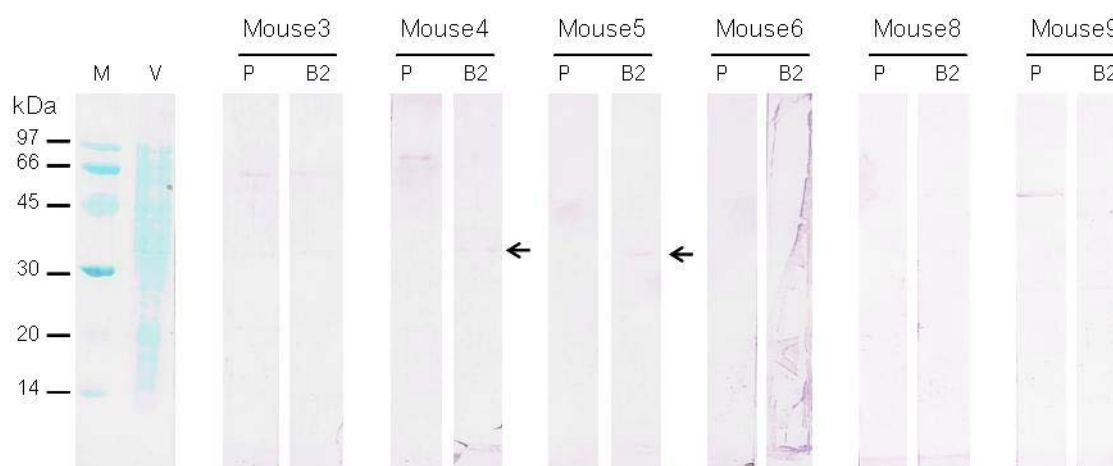
```

← R₁

รูปที่ 4.4.16 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phospholipase A2 ของต่อหลุม โดยศูนย์อณูชีววิทยา (Biomolecular Analysis Service Unit) ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ลูกศรแสดงตำแหน่งจับของ reverse primer

4.4.4.4 การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ phospholipase ในหนูถีบจักร

เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาเซรุ่มต้านต่อตัวออกฤทธิ์หลักในน้ำพิษ ซึ่ง phospholipase ก็เป็นองค์ประกอบหลักอย่างหนึ่ง จึงได้ทดลองสร้างแอนติบอดีในหนูถีบจักร แล้วนำมาทำ neutralization assay โดยเริ่มจากการกระตุ้นหนู 6 ตัวครั้งแรกด้วยพิษต่อหูลุม ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำด้วยโปรตีนที่คาดว่าคือ phospholipase (จากผลวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE) เก็บซีรัม แล้วนำซีรัมที่ได้ไปตรวจหาค่า titer และความจำเพาะด้วยวิธี Western immunoblotting ที่ค่าการเจือจาง 1:10 (รูปที่ 4.4.17) พบว่าเฉพาะหนูตัวที่ 4 และ 5 เท่านั้น ที่พบแถบโปรตีนขนาดราว 35 kDa ดังนั้น จึงคาดว่าหนูทั้งสองตัวสร้างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ phospholipase ได้ด้วยค่าไตเตอร์ 1:10 จึงได้นำไปตรวจการต้านฤทธิ์ต่อน้ำพิษต่อหูลุมด้วย neutralization assay (ตารางที่ 4.4.9) พบว่าแอนติบอดีสามารถลบล้างน้ำพิษได้ที่สัดส่วน น้ำพิษต่อซีรัม 1 ต่อ 10 ซึ่งคาดว่า phospholipase เป็นองค์ประกอบสำคัญในน้ำพิษ แม้เพียงยับยั้ง phospholipase เพียงตัวเดียวก็ลดฤทธิ์ไปได้ ซึ่งอาจใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเซรุ่มต้านพิษได้



รูปที่ 4.4.17 ผลการตรวจไตเตอร์ในซีรัมหนูถีบจักรที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ phospholipase จากน้ำพิษต่อหูลุมที่ค่าไตเตอร์ 1:10 (lane M คือ marker, lane V คือ crude venom, lane P คือ pre-immunized serum, lane B2 คือ serum ภายหลัง second booster)

ตารางที่ 4.4.9 Neutralization assay ของ anti-phospholipase antibody ต้านต่อน้ำพิษต่อหูลุม

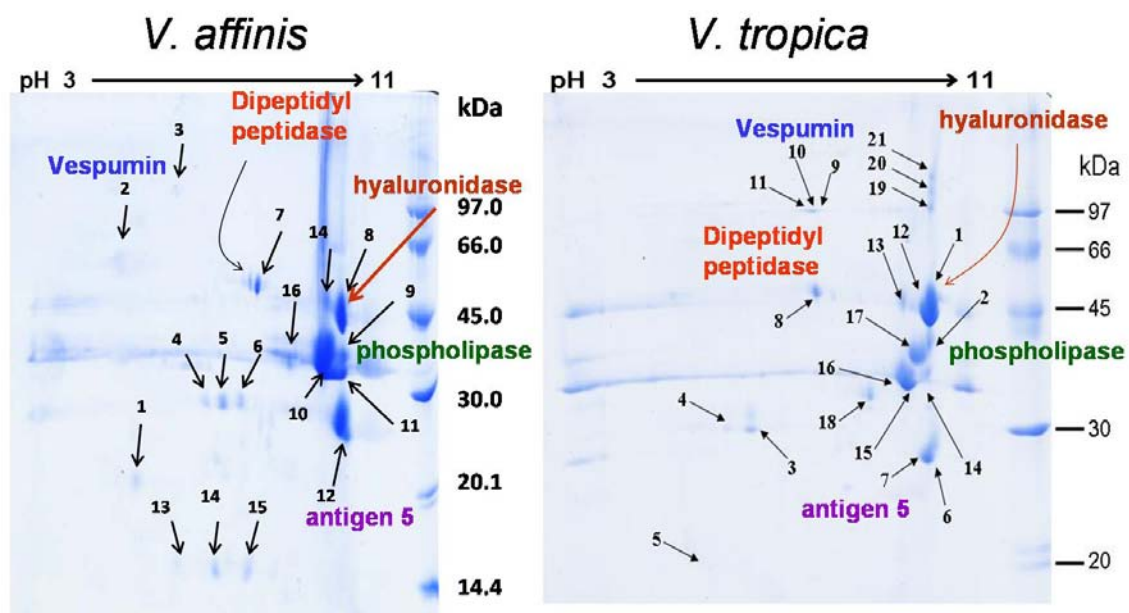
Venom: Serum	paralyzed crickets after injection with <i>V. tropica</i> venom
1:4	2/4
1:8	1/4
1:10	0/4

4.4.5 ข้อเปรียบเทียบระหว่างน้ำพิษของต่อหัวเสือ (*V. affinis*) และต่อหลุม (*V. tropica*)

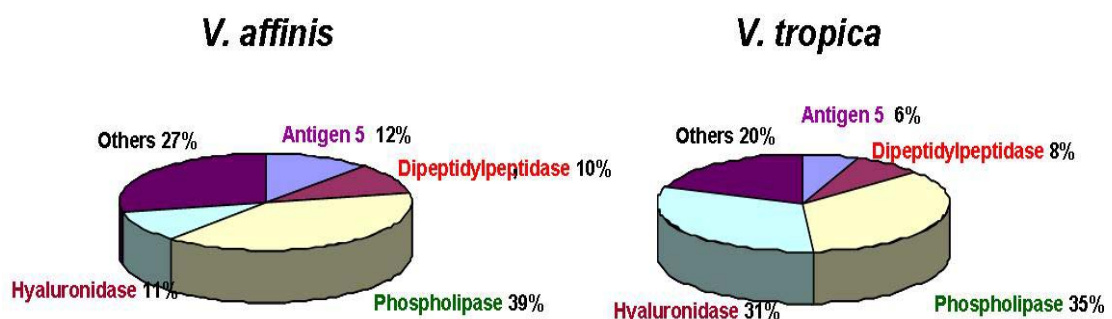
สัตว์ทั้งสองชนิดอยู่ในตระกูล (genus) เดียวกัน มีรูปร่างคล้ายกัน อุปนิสัยโดยทั่วไปคล้ายกัน ยกเว้นสถานที่ทำรัง ต่อหัวเสือทำรังบนต้นไม้ ขณะที่ต่อหลุมทำรังอยู่ในโพรงดิน (จึงได้ชื่อว่าต่อหลุม) แต่น้ำพิษมีฤทธิ์แตกต่างกันมาก สำหรับต่อหัวเสือนั้น มีฤทธิ์รุนแรงมาก เด็กเล็ก ๆ และคนชรา อาจเสียชีวิตได้ หากถูกต่อยแม้เพียงตัวเดียว ซึ่งก็มักเป็นข่าวอยู่เสมอ แต่สำหรับต่อหลุมนั้น จากคำบอกเล่าของชาวบ้านในหมู่บ้านเชียงเซา ตำบลบ้านเอื้อง อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม บอกว่าต่อหลุมสามารถทำร้ายสัตว์ขนาดใหญ่ เช่น วัวควาย เสียชีวิตได้ แสดงให้เห็นว่าน้ำพิษของต่อหลุมอาจมีฤทธิ์รุนแรงยิ่งกว่า ทางผู้วิจัยจึงได้ทดสอบความแรงของน้ำพิษในจังหวัด พบว่า น้ำพิษของต่อหลุมให้ค่า paralyzed dose 100 (PD₁₀₀) ต่ำกว่าน้ำพิษของต่อหัวเสือถึงกว่า 100 เท่า (ตารางที่ 4.4.5 และ 4.4.6) แสดงว่าน้ำพิษของต่อหลุมมีฤทธิ์รุนแรงกว่านับ 100 เท่า เมื่อวิเคราะห์รูปแบบจาก 2D-PAGE พบว่า รูปแบบของโปรตีนในน้ำพิษคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 4.4.18) และตำแหน่งของโปรตีนที่ระบุได้ มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ ๆ อยู่ 4 ชนิด คือ dipeptidylpeptidase, hyaluronidase, phospholipase และ venom allergen 5 (ส่วน Vespumin นั้นพบว่ามีมากน้อยตามฤดูกาล จะพบมากในช่วงต้นฤดูของการวางไข่ เนื่องจากเหล็กในเป็นอวัยวะดัดแปลงมาจากท่อวางไข่ ซึ่งต้องานเป็นต่อตัวเมียทั้งสิ้น แม้จะไม่มีหน้าที่ในการวางไข่แล้ว แต่ยังคงพบอัลบูมินซึ่งเป็นองค์ประกอบของไข่ได้ในน้ำพิษในบางช่วงเวลา โดยเฉพาะต้นฤดูฝนซึ่งเป็นเวลาที่นางพญามีการวางไข่เป็นจำนวนมาก) เมื่อนำมาหาสัดส่วนขององค์ประกอบแต่ละชนิด โดยใช้การคำนวณ ดังนี้

$$\%Intensity = \frac{Intensity}{\sum_{S=1}^n Intensity_S} \times 100, \quad \text{where } Intensity_S \text{ is the calibrated intensity of spot } S \text{ in a gel containing } n \text{ spots}$$

แล้วนำมา plot กราฟวงกลม (รูปที่ 4.4.19) พบว่า ปริมาณของ dipeptidylpeptidase, phospholipase และ venom allergen 5 อาจไม่ค่อยแตกต่างกันนัก แต่ปริมาณของ hyaluronidase นั้น ในต่อหลุมมีปริมาณมากกว่าต่อหัวเสือถึงเกือบ 3 เท่า คาดว่า hyaluronidase น่าจะมีบทบาทสำคัญในเรื่องความแรงของน้ำพิษ



รูปที่ 4.4.18 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษต่อหัวเสือ (*V. affinis*) และต่อหัวเสือ (*V. tropica*) เมื่อวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE แสดงชนิดของโปรตีนที่ระบุได้ชัดเจนแล้วด้วยวิธี LC-MS/MS

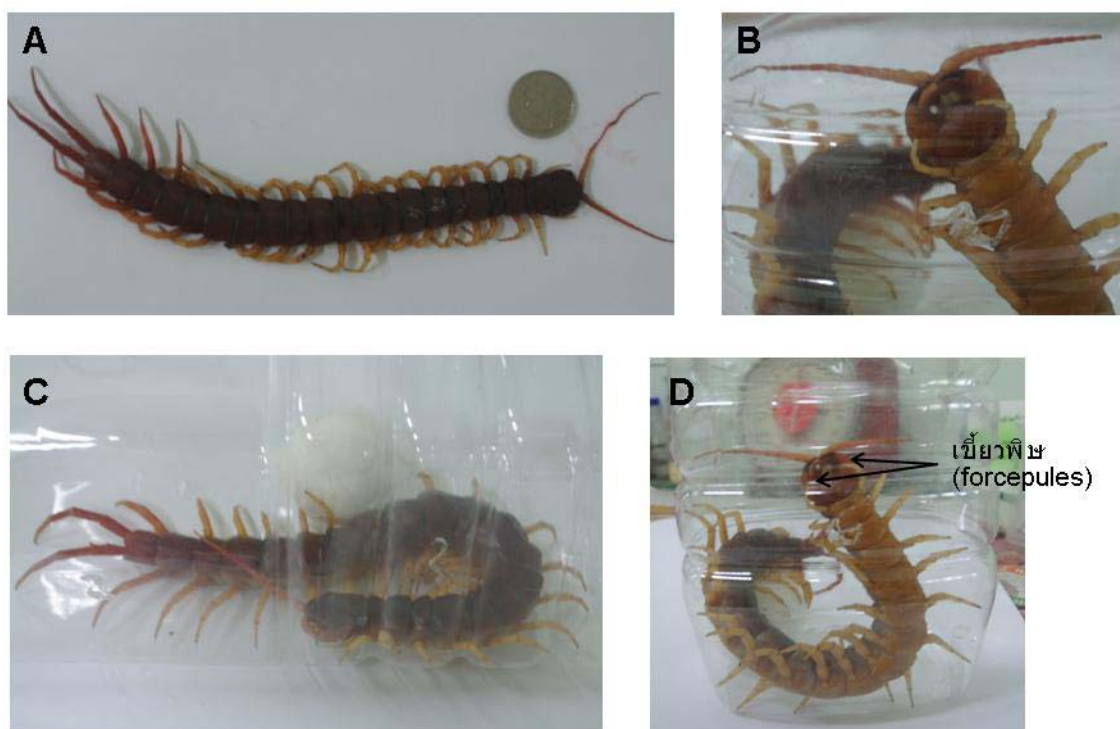


รูปที่ 4.4.19 กราฟวงกลมแสดงสัดส่วนของโปรตีนแต่ละชนิดต่อผลรวมของโปรตีนทั้งหมด

ตอนที่ 4.5 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษตะขาบ (*Scolopendra subspinipes dehaani*) การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนออกฤทธิ์ในน้ำพิษ

4.5.1 ตะขาบและการรีดพิษ

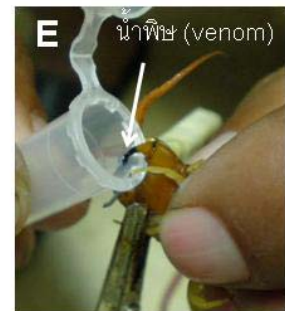
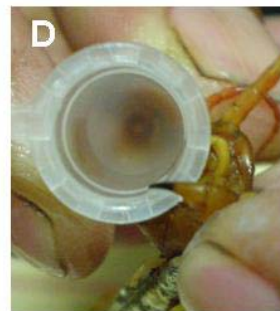
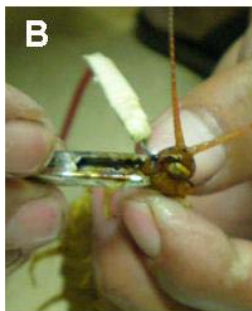
ตะขาบรับซื้อจากชาวบ้านในละแวกใกล้เคียงกับมหาวิทยาลัยขอนแก่น เฉพาะตัวเต็มวัย (ขนาดเกิน 10 ซม.) ในราคาตัวละ 40-50 บาท แล้วนำมาเลี้ยงไว้ในตู้กระจกในห้องเลี้ยงสัตว์ของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (รูปที่ 4.5.1) ซึ่งปรับอุณหภูมิไว้ที่ราว 28°C ให้ปลาขนาดเล็ก ไล่เดือนและแมลงเป็นอาหาร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง น้ำพิษตะขาบ รีดพิษได้ การช็อคด้วยความเย็นเพื่อให้อยู่นิ่ง จากนั้นกระตุ้นการหลั่งของน้ำพิษด้วยการช็อคด้วยไฟฟ้า 100 V duration 1-msec ที่ความถี่ 10 Hz ด้วยเครื่อง Grass stimulator model S88 (รูปที่ 4.5.2) โดยต่อเครื่องช็อคไฟฟ้าเข้ากับบริเวณเขี้ยวพิษ (forcepules) เก็บน้ำพิษใน microtube ที่อุณหภูมิ -30 °C เพื่อใช้งานต่อไป



