



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 จวีร์ราช แห่งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ผศ.ดร.วรรณดี บัญญัติรัชต์ แห่งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รวมทั้ง ผู้ช่วยวิจัยและผู้รับทุนวิจัย ได้แก่ ดร.นันทวัน เอื้อวงศ์กุล, นายปรุพท์ภรณ์ อินทร์คำน้อย, นางสาวโสภิตา สุขประเสริฐ, นายธีรวัฒน์ นามนไสย์, นางสาวประเพ็ญพัทธ์ศิริ รังษา และนางสาวมุจลินท์ 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 ผลิตแอนติบอดีเพื่อพัฒนาเซรั่มต้านพิษ	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 ผลิตรภัณฑ์ด้านชีวภาพ 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,

Heterom toxin albumin เป็นต้น ซึ่งในการศึกษารั้งนี้ 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), melittin 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)

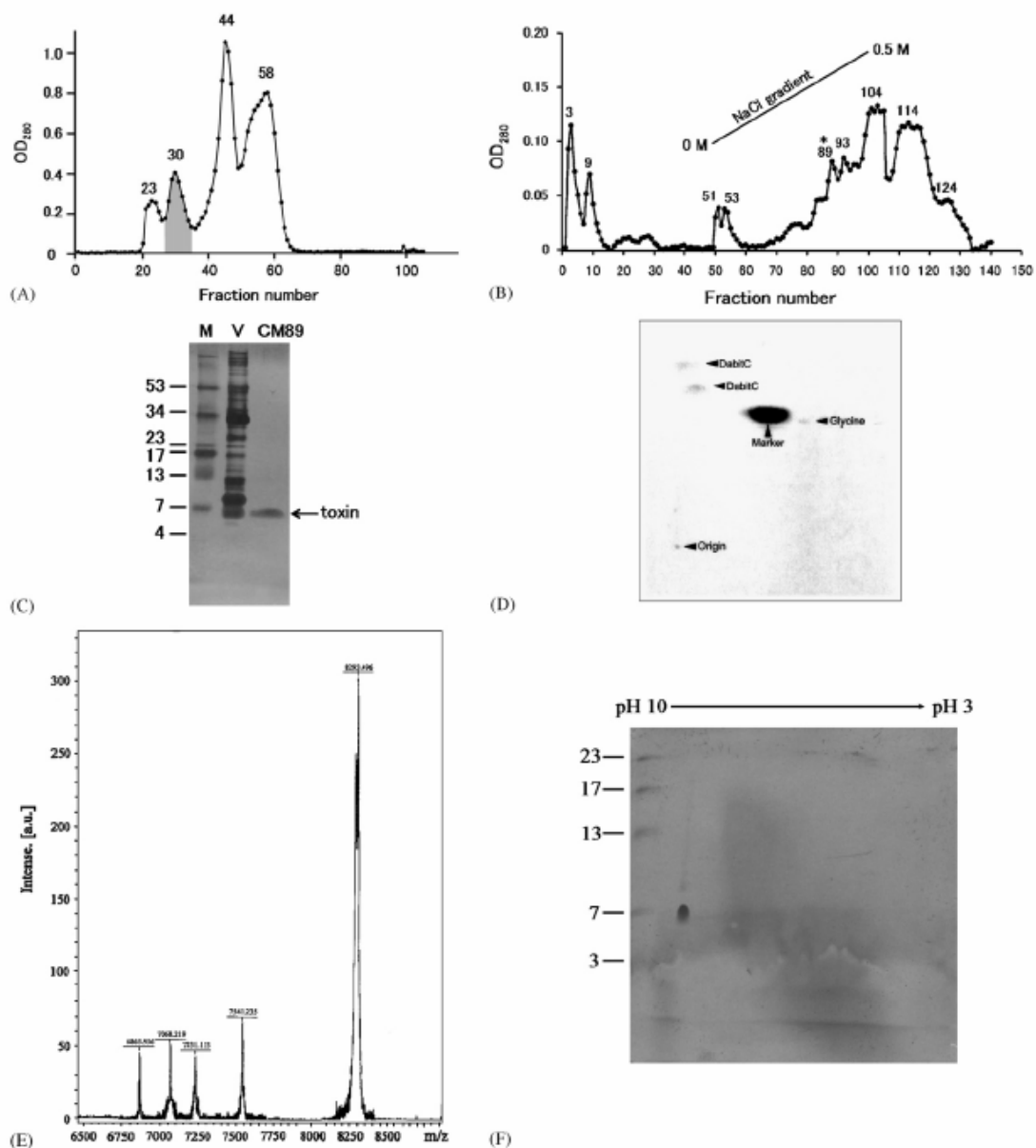


รูปที่ 2.1 แม่แมงป่องช้างพร้อมลูกน้อยอายุ 1 วันบนหลัง (ศักดิ์ดา ดาดวง และนันทวัน เอื้อวงศ์กุล, 2547)