รูปที่ 4.5.1 (A-C) ตะขาบ (*Scolopendra sp.*) ที่นำมาเลี้ยงในห้องสัตว์เลี้ยง (D) แสดงเขี้ยวพิษ (forcepules)



รูปที่ 4.5.2 (A) เครื่องช็อตไฟฟ้าใช้ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำพิษ (B-E) ขั้นตอนการรีดพิษตะขาบ (E) น้ำพิษ (venom) จากเขี้ยวพิษ



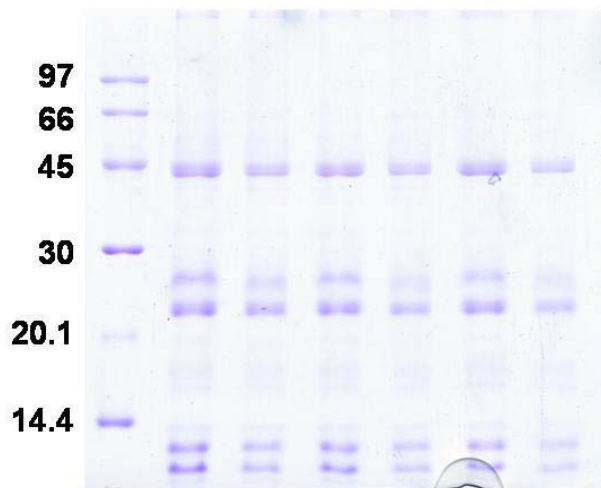
4.5.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษตะขาบ

4.5.2.1 การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำพิษด้วยวิธี Tris-tricine SDS-PAGE

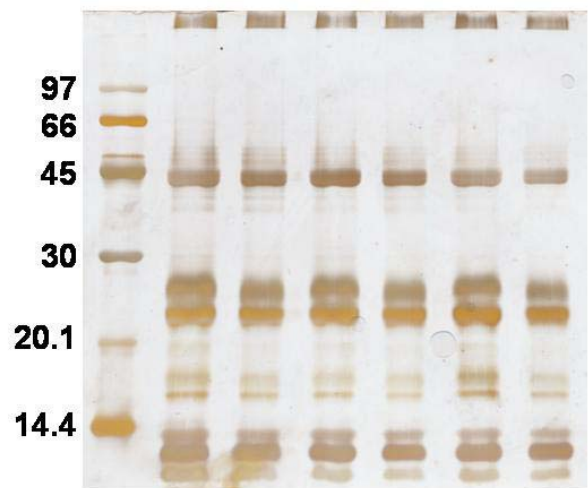
หลังจากนำ crude venom protein มาทำการตรวจสอบแบบแผนโปรตีนบน 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE (รูปที่ 4.5.3) พบว่าสามารถแยกแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ ได้ดี และมีโปรตีนแถบหลัก 2-3 แถบเป็นองค์ประกอบ ซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ neurotoxin, antimicrobial peptide หรืออาจจะเป็นเอนไซม์ phospholipase ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 kDa เหมือนกับที่พบในงู ดังนั้นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเหล่านี้จึงเป็นโปรตีนกลุ่มที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อ พบว่า โปรตีนในน้ำพิษถูกแยกเห็นแถบที่ชัดเจน และมีแบบแผนของโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน โดยพบแถบโปรตีนหลักของน้ำพิษตะขาบ 3 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23, 27 และ 45 kDa

4.5.2.2 การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำพิษด้วยวิธี 2D-PAGE

จากการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำพิษด้วยวิธี 2D-PAGE (รูปที่ 4.5.4) พบ spot จำนวนมาก และเมื่อวิเคราะห์ spot ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D platinum พบ 57 spot (ตารางที่ 4.5.1) และพบว่า โปรตีนส่วนใหญ่แล้วมีขนาดใหญ่กว่า 24 kDa และส่วนใหญ่มีค่า pI อยู่ที่ประมาณ 5-10 จากนั้นทำการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำพิษด้วยวิธี 2D-PAGE ชั่ว (รูปที่ 4.5.5) ตัด spot โปรตีนหลัก 10 spot (SC1- SC10) ส่งวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนบางส่วนด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่สถาบันจีโนม สวทช. และวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของโปรตีน

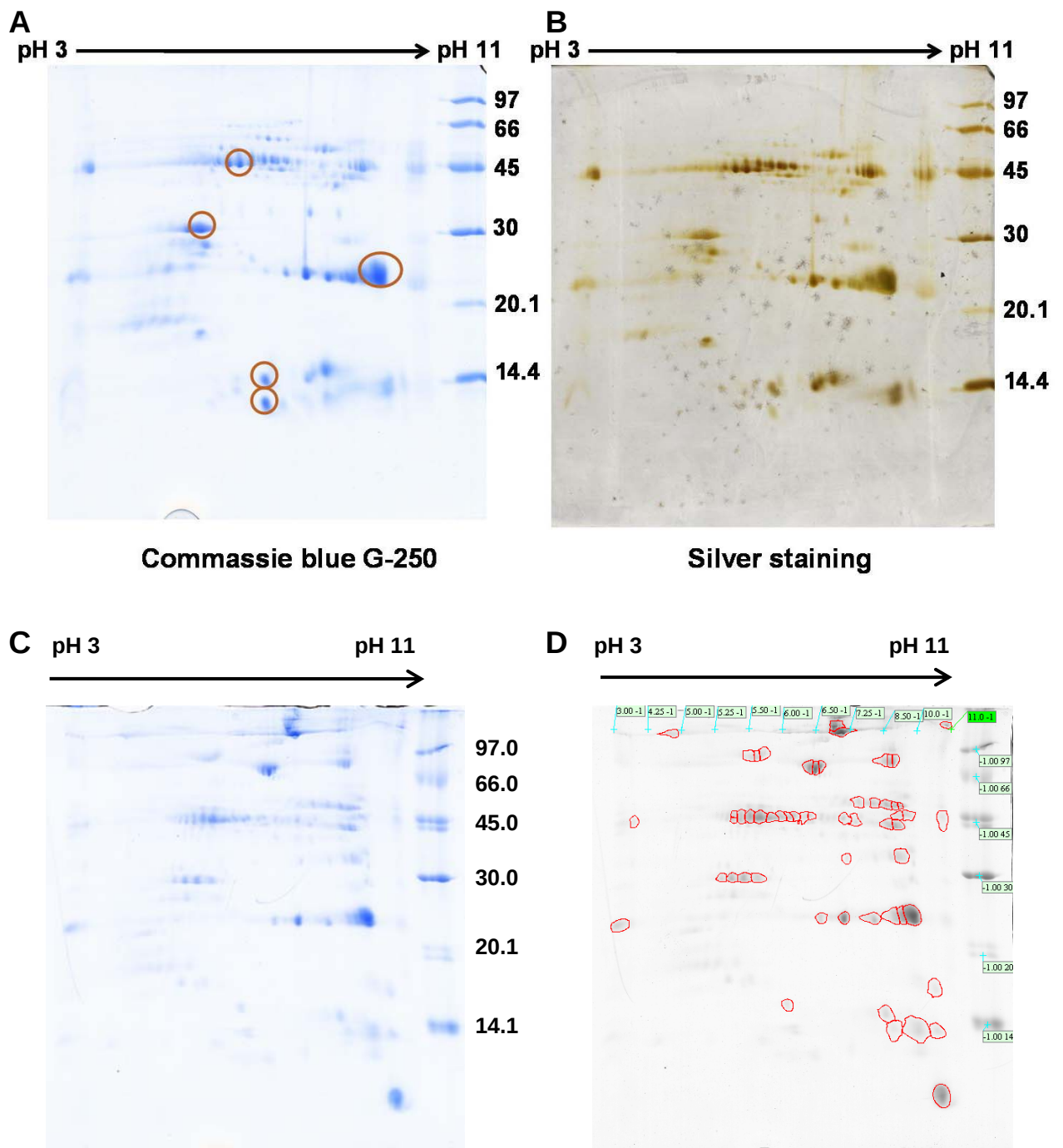


Commassie blue R-250



Silver staining

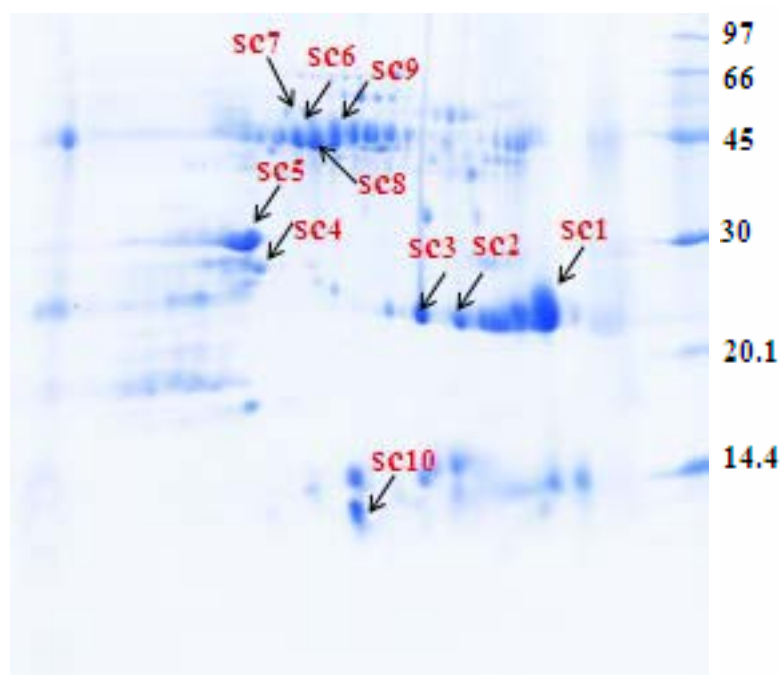
รูปที่ 4.5.3 แบบแผนโปรตีนในน้ำพิษตะขาบที่แยกโดยวิธี Tricine-PAGE โดยใช้ 16.5% acrylamide gel (A) เจลที่ย้อมด้วย coomassie brilliant blue R -250 และ(B) ย้อมด้วย silver M=Marker (kDa)
Lane 1, 2 และ 3 =crude venom protein



รูปที่ 4.5.4 (A-C) แสดงแบบแผนโปรตีนน้ำพืชของตะขาบที่ได้จากการแยกด้วย 2D-PAGE ซึ่งใช้ strip ขนาด 7 cm และรูป D คือรูป C ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D platinum ผลการวิเคราะห์แสดงไว้ในตารางที่ 4.5.1

ตารางที่ 4.5.1 ข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ของโปรตีนต่าง ๆ ในน้ำพิษตะขาบเมื่อวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE และโปรแกรม ImageMaster 2D platinum

Spot no.	Spot ID	MW	pI	Spot no.	Spot ID	MW	pI
1	1940	136	10.8889	30	2025	47	5.81818
2	1943	133	6.90000	31	2026	47	6.11932
3	1950	123	7.06667	32	2030	46	7.10833
4	1955	120	4.79545	33	2031	46	5.38611
5	1970	90	5.71023	34	2032	45	3.75000
6	1972	86	5.51705	35	2033	45	7.47727
7	1973	86	5.61932	36	2038	44	8.72159
8	1974	82	8.45739	37	2039	44	9.11364
9	1975	80	8.78977	38	2052	34	9.23295
10	1976	81	8.99432	39	2054	34	7.18333
11	1977	74	6.40341	40	2062	30	5.46389
12	1978	76	6.61667	41	2064	30	5.37500
13	1979	73	6.49432	42	2065	30	5.63636
14	1995	53	7.59091	43	2066	30	5.30000
15	1996	53	8.14489	44	2082	24	9.84659
16	1998	52	8.63636	45	2083	24	8.99432
17	2000	51	9.01136	46	2084	24	9.35227
18	2001	52	9.25000	47	2086	24	7.12500
19	2007	47	5.44167	48	2087	24	6.60833
20	2008	47	5.51705	49	2091	24	8.15909
21	2009	48	9.55682	50	2095	23	3.15278
22	2010	48	5.38889	51	2118	17	10.5556
23	2012	47	5.99432	52	2120	16	6.07386
24	2013	48	6.18750	53	2122	15	8.61932
25	2016	47	5.65909	54	2126	14	10.0667
26	2017	47	6.33523	55	2127	14	8.97727
27	2018	48	6.42045	56	2129	14	10.6222
28	2019	48	9.19886	57	2141	10	10.7333
29	2021	46	10.7556				



รูปที่ 4.5.5 แบบแผนโปรตีนน้ำพิษของตะขาบที่ได้จากการแยกด้วย 2D-PAGE โดยใช้ strip gel ขนาด 7 cm pH 3-11, nL (16% SDS acrylamide gel) ซึ่งแสดง spot ต่างๆ และตัด spot จำนวน 11 spot ส่องหาลำดับกรดอะมิโนบางส่วนโดยเทคนิค LC-MS/MS (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry) ที่สถาบันจีโนม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช)

4.5.2.3 การระบุชนิดของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI

หลังจากตัด spot ส่งไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่สถาบันจีโนม พบว่าไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ ดังนั้นจึงนำ De novo sequence ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล (รูปที่ 4.5.6 ถึง 4.5.14 และตารางที่ 4.5.2 ถึง 4.5.10) โดยผลจากการระบุชนิดของโปรตีนโดย BLAST ในฐานข้อมูล NCBI สรุปได้ดังนี้

spot SC1 และ SC2 พบว่าเป็น Venom allergen protein

spot SC4, SC5 และ SC9 คือ Serine protease

spot SC6 และ SC8 คือ เอนไซม์ trypsin

spot SC10 คือ Hyaluronidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ catalyze กรดไฮยาลูโรนิกในร่างกาย ซึ่งจะเพิ่มความสามารถในการเลือกผ่านของสาร เรียกได้ว่าเป็น *spreading factor*

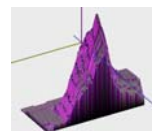
spot SC3 และ SC7 ไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้

Spot SC1

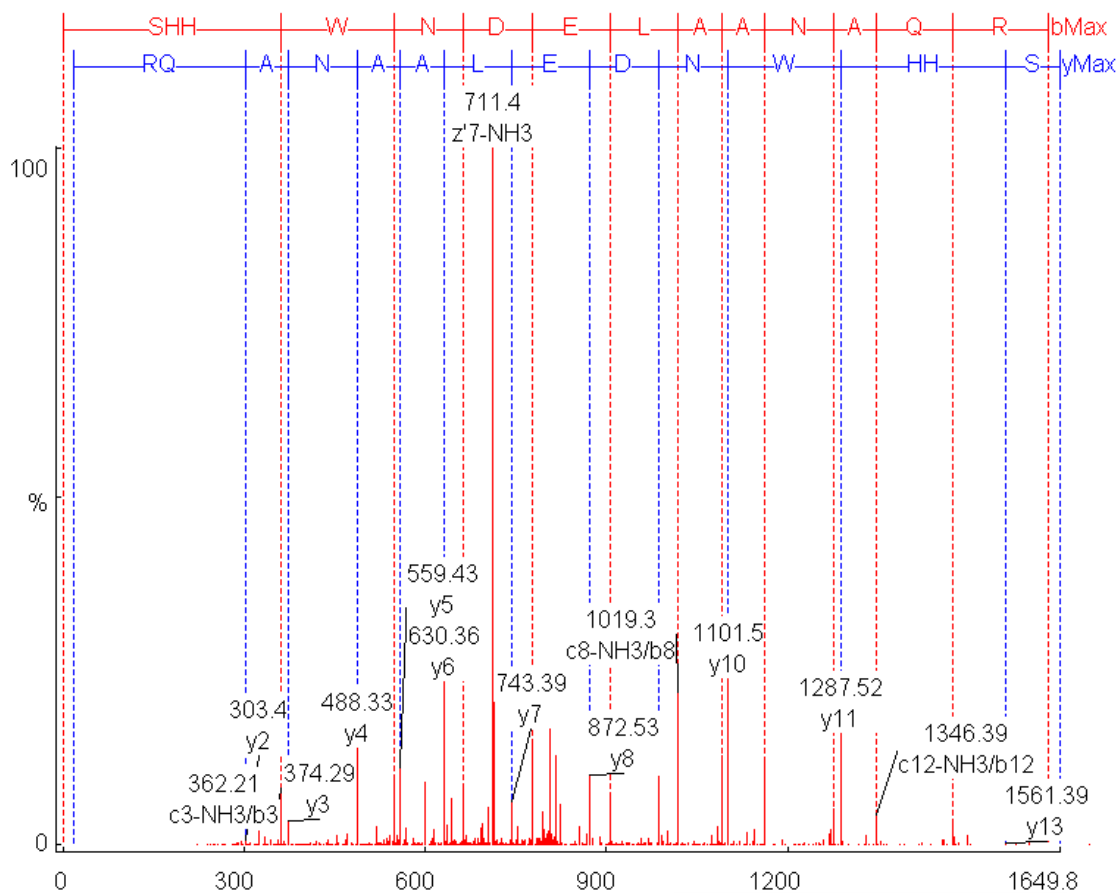
- MW 23

- pI 9.5

- 3D view จาก 2D-PAGE



- De novo sequence



- Peptide sequence SHHWNDELAANAQR

- M/Z 825.51

- Score 37.3 %

- Protein blast Venom allergen

Position Confidence Table

Tag	Confidence
SHHWNDELAANA	99.3%
Q	0%
R	93.6%

รูปที่ 4.5.6 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC1 ด้วย LC-MS/MS

ตารางที่ 4.5.2 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จากการวิเคราะห์ spot SC1 ด้วย LC-MS/MS

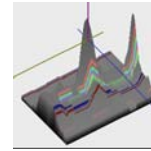
Organism	Protein name	Score (%)
<i>Schistosoma mansoni</i>	venom allergen-like (VAL) 23 protein	32
<i>Pachycondyla chinensis</i>	Pac c 3 allergen	29.1
<i>Ixodes scapularis</i>	5/SCP domain-containing protein	28.2
<i>Nasonia vitripennis</i>	antigen 5-like protein 1	27.8
<i>Lycosa singoriensis</i>	Venom allergen	26.9
<i>Aedes aegypti</i>	allergen	26.9

Spot SC2

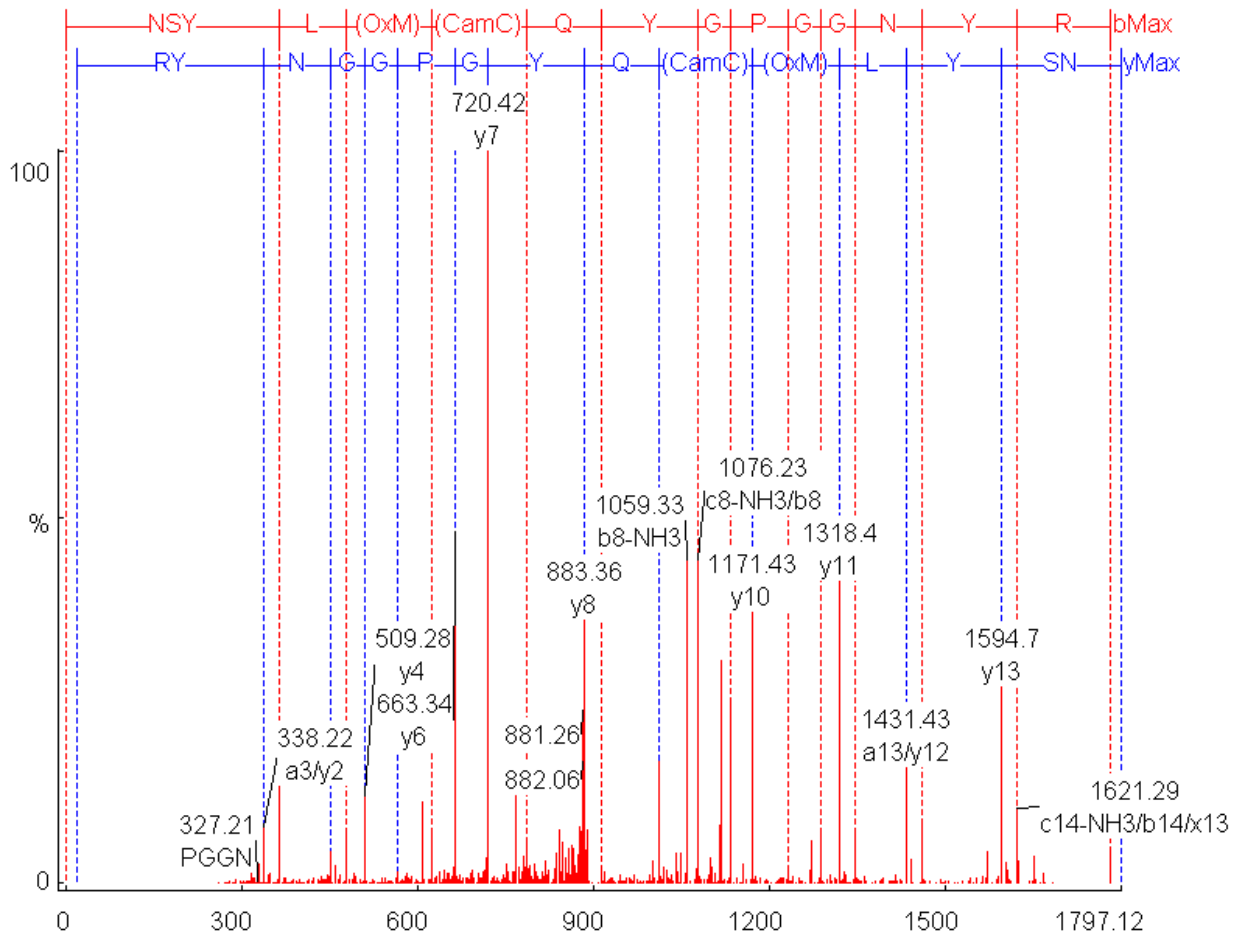
- MW 22

- pI 7.9

- 3D view จาก 2D-PAGE



- De novo sequence



- Peptide sequence NSYLMCQYGPGGNYR

- M/Z 899.15

- Score 81.7 %

- Protein blast Venom allergen

Position Confidence Table

Tag	Confidence
NSYL	99.5%
(OxM)	96.1%
(CamC)	100%
Q	94.3%
YG	100%
PG	90.9%
GNYR	99.7%

รูปที่ 4.5.7 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC2 ด้วย LC-MS/MS

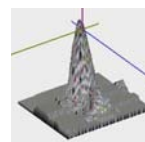
ตารางที่ 4.5.3 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จากการวิเคราะห์ spot SC2 ด้วย LC-MS/MS

Organism	Protein name	Score (%)
<i>Mesocestoides vogae</i>	cysteine-rich secreted protein 2 precursor	38.0
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	secreted-protein 1 precursor	33.7
<i>Polistes exclamans</i>	allergen Pol e 5 precursor	33.3
<i>Polybia scutellaris</i>	venom allergen 5	32.5
<i>Dolichovespula maculata</i>	antigen 5 precursor	32.5
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Venom-Allergen-like Protein family member (vap-1)	30.8
<i>Schistosoma mansoni</i>	venom allergen-like (VAL) 28 protein	29.1
<i>Rhynchium brunneum</i>	venom antigen 5	29.1
<i>Vespula maculifrons</i>	venom allergen 5	29.1
<i>Nasonia vitripennis</i>	antigen 5-like protein 1	28.2

Spot SC3

- MW 22
- pI 7.1

- 3D view จาก 2D-PAGE



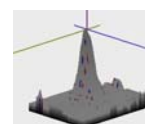
ตารางที่ 4.5.4 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC3 ด้วย LC-MS/MS

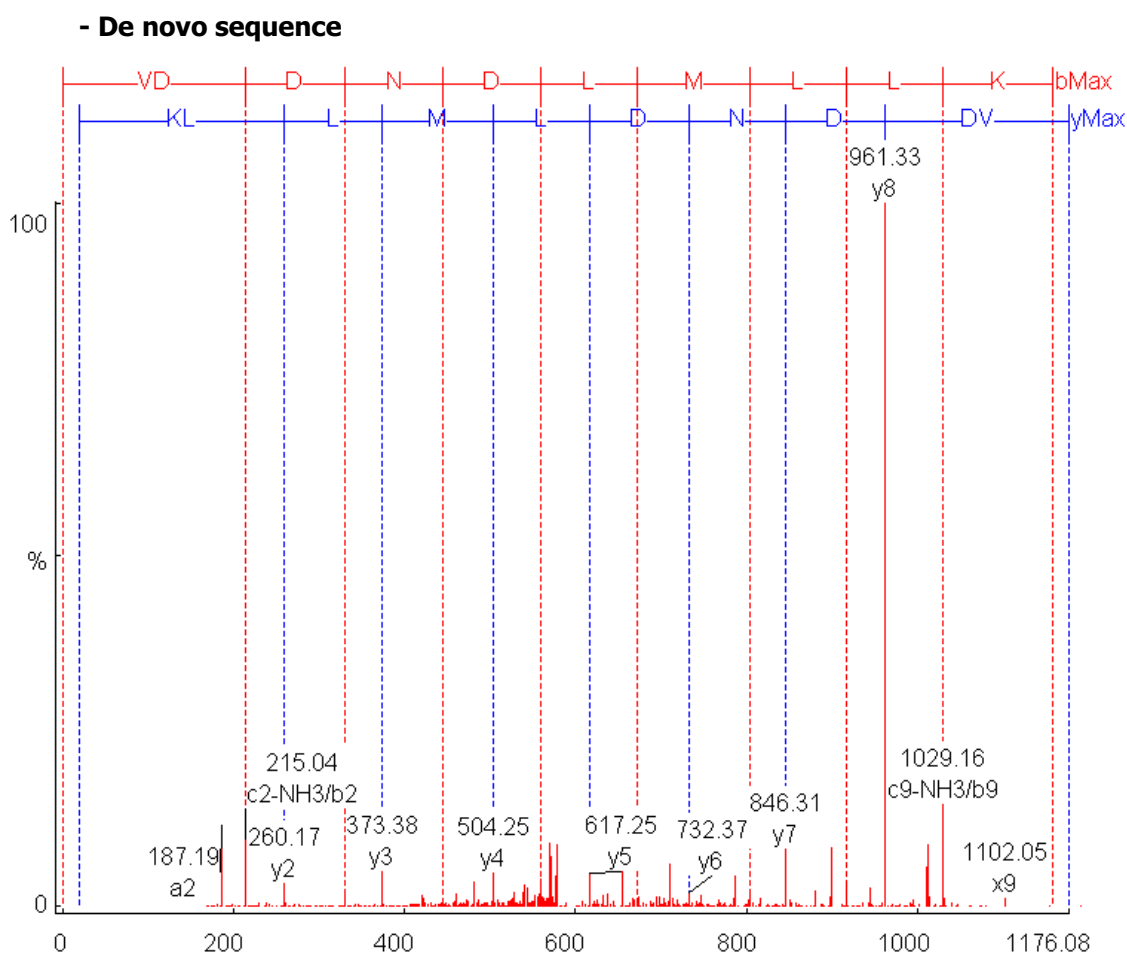
Fragment no.	Peptide sequence	M/Z	Score (%)	Protein blast
1	MPTVVEGSLVVGLK	482.69	50.9	-
2	MPDELLEK	495.37	20.7	-
3	CGELDASLAPR	594.4	45.2	-
4	HRGALAGTTVGR	599.65	100	-
5	APSTYGQVSVSDK	670.15	50.2	-
6	ESAENE(OxM)VVNTR	699.17	44.1	-
7	MKLTNTANYDYR	746.14	52.1	-
8	SSTGGVDTANYDYR	753.51	18.4	-
9	YPGGKNLAGMSSSGDQK	849.04	12.3	-

Spot SC4

- MW 26
- pI 5.4

- 3D view จาก 2D-PAGE





- Peptide sequence VDDNDLMLLK
- M/Z 588.59
- Score 62.3%
- Protein blast Kallikein, Serine protease

Position Confidence Table	
Tag	Confidence
VD	62.4%
DNDLMLLK	100%

รูปที่ 4.5.8 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC4 ด้วย LC-MS/MS

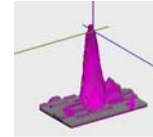
ตารางที่ 4.5.5 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จากการวิเคราะห์ spot SC4 ด้วย LC-MS/MS

Organism	Protein name	Score (%)
<i>Mus musculus</i>	kallikrein 14	29.9
<i>Rattus norvegicus</i>	kallikrein 14	29.9
<i>Bos taurus</i>	Kallikrein-related peptidase 14	27.8
<i>Canis lupus familiaris</i>	kallikrein-related peptidase 10	27.4
<i>Equus caballus</i>	kallikrein-related peptidase 10	27.4
<i>Homo sapiens</i>	kallikrein 10	27.4
<i>Pan troglodytes</i>	kallikrein 10	27.4
<i>Macaca mulatta</i>	kallikrein 10	27.4
<i>Apis mellifera</i>	CG2658-PA	27.4
<i>Aedes aegypti</i>	serine protease inhibitors, serpins	26.9
<i>Gadus morhua</i>	putative granzyme	26.9
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	trypsin-like serine protease	26.5
<i>Danio rerio</i>	novel protein containing trypsin domains	26.5

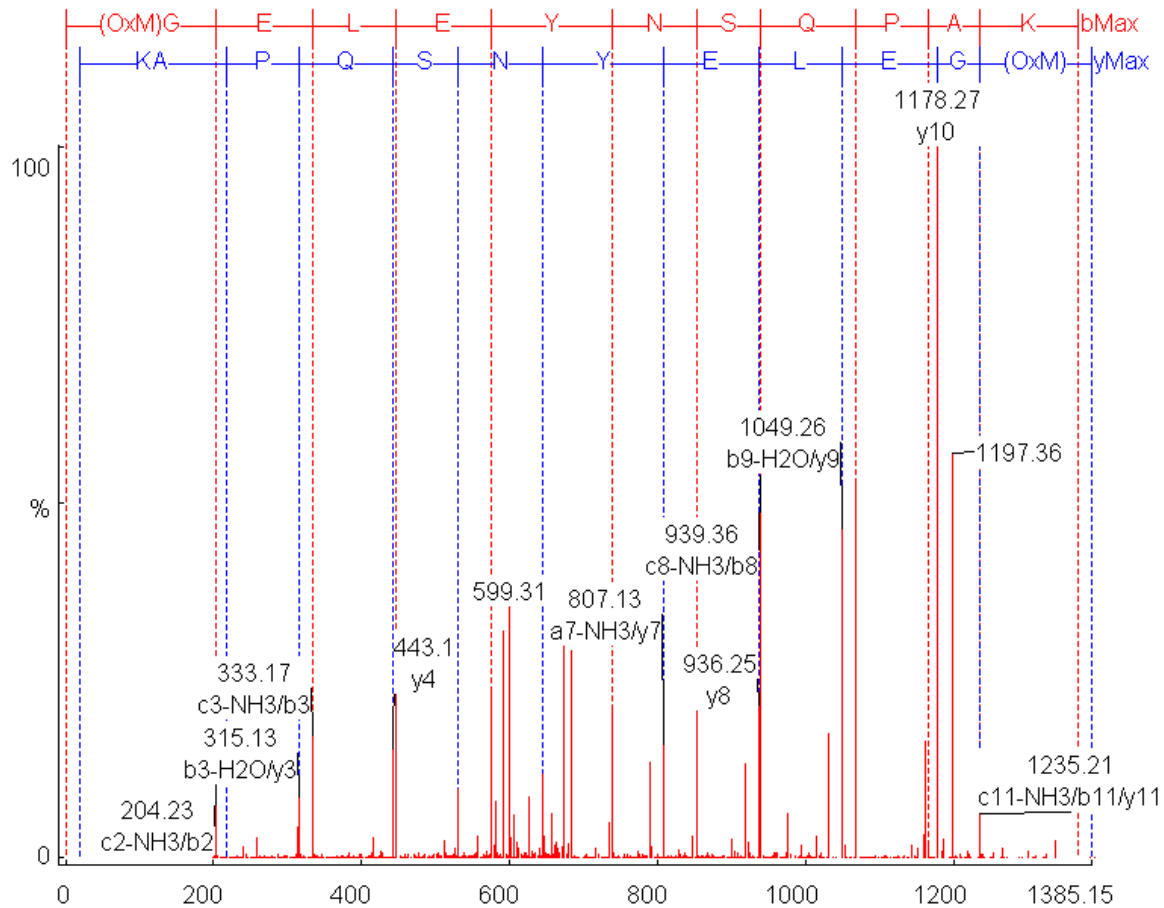
Spot SC5

- MW 28
- pI 5.3

- 3D view จาก 2D-PAGE



- De novo sequence of Peptide fragment no.1

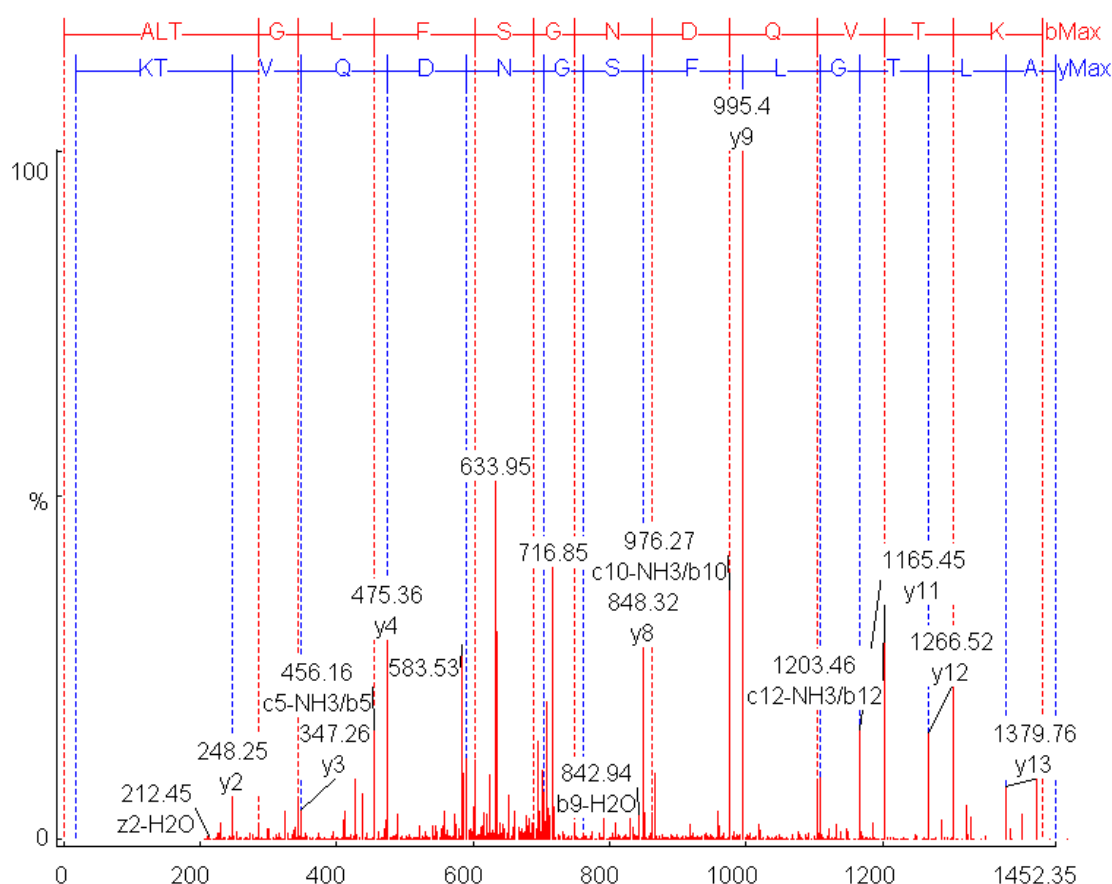


- **Peptide sequence** MGELEYNSQPAK
- **M/Z** 693.07
- **Score** 34.2%
- **Protein blast** Cystein peptidase, Subtilisin-like serine protease

Position Confidence Table	
Tag	Confidence
(OxM)	74.5%
GELEYNS	100%
Q	61.9%
PA	73.9%
K	100%

รูปที่ 4.5.9 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC5 (fragment ที่ 1) ด้วย LC-MS/MS

- De novo sequence of Peptide fragment no.2



- **Peptide sequence** ALTGLFSGNDQVTK
 - **M/Z** 726.70
 - **Score** 22.1%
 - **Protein blast** Putative serine protease

Position Confidence Table

Tag	Confidence
ALTGL	100%
F	83.6%
SG	77.3%
ND	100%
Q	0%
VTK	100%

รูปที่ 4.5.10 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC5 (fragment ที่ 2) ด้วย LC-MS/MS

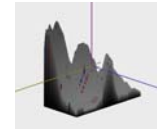
ตารางที่ 4.5.6 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จากการวิเคราะห์ spot SC5 (fragment ที่ 2) ด้วย LC-MS/MS

Organism	Protein name	Score (%)
<i>Leishmania brasiliensis</i>	Cystein peptidase	26.5
<i>Spirosoma linguale</i>	Subtilisin-like serine protease	25.2
<i>Human astrovirus</i>	Serine protease	25.7

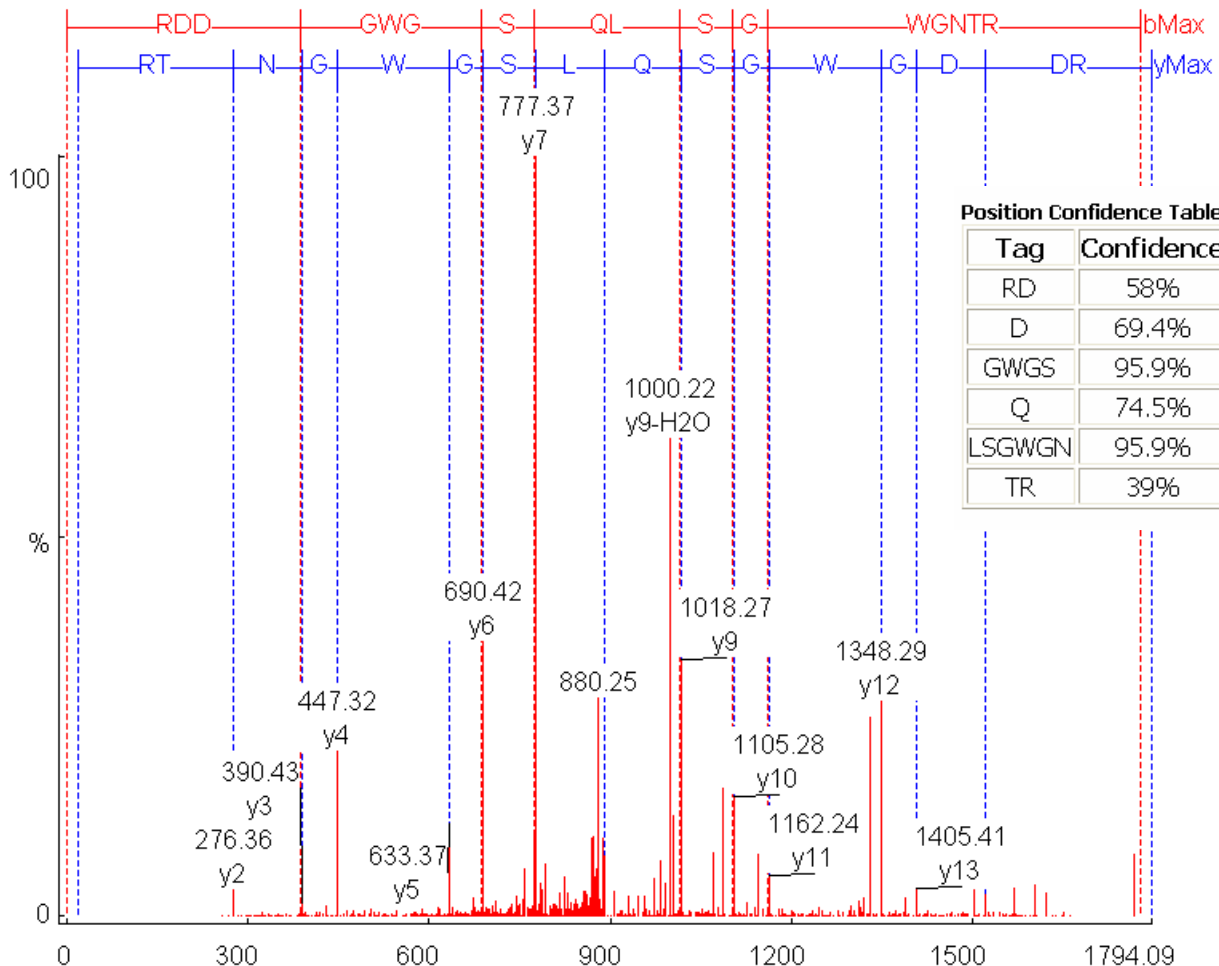
Spot SC6

- MW 44
- pI 5.5

- 3D view จาก 2D-PAGE



- De novo sequence



- Peptide sequence RDDGWGSQLSGWGNTDR
- M/Z 897.71
- Score 23.6%
- Protein blast Spinesin, Trypsin, Serine protease

รูปที่ 4.5.11 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC6 ด้วย LC-MS/MS

ตารางที่ 4.5.7 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จากการวิเคราะห์ spot SC6 ด้วย LC-MS/MS

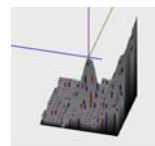
Organism	Protein name	Score (%)
<i>Mus musculus</i>	transmembrane protease, serine 5 (spinesin)	27.8
<i>Streptosporangium roseum</i>	Trypsin-like protein serine protease	26.9
<i>Aedes aegypti</i>	Trypsin	26.1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Trypsin 1	25.7
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	putative trypsin	25.7
<i>Nasonia vitripennis</i>	Serine protease	25.7

Spot SC 7

- MW 47

- pI 5.5

- 3D view จาก 2D-PAGE



ตารางที่ 4.5.8 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จากการวิเคราะห์ spot SC7 ด้วย LC-MS/MS

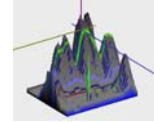
Fragment no.	Peptide sequeunce	M/Z	Score (%)	Protein blast
1	DVMLDASLAPR	593.05	54.6	-
2	TALNNPETGAAVVVRK	821.84	7.3	-
3	TAQYNGSAVALNYRK	829.49	16.9	-
4	MLMQACEDEVYR	838.77	39.8	-
5	FKTGANGDLNLTAEK	846.74	96.6	-
6	YTEQENGELVDLLKYK	971.24	99.8	-
7	YRELMQAGDECAQMLK	988.1	12.6	-
8	FSKVGTYDYVELYTRVVK	1091.16	13.2	-

Spot SC 8

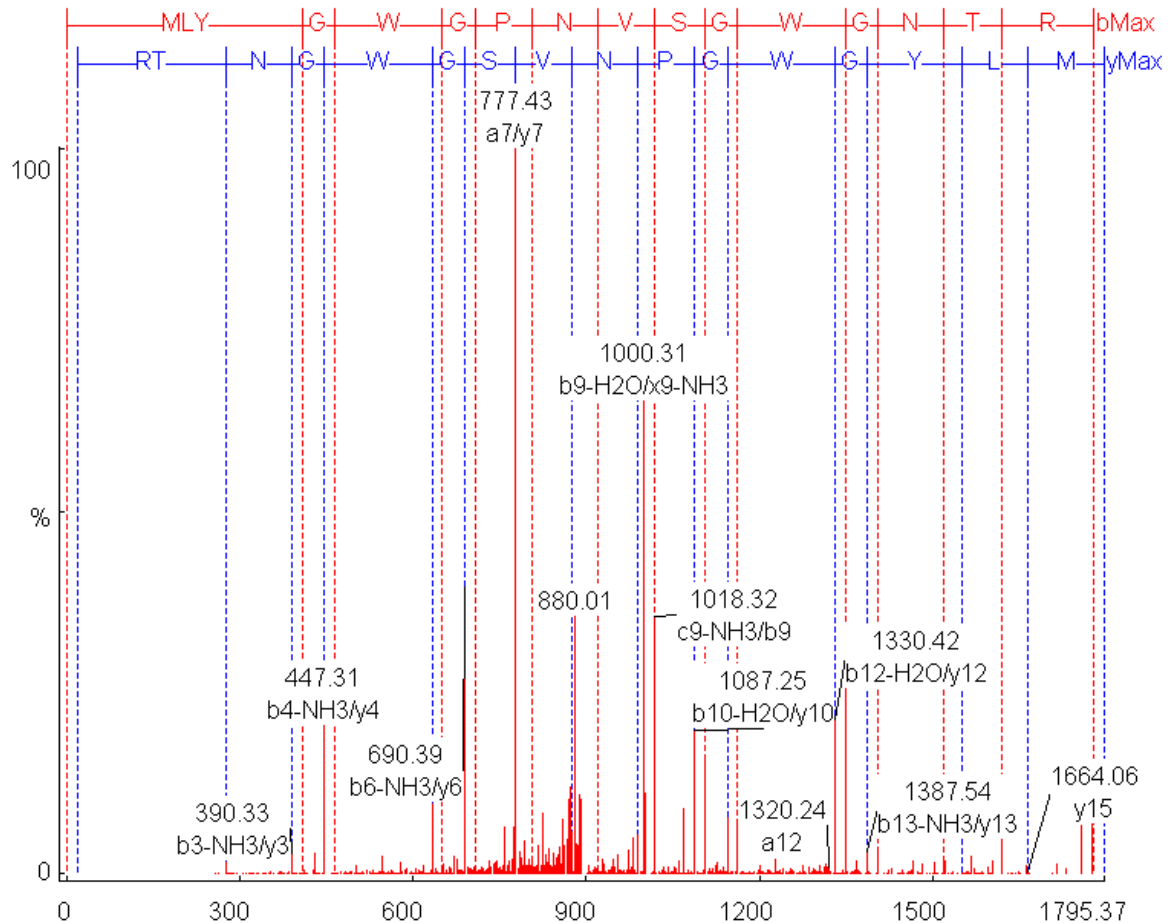
- MW 43

- pI 5.7

- 3D view จาก 2D-PAGE



- De novo sequence



- Peptide sequence MLYGWGPNVSGWGNTR

- M/Z 898.27

- Score 19.4%

- Protein blast Trypsin

Position Confidence Table

Tag	Confidence
M	83.4%
LY	21.2%
G	82.5%
WGPNVSGWGN	98.1%
TR	90.3%

รูปที่ 4.5.12 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC8 ด้วย LC-MS/MS

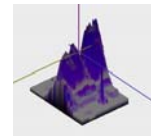
ตารางที่ 4.5.8 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จากการวิเคราะห์ spot SC8 ด้วย LC-MS/MS

Organism	Protein name	Score (%)
<i>Aedes aegypti</i>	Trypsin	29.1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Trypsin 2	26.5

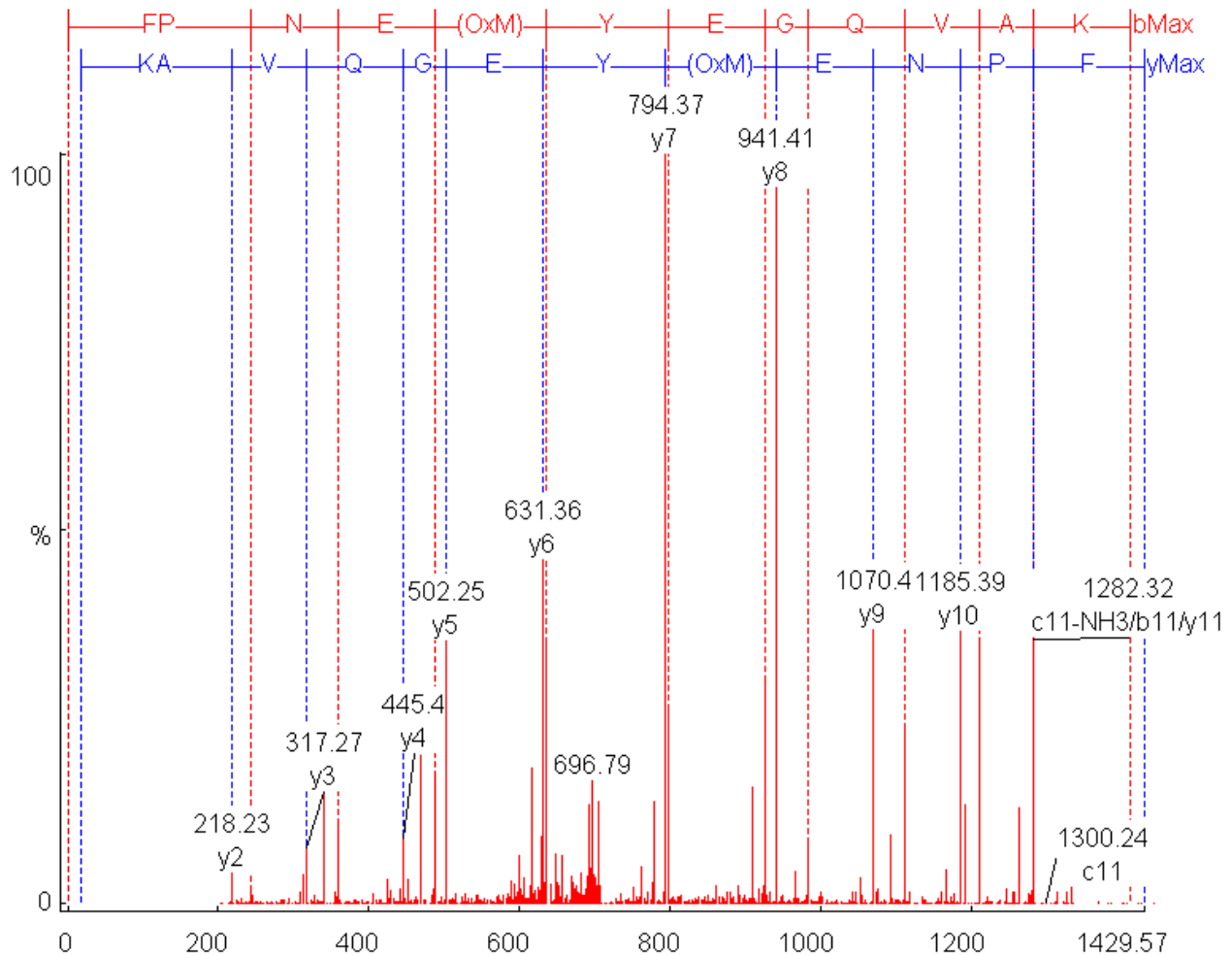
Spot SC9

- MW 43
- pI 5.9

- 3D view จาก 2D-PAGE



- De novo sequence



- Peptide sequence FPNEMYEGQVAK
- M/Z 715.13
- Score 13.9%
- Protein blast Serine protease snake

Position Confidence Table

Tag	Confidence
F	66.2%
PNE	99.4%
(OxM)	0%
YEG	100%
Q	0%
VAK	100%

รูปที่ 4.5.13 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC9 ด้วย LC-MS/MS

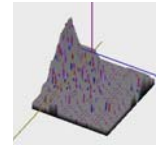
ตารางที่ 4.5.9 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จากการวิเคราะห์ spot SC9 ด้วย LC-MS/MS

Organism	Protein name	Score (%)
<i>Aedes aegypti</i>	Serine protease snake	26.5

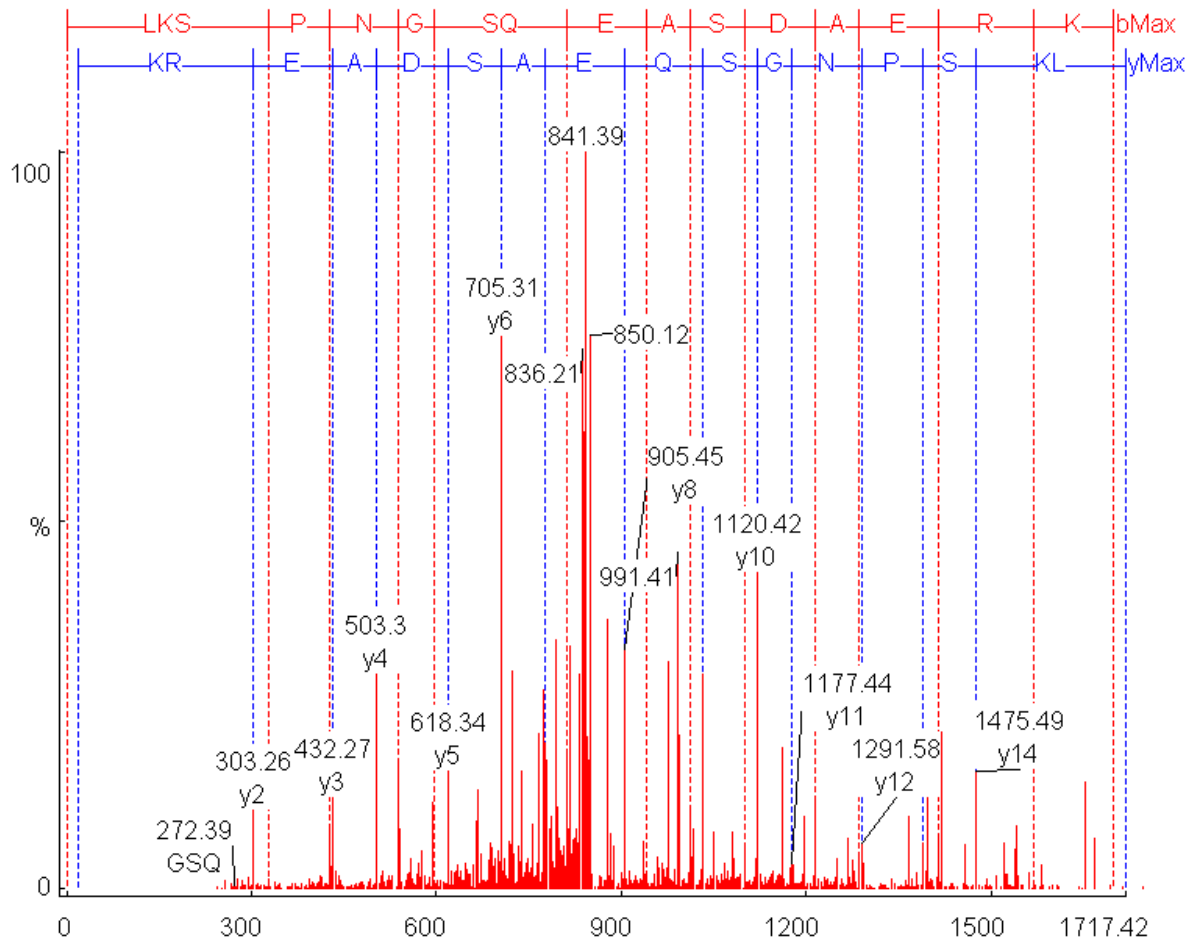
Spot SC10

- MW 13
- pI 6.3

- 3D view จาก 2D-PAGE



- De novo sequence



- Peptide sequence LKSPNGSQEASDAERK
- M/Z 859.19
- Score 17.0 %
- Protein blast putative hyaluronidase

Position Confidence Table

Tag	Confidence
L	50.9%
K	26.7%
SPNGS	99.4%
Q	91.1%
EA	73.7%
SDAE	100%
RK	83%

รูปที่ 4.5.14 ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของ spot SC10 ด้วย LC-MS/MS

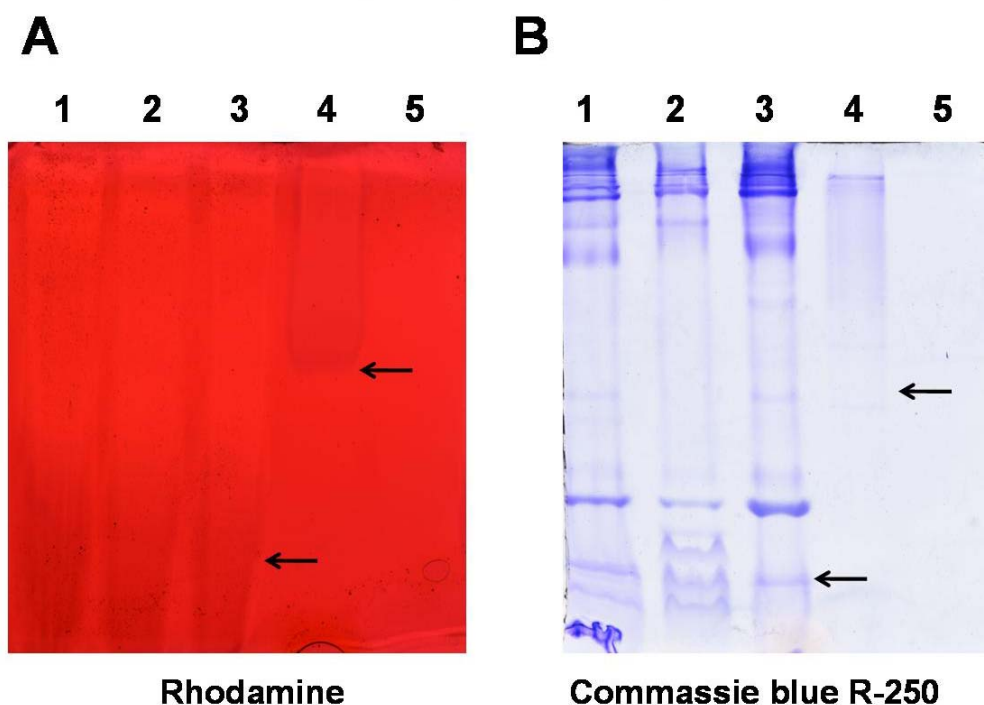
ตารางที่ 4.5.10 ชนิดของโปรตีนที่ระบุได้จากการวิเคราะห์ spot SC10 ด้วย LC-MS/MS

Organism	Protein name	Score (%)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Hyaluronidase	26.1

4.5.3 การหาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนไซม์ Phospholipase ในน้ำพิษตะขาบ

4.5.3.1 การตรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของ phospholipase ในน้ำพิษตะขาบ

แม้ว่าจะตรวจไม่พบเอนไซม์ phospholipase จากการทำรูปแบบโปรตีนโอมิกส์ แต่โดยองค์ความรู้พื้นฐานของน้ำพิษสัตว์นั้น phospholipase เป็นองค์ประกอบหลักอย่างหนึ่ง ดังนั้น ในครั้งนี้ จึงได้ลองตรวจ phospholipase activity ในน้ำพิษตะขาบด้วยวิธี zymography (รูปที่ 4.5.15) พบว่าในน้ำพิษตะขาบนั้นมีฤทธิ์ของเอนไซม์ phospholipase อยู่ สังเกตได้จาก clear band ภายหลังก้อมด้วย Rhodamine G6 เมื่อเปรียบเทียบกับ phospholipase activity ในน้ำพิษต่อหลุม พบว่ามีแบบแผนของ activity แตกต่างกัน จึงคาดว่าเอนไซม์ในสัตว์สองชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน

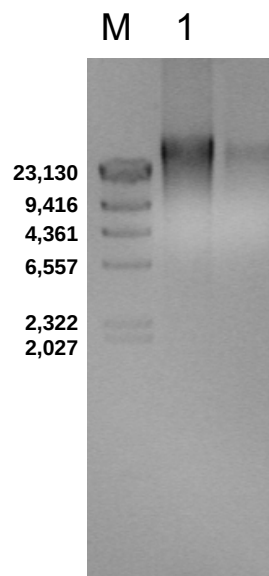


รูปที่ 4.5.15 ผลจากการทดสอบ phospholipase activity ด้วยวิธี Zymographic detection (A) ย้อมด้วย Rhodamine 6G และ (B) coomassie brilliant blue R -250, lane 1, 2 และ 3 คือ น้ำพิษของตะขาบ, lane 4 คือ น้ำพิษของต่อหลุม , lane 5 คือ negative control

4.5.3.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phospholipase

เริ่มจากการสกัด genomic DNA จากเนื้อเยื่อของตะขาบด้วยวิธี phenol-chloroform (รูปที่ 4.5.16) พบว่า genomic DNA มีขนาดประมาณ 23 kbp จึงได้นำไปใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ phospholipase A2 ของตะขาบ และสัตว์อื่นในกลุ่มสัตว์พิษ (ตารางที่ 4.5.11) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาวิเคราะห์หาตำแหน่ง conserve และ/หรือ consensus sequence โดยการ alignment ด้วยโปรแกรม

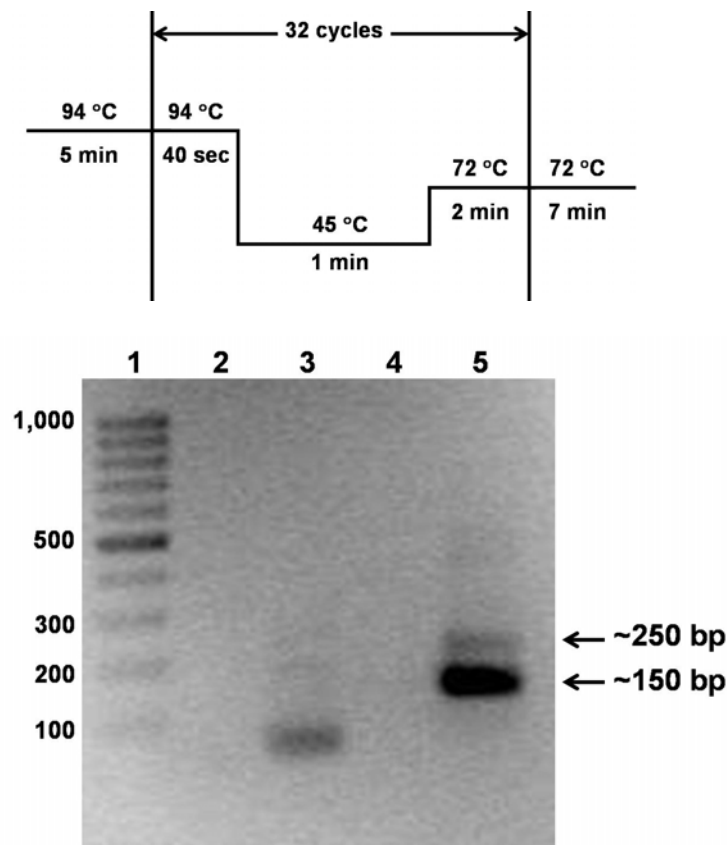
clustalW แล้วออกแบบ primer ด้วยโปรแกรม oligo explorer, oligo analyzer และ FAST PCR จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติ primer โดยใช้โปรแกรม primer 3 ผลของการทำ PCR (รูปที่ 4.5.17) พบว่า ได้ PCR product ขนาด 150 และ 250 bp จึงนำ PCR product ที่ได้ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



รูปที่ 4.5.16 แสดงแถบ genomic DNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตะขาบ (*Scolopendra subspinipes dehaani*) ในครั้งที่ 1 และ 2 ขนาด 23 kbp บน 0.8 % agarose gel (M = Marker, Lane 1 ดีเอ็นเอที่สกัดได้)

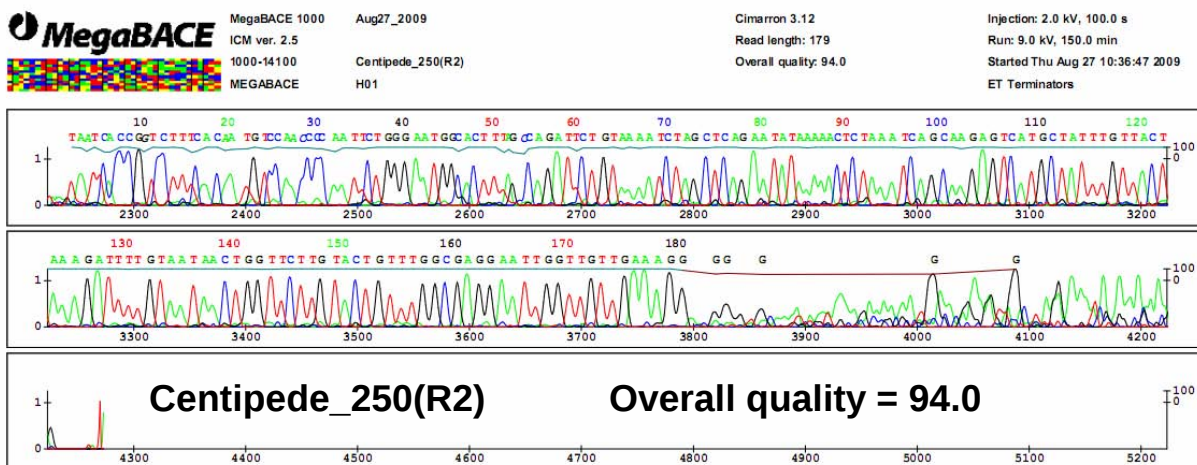
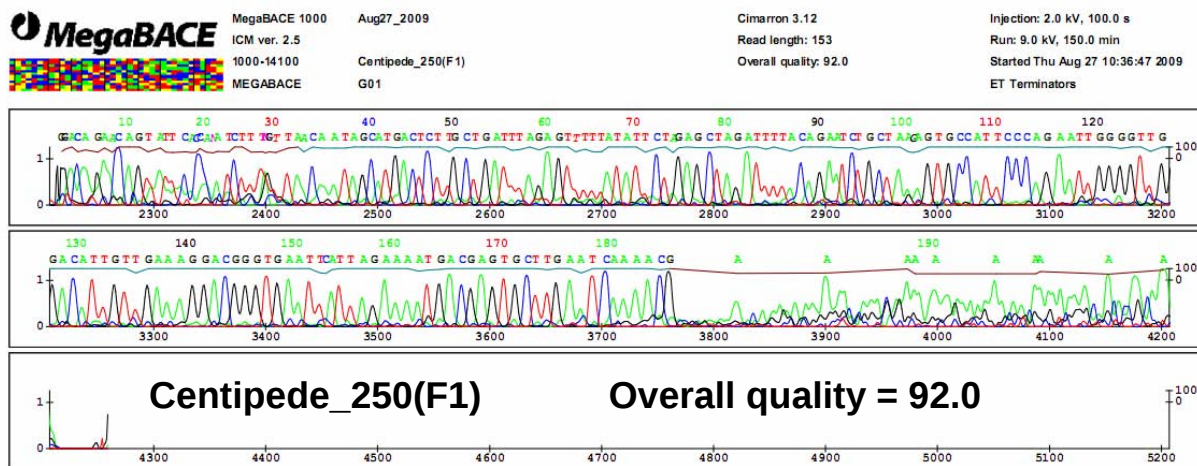
ตารางที่ 4.5.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ออกแบบได้ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phospholipase A2 ของตะขาบสายพันธุ์ *S. viridis* และสัตว์อื่นในกลุ่มสัตว์พิษ

Name	Sequeunce (5'-->3')	Position	Primer length	Tm(0C)	%GC
ScF1	5'- TTC AAC AAC CAA TTC CTC GC -3'	51-70	20	58.4	45.0
ScR1	5'- CTT CAT GAT AAC ACC TGT CGT G-3'	220-241	22	60.8	45.5
ScR2	5'- CGT TTT GAT TCA AGC ACT CG-3'	384-403	20	58.4	45.0



รูปที่ 4.5.17 แสดง PCR product บน 1.5 % agarose gel ภายหลังการเพิ่มปริมาณยีน phospholipase ในน้ำพิษตะขาบ ด้วยเทคนิค PCR โดยที่ Lane 1 = Marker 1 kb; Lane 2 ใช้ไพรเมอร์คู่ ScF1/R1; Lane 3 เป็น reamplify ของ lane 2; Lane 4 ใช้ไพรเมอร์คู่ ScF1/R2; Lane 5 เป็น reamplify ของ lane 4

หลังจากนำ PCR product ไปส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส (รูปที่ 4.5.18) หลังจากได้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอแล้ว จะนำข้อมูลทั้งสองด้าน (forward และ reward) มาวิเคราะห์ และรวมข้อมูลทั้งสองด้านเข้าด้วยกัน ด้วยโปรแกรม BioEdit และ CLUSTALW ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 212 อันดับ (รูปที่ 4.5.19) แต่อย่างไรก็ตาม หลังจากนำเอาข้อมูลลำดับเบสที่ได้ไป align กับยีน phospholipase A2 ของ *S. viridis* ที่ใช้เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์ พบว่า ลำดับเบสที่ได้มีความเหมือนกับยีน phospholipase A2 เพียง 13% (รูปที่ 4.5.20) ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ น่าจะยังไม่ใช่ของยีน phospholipase A2



รูปที่ 4.5.18 แสดงโครมาโทแกรมของ PCR product ขนาด 250 bp (รูปบน) ลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้จาก forward primer (F) ซึ่งความยาวของเบสที่เครื่องอ่านได้ (ใต้เส้นสีฟ้า) 153 bp โดยคุณภาพของเบสที่อ่านได้ 92% (รูปล่าง) ลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้จาก reward primer (R2) ซึ่งความยาวของเบสที่เครื่องอ่านได้ (ใต้เส้นสีฟ้า) 179 bp โดยคุณภาพของเบสที่อ่านได้ 94% (หมายเหตุ คุณภาพของเบสที่ยอมรับได้คือ 90% ขึ้นไป ดังนั้น จึงสามารถนำโครมาโทแกรมที่ได้ของ PCR product ขนาด 250bp ไปวิเคราะห์ต่อได้)

TTCAACAACCAATTTCCTGCCAAACAGTACAAGAACCAGTTATTACAAAATC
 TTTAGTAACAATAGCATGACTCTTGCTGATTTAGAGTTTTTATATTCTAGAG
 CTAGATTTTACAGAATCTGCTAAGAGTGCCATTCCCAGAATTGGGGTTGGAC
 ATTGTTGAAAGGACGGGTGAATTCATTAGAAAATGACGAGTGCTTGAATCAA
 AACG

รูปที่ 4.5.19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จากการทำ DNA sequencing

```

PLA2      GGAAAAAGAGCGCCTTGGAATATGATGGTTATGGAAATCATTGCGGAATTGGAGGCAAG 180
F      -----

PLA2      GGTTCCACCGGTTGACAGTATTGACAGATGTTGTCAAGTTCACGACAGGTGTTATCATGAA 240
F      -----GGACAGAACAGTATTCACCAATC 24
              *  **  ****  *  **

PLA2      GTAAATGAAAACGAATGTGGAAGTTACAAAAGAAATGTGAAATTCATCGATTATGATTGG 300
F      TTTNGTTAACAATAGCATGACTCTTGCTGATTTAGAGTT---TTTATATTCTAGAGCTAG 81
              *  *  **  *  *  **  **  *  *  **  **  **  **  *  *

PLA2      TATATGCAAGACAAAC--AGATCGTTTGTGACACAACAGATACTGTTTGT-GCACAAGCA 357
F      ATTTTACAGAATCTGCTAAGAGTGCCATTCCCAGAATTGGGGTTGGACATTGTTGAAAGG 141
              *  *  **  *  *  ***  *  *  ****  *  **  *  *  **

PLA2      ATATGCAAATGCGACAAGGACATCGTCGAGTGCTTGAATCAAAACGATAAGGATTATAAT 417
F      ACGGGTGAATTCATTA--GAAAATGACGAGTGCTTGAATCAAAACGAAAAAAAAA---- 195
              *  *  ***  *  *  ***  *  *  ****  *  ****  **  *  *
                                  Primer R2

PLA2      CCTAAATACAATAAAGCTATCGGATAACTTTGATCTGTTATTATATGCAATACAGGAAAT 477
F      -----

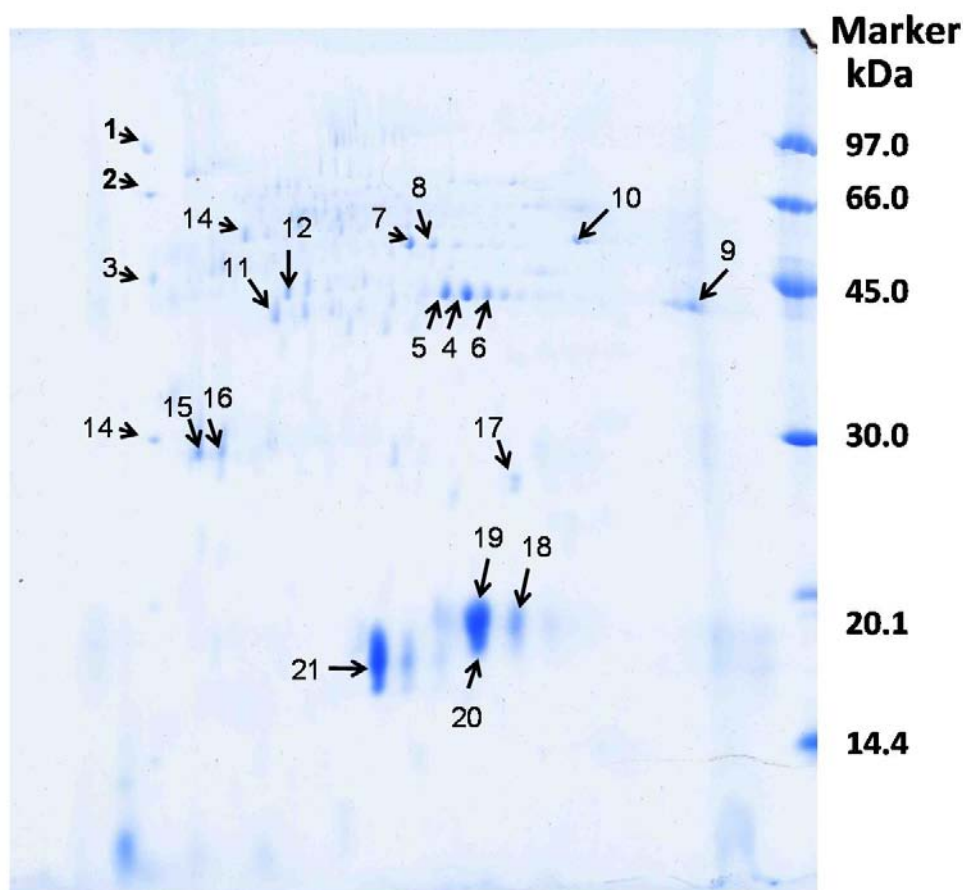
```

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 PLA2	660	2 F	195	13

รูปที่ 4.5.20 ผลการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้จากการทำ PCR (ยีน F) และ phospholipase A2 ของ *S. viridis* (PLA2)

ตอนที่ 4.6 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษผึ้งมัม (*Apis florea*)

ผึ้งมัม (*Apis florea*) เป็นผึ้งขนาดเล็ก น้ำพิษมีฤทธิ์ไม่รุนแรง แต่ก็ยังไม่มีรายงานใด ๆ เกี่ยวกับองค์ประกอบของโปรตีนในน้ำพิษของผึ้งมัม ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้นำน้ำพิษมาวิเคราะห์ด้วย 2D-PAGE (รูปที่ 4.6.1) แล้ววิเคราะห์ spot ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D platinum (ตารางที่ 4.6.1) พบว่า โปรตีนส่วนใหญ่มีขนาดตั้งแต่ 14 ถึง 97 กิโลดาลตัน และมีค่า pI อยู่ที่ 4 ถึง 8 ซึ่งจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพื่อระบุชนิดของโปรตีนต่อไป



รูปที่ 4.6.1 ผลการวิเคราะห์พิษผึ้งมัมด้วย 2D-PAGE

ตารางที่ 4.6.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำพิษผึ้งมัมด้วย 2D-PAGE

Spot ID	%Vol	MW	pI	Intensity	%Intensity	Saliency
1	0.472186	93	4.21449	28.9298	0.941183	15.8367
2	0.318202	69	4.26786	33.7034	1.09648	13.2144
3	0.352459	45	4.30804	21.4228	0.696954	9.86129
4	2.26347	43	6.56541	86.2078	3.36681	49.3107
5	1.73539	44	6.37195	69.1153	2.69927	37.319
6	0.932462	43	6.80087	40.6963	1.58938	21.1996
7	1.04992	54	6.08841	66.6264	2.60206	35.3739
8	0.436104	53	6.27134	33.7977	1.31995	17.2564
9	1.77748	42	10.7012	47.0489	1.83747	16.013
10	0.524152	54	8.23214	45.3587	1.77146	25.0074
11	1.05174	41	5.27134	37.0641	1.44752	13.5987
12	1.07533	44	5.3186	40.3642	1.5764	12.6862
13	0.597977	55	5.14103	30.2643	1.18196	8.806
14	0.401115	30	4.32143	32.7931	1.28072	16.1935
15	2.17664	29	4.84821	48.1894	1.88201	13.6823
16	1.29186	29	5.04167	35.9345	1.40341	8.20577
17	0.494336	27	7.11483	22.6781	0.885684	8.50103
18	5.43225	19	7.12355	53.5831	2.09266	9.2494
19	10.0902	19	6.73547	119.287	4.6587	15.1089
20	3.73993	18	6.69186	98.1653	3.8338	8.74508
21	19.968	17	5.83807	119.309	4.65957	27.1449

บทที่ 5 สรุปและบทวิจารณ์

งานวิจัยเรื่องนี้ เป็นการศึกษำโปรตีนในน้ำพิษของสัตว์พิษ ด้วยแนวคิดที่ว่าน้ำพิษเป็นของเหลวอย่างหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งสร้างขึ้น และเป็นพิษอย่างรุนแรงต่อสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะต่อมนุษย์ จึงคาดหวังว่าจะได้องค์ประกอบหลักของน้ำพิษ ได้โปรตีนใหม่ ๆ หรือได้โปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ดีกว่า สูงกว่า หรือคงตัวกว่า ที่มีในปัจจุบัน จนอาจนำไปประยุกต์ใช้หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ได้

เรื่องของสัตว์พิษ หากไม่ใช่งูแล้ว มักจะถูกละเลยเพิกเฉย เพราะมักไม่มีอันตรายถึงชีวิต หรือบางชนิด มีอันตรายสูงก็จริง แต่ก็มิได้รับพิษจำนวนไม่มากพอที่จะคุ้มค่าในการพัฒนาการรักษาด้วยการใช้เซรุ่ม หรือการรักษาที่จำเพาะ หรือไม่ก็มักจะเกิดกับผู้คนที่มีอำนาจซื้อต่ำ ผู้คนที่อยู่ตามท้องนา ป่าเขา แต่คนในเมือง โดยเฉพาะเมืองใหญ่แทบไม่รู้จัก ทำให้ความสำคัญของเรื่องนี้ค่อนข้างต่ำ แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยหากคิดแต่เพียงเชิงพาณิชย์และคุ้มทุน คงไม่อาจพัฒนาสิ่งใหม่ ๆ ขึ้นได้ การทำวิจัยตามกระแสโดยเพิกเฉยสิ่งที่คิดว่าไร้ค่า อาจทำให้เรากำลังสูญเสียสิ่งมีค่าไปโดยไม่รู้ตัว

การศึกษานี้เริ่มจากแมงป่องช้าง ต่อมาเป็นการศึกษาน้ำพามดคันไฟ ต่อหว่าเสือ ต่อหลุมตะขบ และกำลังเริ่มทำวิจัยพาผึ้งมีม โปรตีนที่ศึกษาได้จากน้ำพิษของสัตว์แต่ละชนิด แม้ว่าจะระบุได้เพียงไม่กี่ชนิดจนไม่อาจกล่าวได้ว่าได้รูปแบบโปรตีนโอมิกส์ของน้ำพิษ แต่ก็ช่วยให้ได้ช่องทาง ได้วิธีการ ได้เทคนิค ที่จะดำเนินการศึกษาต่อไปได้ ซึ่งดูเหมือนวิทยาการทางด้านนี้มีความก้าวหน้ามากขึ้น มีเทคนิคใหม่ ๆ ที่อาจช่วยให้ได้รูปแบบโปรตีนโอมิกส์เร็วขึ้น และแน่นอนขึ้น อย่างไรก็ตาม โปรตีน Heteroscorpine ที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ ไม่พบในผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโอมิกส์ สาเหตุน่าจะเป็นเพราะการ spot โปรตีนในเทคนิค 2D-PAGE ยังแยกออกจากกันไม่ดีพอ ทำให้วิเคราะห์ไม่ได้ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันมีเทคนิคทางด้าน Mass spectroscopy ใหม่ ๆ ที่อาจนำมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาเรื่องนี้ต่อไป

ชนิดของโปรตีนที่ได้ศึกษาในเชิงลึกจากสัตว์พิษแต่ละชนิดก็แตกต่างกันไป ในแมงป่องช้างซึ่งทำมานานก็ได้ 2 โปรตีนที่ก้าวหน้าไปมาก คือ Heteroscorpine (HS) และ Heteromtoxin (HmTx) ซึ่งก็ได้ลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้นแล้ว และได้โครงสร้างสามมิติแล้ว และ Heteroscorpine ด้วยความช่วยเหลือจากประเทศญี่ปุ่นช่วยให้สามารถโคลน และเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียได้แล้ว ส่วน Heteromtoxin นั้น กำลังอยู่ในขั้นการเริ่มโคลนด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมี โดยมีได้ขอความช่วยเหลือจากต่างประเทศ ด้วยหวังจะสร้างเทคนิคนี้ให้ยืนอยู่ได้ด้วยตนเอง ส่วนมดคันไฟก็ได้มา 1 โปรตีน คือ Solgem 4 ซึ่งฤทธิ์ของมันก็ยังไมชัดเจน sequence ที่ได้ก็ยังไม่ชัด ยังสับสนอยู่มาก เนื่องจากคาดว่ามียหลาย isoform แม้จะใช้ primer คู่เดียวกันกลับได้ PCR product ต่างออกไปและเมื่อส่ง sequence ก็ได้ลำดับแตกต่างออกไป บางครั้งต่างถึงร้อยละ 20 ทำให้การทำงานกับ Solgem 4 เป็นไปด้วยความยากลำบาก และยังไม่สามารถสรุปผลงานเพื่อตีพิมพ์ได้ ส่วนต่อหัวเสือและต่อหลุมเพิ่งเริ่มต้นได้ไม่นาน เพียง 2 ปีนี้เอง แต่ก็ได้ผลงานมาก โปรตีน 2 ชนิด คือ hyarulonidase และ phospholipase แม้ว่าจะยังไม่ได้ full sequence แต่ก็หา activity ได้แล้ว และ

Vespapase ซึ่งมีฤทธิ์เป็น phospholipase ก็ได้ sequence มาเกินครึ่งและได้โครงสร้างสามมิติแล้ว ส่วนน้ำพิษตะขาบและผึ้งมีมียังอยู่ในขั้นเริ่มต้น

โดยหลักการทำงานแล้ว สัตว์พิษที่ได้มา ถ้าเลี้ยงไว้ได้ก็เลี้ยงไว้ ถ้าเลี้ยงไม่ได้ เลี้ยงไม่เป็นก็ต้องเสาะหาเป็นครั้งคราวไป เมื่อได้มาก็ทำการรีดพิษเอง พิษที่ได้ก็นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่มีคือ SDS-PAGE เพื่อดูว่ามีโปรตีนมากน้อยเพียงใด และโปรตีนมีรูปแบบอย่างไร ต้องมีการจัดการก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อยด้วย 2D-PAGE หรือไม่ ถ้าจำเป็นก็อาจต้อง treat ก่อนแล้วพอได้ spot จาก 2D-PAGE ก็ส่งวิเคราะห์ชนิดด้วย Mass spectroscopy เพราะหวังจะได้ชนิดของโปรตีนมาก ๆ ในคราวเดียว แล้วค่อยนำมาคิดอีกทีว่าจะมุ่งเจาะลึกไปที่โปรตีนตัวใด น่าจะมีฤทธิ์สูงหรือไม่ เป็นโปรตีนหลักในน้ำพิษหรือไม่ จะมีเทคนิคสูงพอที่จะศึกษาหรือไม่ ศึกษามาแล้วพอจะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มีค่า impact factor สูง ๆ หรือไม่ หรือว่าเป็นโปรตีนใหม่ที่ไม่มีผู้ใดศึกษา หรือว่าสำคัญต่อวิวัฒนาการ หรือว่าอาจจะประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้หรือไม่ เหล่านี้ล้วนเป็น criteria หลัก ๆ ที่นำมาใช้พิจารณาประกอบกันในการเลือกโปรตีนแต่ละชนิดมาศึกษาต่อ ซึ่งก็จะเห็นว่า โปรตีนที่เลือกก็ได้แก่ โปรตีนที่มีฤทธิ์เป็น hyaluronidase, phospholipase และโปรตีน Vespa albumin ซึ่งโปรตีนสองชนิดแรกเข้าในหลักการของการง่ายต่อการประยุกต์ใช้ ส่วน Vespa albumin นั้นสำคัญในแง่ที่สำคัญต่อวิวัฒนาการ เพราะอัลบูมินถือว่าเป็นโปรตีนพื้นฐานที่พบในสัตว์จำพวกมิใช่ทุกชนิด ทั้งสัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน รวมไปถึงแมลง ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จะช่วยสร้างความสัมพันธ์ในเรื่องวิวัฒนาการได้ เมื่อเลือกชนิดของโปรตีนที่จะศึกษา ขั้นตอนต่อไปคือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้น ด้วยวิธี PCR หรือ RT-PCR ก็แล้วแต่ว่าแม่แบบเป็น DNA หรือ RNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากโปรตีนที่มีฤทธิ์อย่างเดียวกันในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีผู้รายงานไว้แล้ว เมื่อได้ลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้นก็จะตั้งชื่อโปรตีนเหล่านั้นขึ้นเอง เพื่อให้มีเอกลักษณ์ว่าเป็นโปรตีนของเราเอง ซึ่งไม่ว่าจะเป็นชื่อ Heteroscorpine (HS), Heteromtoxin (HmTx), Vespapase (VPase) หรือ Vespumin ก็ล้วนเป็นชื่อที่ตั้งขึ้นเองทั้งสิ้น จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้ก็นำไปสู่การสร้างโครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรมที่พอจะหาได้จาก internet ซึ่งในขั้นต่อไปก็เข้าสู่ในเรื่องของการโคลน และการเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย เพื่อวิจัยด้านกลไก การออกฤทธิ์ จลนศาสตร์ และการประยุกต์ใช้ต่อไป

สำหรับโปรตีน ที่มีฤทธิ์เป็น hyaluronidase นั้น เป็นโปรตีนที่มีโอกาสนำมาประยุกต์ใช้ได้มากที่สุด เพราะมีฤทธิ์ทำลาย hyaluronan ของเนื้อเยื่อ ในทางการแพทย์นั้น มีรายงานการใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็ง ช่วยให้อาเจียนมะเร็งได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้อาจใช้สำหรับยาภายนอก เช่นใช้ร่วมกับ collagenase และ phospholipase สำหรับยาชาเฉพาะ จะช่วยให้ยาออกฤทธิ์ได้เร็วขึ้นโดยเฉพาะบริเวณที่เป็นผิวหนังหนา เช่น ฝ่ามือฝ่าเท้า หรือไม่ก็อาจใช้รักษาแผลเป็น ที่นูนแข็งให้อ่อนตัวลง ลดความเจ็บปวดทรมานและคืนความสวยงามให้กับผิวหนัง นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น hyaluronidase ก็อาจนำมาประยุกต์ใช้สำหรับอุตสาหกรรมอาหารพวกเนื้อกระป๋องที่มักต้องต้มด้วยความร้อนและความดันสูง เพื่อให้เนื้อเปื่อยยุ่ยก่อนบรรจุกระป๋อง โดยเอนไซม์ hyaluronidase และ phospholipase จะช่วยลดการใช้พลังงาน เนื้อจะอ่อนนุ่มตัวได้ง่าย ซึ่งอาจจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสัตว์ปีก

เช่น ไก่ไข่ ที่หมดอายุขาย ไม่ไข่แล้ว แต่ก็นำเอาไปทำอาหารได้ยาก เพราะเนื้อเหนียว หากเอนไซม์ ช่วยได้ ช่วยลดความเหนียวของเนื้อได้ มูลค่าของไก่แก่เหล่านี้ก็สูงขึ้นได้ เป็นต้น

โปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่สนใจ คือ Vespumin หรือ Vespa albumin หรือก็คือโปรตีน albumin ที่พบใน Vespa นั้นเอง ชื่อ Vespumin นี้ตั้งขึ้นเองเพื่อสร้างเอกลักษณ์อย่างทีกล่าว โปรตีนนี้แม้จะดูว่า common แต่ก็ยังไม่มีรายไว้ในที่ใด การศึกษาในเชิงลึกสำหรับโปรตีนนี้ จะได้ในแง่ขององค์ความรู้ในแง่วิวัฒนาการ และสามารถตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มีค่า impact factor สูง ๆ ได้แน่ แต่ในส่วนการประยุกต์ใช้นั้น ยังไม่มีแนวทางแน่ชัด เพราะ albumin ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเพื่อการรักษา osmotic pressure ในผู้ป่วยโรคต่าง ๆ เช่นโรคไต นั้นพัฒนามาจากอัลบูมินของมนุษย์ ซึ่งผู้รับจะมีอาการต่อต้านน้อย แต่ถ้าหากให้อัลบูมินจากสัตว์อื่น การต่อต้านของร่างกายจะสูงกว่า

ส่วน Heterom toxin นั้นคาดว่าจะเป็คู่แข่งของ Imperatoxin ได้เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกัน แต่ก็จำเป็นต้องนำไปทดสอบการจับกับ ryanodine receptor เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการส่งเข้าออกไอออนแคลเซียม ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้ในเรื่องการรักษาโรคหัวใจในอนาคต

ส่วนการสร้างแอนติบอดีนั้น อาศัยหลักการที่ว่า โปรตีนหลักในน้ำพิษย่อมมีบทบาทหลัก การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนหลักในน้ำพิษจะสามารถช่วยลดฤทธิ์ของน้ำพิษได้ จะเห็นว่า การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ hyaluronidase หรือ phospholipase ในน้ำพิษต่อหลุม ก็สามารถช่วยลดความรุนแรงของน้ำพิษต่อหลุมลงได้ แม้ในน้ำพิษของมดคันไฟก็เช่นกัน แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน Solgem 2 ช่วยเพิ่มค่า PD₅₀ ของน้ำพิษได้มาก แสดงว่า piperidine derivatives ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำพิษไม่อาจออกฤทธิ์ได้เลยถ้าขาดโปรตีน ดังนั้นจึงเชื่อว่าโปรตีนในน้ำพิษน่าจะช่วยให้ น้ำพิษกระจายตัวไปยังเซลล์ต่าง ๆ หรือช่วยให้ น้ำพิษเข้าสู่เซลล์ได้มาก ด้วยความรู้อันนี้ อาจช่วยให้เราสามารถพัฒนาการรักษาผู้ได้รับพิษโดยการใชเ้เซรุ่มซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ผลิตมาจากโปรตีนเพียง 1 หรือ 2 ชนิดในน้ำพิษ ซึ่งเซรุ่มที่ได้จะมีประสิทธิภาพสูงกว่า และมีความปลอดภัยสูงกว่าด้วย

ส่วนในเรื่องของโครงสร้างสามมิตินั้น โปรตีน 3 ตัว คือ Heteroscorpine และ Heterom toxin ในน้ำพิษแมงป่องข้าง, Solgem 4 ในน้ำพิษมดคันไฟ และ Vespapase-1 ในน้ำพิษต่อหัวเสือ สามารถคาดเดาโครงสร้างสามมิติได้ด้วยการใช้โปรตีนใกล้เคียงเป็นต้นแบบ แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติต่อไปอีก เพื่อให้ทราบความสัมพันธ์ของโครงสร้างที่มีต่อหน้าที่และการทำงานของโปรตีน

งานวิจัยชิ้นนี้ แม้มีจุดมุ่งหวังหลักเพื่อค้นหาโปรตีนใหม่ ๆ ที่มีฤทธิ์ใหม่ ๆ มีฤทธิ์ดีกว่า และคงตัวกว่า แต่จุดประสงค์รองที่ไม่อาจเพิกเฉยได้ คือ จุดประสงค์ในด้านการอนุรักษ์ เพราะเป็นการศึกษาทรัพยากรทางธรรมชาติของประเทศอย่างหนึ่ง ก่อนที่จะถูกละเลยจนสูญพันธุ์ จากการกำจัดทิ้ง หรือจากการทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยและการบริโภค ซึ่งหากก่อประโยชน์ได้แล้ว อาจช่วยสร้างคุณค่า และนำไปสู่การอนุรักษ์ เนื่องจากเชื่อว่าการที่จะอนุรักษ์สิ่งใดให้ยั่งยืน เพียงแสดงให้เห็นถึงคุณค่าต่อสิ่งแวดล้อม ความสวยงาม หรือคุณค่าทางจิตใจ อาจไม่ทันการ การสร้างคุณค่าโดยเห็นประโยชน์เป็น

รูปธรรมในเชิงพาณิชย์น่าจะเป็นทางออกที่ดีอย่างหนึ่ง สิ่งมีชีวิตเหล่านี้อาจจะมีชีวิตอยู่รอดต่อไปได้ในที่สุด

หนังสืออ้างอิง

Abe T, Sugita M, Fujikura T, Hiyoshi J, Akasu M. Giant hornet (*Vespa mandarinia*) venomous phospholipases. The purification, characterization and inhibitory properties by biscoclaurine alkaloids. *Toxicon*. 2000 Dec;38(12):1803-16.

Conde R, Zamudio FZ, Rodriguez MH, Possani LD. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett*. 2000 Apr 14;471(2-3):165-8.

de O Beleboni R, Pizzo AB, Fontana AC, de O G Carolino R, Coutinho-Netto J, Dos Santos WF. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur J Pharmacol*. 2004 Jun 16;493(1-3):1-17.

de Oliveira L, Cunha AO, Mortari MR, Pizzo AB, Miranda A, Coimbra NC, dos Santos WF. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigroreticular pathways. *Brain Res*. 2005 Jan 7;1031(1):74-81.

de Oliveira MR, Palma MS. Polybitoxins: a group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). *Toxicon*. 1998 Jan;36(1):189-99.

Diego-García E, Batista CV, García-Gómez BI, Lucas S, Candido DM, Gómez-Lagunas F, Possani LD. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon*. 2005 Mar 1;45(3):273-83.

Eberhart AH, Weiler CR, Erie JC. Angioedema related to the use of hyaluronidase in cataract surgery. *Am J Ophthalmol*. 2004 Jul;138(1):142-3.

Franzini-Armstrong C, Protasi F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev*. 1997 Jul;77(3):699-729.

Froy O, Gurevitz M. Arthropod and mollusk defensins--evolution by exon-shuffling. *Trends Genet*. 2003 Dec;19(12):684-7.

Garcia ML, Hanner M, Knaus HG, Slaughter R, Kaczorowski GJ. Scorpion toxins as tools for studying potassium channels. *Methods Enzymol*. 1999;294:624-39.

Guan R, Wang CG, Wang M, Wang DC. A depressant insect toxin with a novel analgesic effect from scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Sep 10;1549(1):9-18.

Gurola GB, Zhu X, Valdivia HH, 2005. Scorpion peptides as high-affinity probes of ryanodine receptor function. In: Wehrens XH, Marks AR, editors. Ryanodine receptors: structure, function, and dysfunction in clinical disease. New York: Springer; p 191-200.

Haim B, Rimon A, Ishay JS, Rimon S. Purification, characterization and anticoagulant activity of a proteolytic enzyme from *Vespa orientalis* venom. *Toxicon*. 1999 May;37(5):825-9.

Han J, You D, Xu X, Han W, Lu Y, Lai R, Meng Q. An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*. 2008 Apr;51(5):914-22.

Hartman GD, Egbertson MS, Halczenko W, Laswell WL, Duggan ME, Smith RL, Naylor AM, Manno PD, Lynch RJ, Zhang G, et al. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Discovery and design of exosite inhibitors. *J Med Chem*. 1992 Nov 27;35(24):4640-2.

Hartman DA, Tomchek LA, Lugay JR, Lewin AC, Chau TT, Carlson RP. Comparison of antiinflammatory and antiallergic drugs in the melittin- and D49 PLA2-induced mouse paw edema models. *Agents Actions*. 1991 Sep;34(1-2):84-8.

Higashijima T, Uzu S, Nakajima T, Ross EM. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J Biol Chem*. 1988 May 15;263(14):6491-4.

Ho CL, Lin YL, Li SF. Three toxins with phospholipase activity isolated from the yellow-legged hornet (*Vespa verutina*) venom. *Toxicon*. 1999 Jul;37(7):1015-24.

Hoffman DR, Dove DE, Jacobson RS. Allergens in Hymenoptera venom. XX. Isolation of four allergens from imported fire ant (*Solenopsis invicta*) venom. *J Allergy Clin Immunol*. 1988 Nov;82(5 Pt 1):818-27.

Hoffman DR. Allergens in Hymenoptera venom XXIV: the amino acid sequences of imported fire ant venom allergens Sol i II, Sol i III, and Sol i IV. *J Allergy Clin Immunol*. 1993 Jan;91(1 Pt 1):71-8.

Jouvenaz DP, Blum MS, MacConnell JG. Antibacterial activity of venom alkaloids from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972 Oct;2(4):291-3.

Junn HJ, Youn J, Suh KH, Lee SS. Cloning and expression of Klebsiella phage K11 lysozyme gene. *Protein Expr Purif*. 2005 Jul;42(1):78-84.

Kini RM, 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem J*. Aug 1;397(3):377-387.

Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Dec;63(24):3030-41.

Konno K, Hisada M, Itagaki Y, Naoki H, Kawai N, Miwa A, Yasuhara T, Takayama H. Isolation and structure of pompilidotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Sep 29;250(3):612-6.

Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Yasuhara T, Nakata Y, Miwa A, Kawai N. Molecular determinants of binding of a wasp toxin (PMTXs) and its analogs in the Na⁺ channels proteins. *Neurosci Lett*. 2000 May 5;285(1):29-32.

Kuchler K, Gmachl M, Sippl MJ, Kreil G. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur J Biochem*. 1989 Sep 1;184(1):249-54.

Kudo K, Tu AT. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) venom. *Arch Biochem Biophys*. 2001 Feb 15;386(2):154-62.

Legros C, Céard B, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Lett*. 1998 Jul 24;431(3):375-80.

Lewis-Smith PA. Adjunctive use of hyaluronidase in local anaesthesia. *Br J Plast Surg*. 1986 Oct;39(4):554-8.

Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Oct;2(10):790-802.

Pantera B, Hoffman DR, Carresi L, Cappugi G, Turillazzi S, Manao G, Severino M, Spadolini I, Orsomando G, Moneti G, Pazzagli L. Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Oct 13;1623(2-3):72-81.

Popkin RJ. The use of hyaluronidase in the treatment of chronic skin ulcers in diffuse generalized scleroderma. *Angiology*. 1952 Aug;3(4):335-42.

Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur J Biochem*. 1999 Sep;264(2):287-300.

Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*. 2000 Sep-Oct;82(9-10):861-8.

Possani LD, Corona M, Zurita M, Rodriguez MH. From noxiustoxin to scorpine and possible transgenic mosquitoes resistant to malaria. *Arch Med Res*. 2002 Jul-Aug;33(4):398-404.

Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. *Toxicon*. 2004 Jun 15;43(8):865-75.

Santonastasi M, Wehrens XH. Ryanodine receptors as pharmacological targets for heart disease. *Acta Pharmacol Sin*. 2007 Jul;28(7):937-44.

Schagger, H, von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 1987 Nov 1;166(2):368-79.

Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1;31(13):3381-5.

Simeoni I, Rossi D, Zhu X, García J, Valdivia HH, Sorrentino V. Imperatoxin A (IpTx(a)) from *Pandinus imperator* stimulates [(3)H]ryanodine binding to RyR3 channels. FEBS Lett. 2001 Nov 9;508(1):5-10.

Srinivasan KN, Gopalakrishnakone P, Tan PT, Chew KC, Cheng B, Kini RM, Koh JL, Seah SH, Brusic V. SCORPION, a molecular database of scorpion toxins. Toxicon. 2002 Jan;40(1):23-31.

Stern R. Hyaluronidases in cancer biology. Semin Cancer Biol. 2008 Aug;18(4):275-80.

Turkov M, Rashi S, Noam Z, Gordon D, Ben Khalifa R, Stankiewicz M, Pelhate M, Gurevitz M. In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 1997 Jun;10(1):123-31.

Uawonggul N, Thammasirirak S, Chaveerach A, Arkaravichien T, Bunyatratchata W, Ruangjirachuporn W, Jearranaiprepame P, Nakamura T, Matsuda M, Kobayashi M, Hattori S, Daduang S. Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. Toxicon. 2007 Jan;49(1):19-29.

Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ, Coronado R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Dec 15;89(24):12185-9.

Xu X, Li J, Lu Q, Yang H, Zhang Y, Lai R. Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. Toxicon. 2006a Feb;47(2):249-53.

Xu X, Yang H, Yu H, Li J, Lai R. The mastoparanogen from wasp. Peptides. 2006b Dec;27(12):3053-7.

Zamudio FZ, Conde R, Arévalo C, Becerril B, Martin BM, Valdivia HH, Possani LD. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. J Biol Chem. 1997 May 2;272(18):11886-94.

Zhu S, Tytgat J. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. Cell Mol Life Sci. 2004 Jul;61(14):1751-63.

Zlotkin E, Fishman Y, Elazar M. AaIT: from neurotoxin to insecticide. *Biochimie*. 2000 Sep-Oct;82(9-10):869-81.

นันทวัน เอื้อวงศ์กุล, ศักดา ดาดวง. พิษแมงป่อง: นกกลัวหรือนำใช้. วารสารวิทยาศาสตร์ มช. เมย - มิย 2552; 37 (2):157-162.

ศักดา ดาดวง, นันทวัน เอื้อวงศ์กุล “แมงป่องช้าง” บริษัท โรงพิมพ์กรุงเทพ (1984) จำกัด, 58 หน้า

ผลผลิต (Output) จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และ หน้า) พร้อมแจ้งสถานะของการตีพิมพ์ เช่น submitted, accepted, in press, published

1. Paroonkorn Incamnoi, Rina Patramanon, Sompong Thammasirirak, Arunrat Chaveerach, Wandee Bunyatratchata, Nunthawun Uawonggul, Sophida Sukprasert, Teerawat Namonsai, Jureerut Daduang, Sakda Daduang (2010) Genomic DNA, Sequence Analysis and Molecular Modeling of Heteroscorpine-1, -2 and -3 (HS-1, HS-2 and HS-3) toxin from *Heterometrus spp.* scorpion venom **Toxicon** (in preparation).

2. Sophida Sukprasert, Sompong Thammasirirak, Nunthawun Uawonggul, Paroonkorn Incamnoi, Teerawat Namonsai, Tasanee Jamjanya, Jureerut Daduang and Sakda Daduang (2010) Solgem 4, an allergen in Venom of Tropical Red Fire Ant, *Solenopsis geminata* **Toxicon** (in preparation).

3. Sophida Sukprasert, Prapenpuksiri Rungsa, Nunthawun Uawonggul, Teerawat Namonsai, Sompong Thammasirirak, Jureerut Daduang and Sakda Daduang (2010) Protein identification in Thai banded wasp venom, *Vespa affinis* and *Vespa tropica* by a proteomic approach **Toxicon** (in preparation).

4. Nunthawun Uawonggul, Sompong Thammasirirak, Sutthidech Preecharram, Paroonkorn Incamnoi, Sophida Sukprasert, Wandee Bunyatratchata, Michiyuki Matsuda, Sakda Daduang (2010) Bacterial Expression of Recombinant Heteroscorpine-1 (HS-1) Gene and Protein Purification **Protein Expression and Purification** (in preparation).

5. Paroonkorn Incamnoi, Rina Patramanon, Sompong Thammasirirak, Arunrat Chaveerach, Nunthawun Uawonggul, Sophida Sukprasert, Jureerut Daduang, Sakda Daduang (2010) Heteromtoxin (HmTx), calcium channel blocker from *Heterometrus laoticus* **Toxicon** (in preparation).

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)

ไม่มี

- เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)

ไม่มี

- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)

ไม่มี

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

มีการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท สำเร็จการศึกษา 1 คน

มีนักศึกษากำลังศึกษาอยู่ 2 คน คาดจะสำเร็จการศึกษาในปี 2555

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Sakda Daduang Active Proteins In Scorpion, Wasp And Fire Ant Venom. **The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference on Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development.** Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, May 7-8, 2009.

2. Nunthawun Uawonggul, Prapenpuksiri Rungsa, Sophida Sukprasert, Paroonkorn Incamnoi, Sompong Thammasirirak, and Sakda Daduang. Phospholipase Activity From Thai King Cobra, Cobra, Scorpion, Wasp And Ant Venoms. **The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference on Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development.** Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, May 7-8, 2009.

3. Paroonkorn Incamnoi, Sompong Thammasirirak, Arunrat Chaveerach, Wandee Bunyatratchata, Nunthawun Uawonggul, and Sakda Daduang. Purification and Characterization of A 'Short' Imperatoxin-Like Peptide From *Heterometrus Laoticus* Venom. **The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference on Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development.** Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, May 7-8, 2009.

4. Prapenpuksiri Rungsa, Nunthawun Uawonggul, Sophida Sukprasert, Paroonkorn Incamnoi, Sompong Thammasirirak, and Sakda Daduang. Purification And Activity of Hyaluronidase from Thai Dead, Great Banded Wasps Venom (*Vespa Tropica*). **The 2nd**

Biochemistry and Molecular Biology Conference on Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development. Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, May 7-8, 2009.

5. Sophida Sukprasert, Theerawat Namonsai, Prapenpuksiri Rungsa, Nunthawun Uawonggul, Sompong Thammasirirak, Jureerut Daduang, and Sakda Daduang. Proteomic Study of The Thai Banded Wasp Venom, *Vespa affinis*. **The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference on Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development.** Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, May 7-8, 2009.

6. Prapenpuksiri Rungsa, Nunthawun Uawonggul, Sophida Sukprasert, Paroonkorn Incamnoi, Theerawat Namonsai, Sompong Thammasirirak and Sakda Daduang Main Protein Components in Thai Dead, Great Banded Hornet, *Vespa Tropica*, Venom **The Third Annual Symposium of Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”** Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand, August 28-29, 2008.

7. Sophida Sukprasert, Nunthawun Uawonggul, Paroonkorn Incomnoi, Sompong Thammasirirak, Tasanee Jamjanya and Sakda Daduang, An Allergen from Thai Red Fire Ant, *Solenopsis geminata* : Characterization and Antibody Production **33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference “Biochemistry of Cell Regulation”** Megaron Athens International Conference Centre, Athens, Greece, June 28th to July 3rd, 2008

8. Sakda Daduang, Heteroscorpine (HS) toxin from Venom of Thai Giant Scorpion (*Heterometrus sp.*) with antibacterial activities. **BIT Life Sciences’ 1st Annual Peptide and Protein Conference (PepCon-2008) “From Concept to Market”** Shenzhen Convention & Exhibition Center, Shenzhen (เซินเจิ้น), People republic of China, 22-24 April 2008.

9. Sakda Daduang, Sompong Thammasirirak, Tassanee Jamjanya, Nunthawun Uawonggul, Sophida Sukprasert, Theerawat Namonsai, “Amino acid sequence determination and investigation of activity of proteins and peptides in venom from local animals in the Northeastern part of Thailand”, **นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7** ระหว่างวันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมแอมบาสเตอร์ ซิตี้ จอมเทียน เมืองพัทยา จ.ชลบุรี

10. Sakda Daduang, Nunthawun Uawonggul, Sompong Thammasirirak, Takeshi Nakamura, Michiyuki Matsuda, “Bacterial Expression of Recombinant Heteroscorpine-1 (HS-1) Gene and Protein Purification”, **The Second Annual Symposium of Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research” In Honor of Professor M.R. Jisnusun Svasti’s 60th Birthday.** Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand, September 20-21, 2007.

11. Sophida Sukprasert, Sompong Thammasirak, Tasanee Jamjanya and Sakda Daduang การแยกบริสุทธิ์โปรตีนออกฤทธิ์ในน้ำพิษมดคันไฟไทย (*Solenopsis geminata*) Purification of an active protein in venom of Thai Red fire ant (*Solenopsis geminata*) **The 32st Congress on Science and Technology of Thailand**, 10-12 Oct 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok Thailand

12. Sophida Sukprasert, Sompong Thammasirak, Tasanee Jamjanya and Sakda Daduang Partial amino acid sequence of Sol g III in venom of Thai Red fire ant (*Solenopsis geminata*) **The 1st Biochemistry and Molecular Biology (BMB) Conference**, 26-27 April 2007, Chulalongorn University, Bangkok Thailand

บทความทางวิชาการ

1. นันทวัน เอื้อวงศ์กุล, ศักดา ดาดวง (2552) พิษแมงป่อง : นักล่าหรือน่าใช้ วารสารวิทยาศาสตร์ มข. ปีที่ 37 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2552 หน้า 157-162.