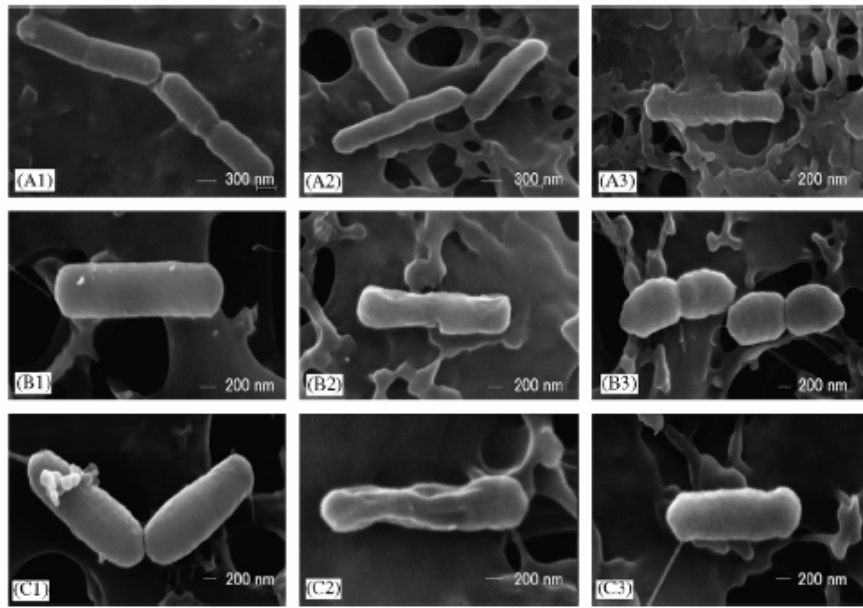


ปล้องพิษ

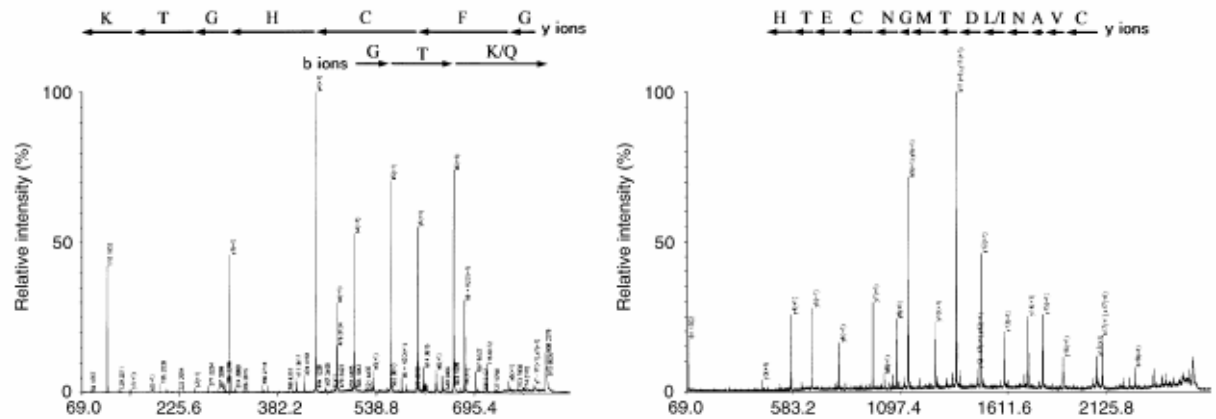
รูปที่ 2.2 แสดงปล้องพิษที่ปลายหางของแมงป่องช้าง (ศักดิ์ดา ดาดวง และนันทวัน เอื้อวงศ์กุล, 2547)



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), เมื่อผ่านการบ่มด้วยน้ำพืษแมงป่องช้าง (2) หรือ HS-1 (3)

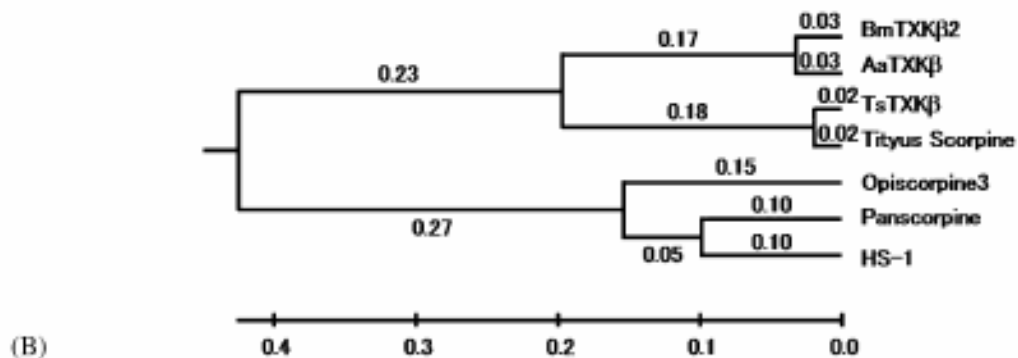


รูปที่ 2.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ HS-1 ด้วย liquid chromatography tandem mass spectrometry (LS-MS/MS) ได้เปปไทด์ที่ทราบลำดับกรดอะมิโน 2 เส้น คือ GFCHGTK และ CVAN(L/I)DTMGNCETH

atatagaactaaatacaacacctccgaaatccgtaaatgcatatTTTTTTCAGTTGATTGATTCTCTGCTCCAAAACAAG 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
 gaaaagtgctcgagtttaagaacattcaaccaccaagtttagagttacgtgacgaactgcgtcatatactgaacgaagccagatatttagacactatttggtagttcgtatggcgaactg 325
 catcggttagcatgaacgaataaggtaatgtttataccagtcgatataatttacgtatcgaatctgagggcttaataataagccagtcgatttccgtagcagtcagcagataccgcctaag 445
 HSF12
 agtcacacggattctgtgattaataatagagcacctaaaccaattatccctcattgaaatgaatttattaattgtcacatccctagcagctagtctattatcttcatctaaaaagtt 565
 tcatgaacacggatttactattgttacgaataatataatacttcgcatgacgttgcgaatcacaacgttaagtaggtattggtatataTTTTTctgaacattgattacagc 685
 cagtgaaaagttccgaatttaataataattgaacattccttactttttatatacagcagattatgtatagtagaattcgccttcgtgccagagacggaatttaataagactgctctcc 805
 gctottaaggaattaatgtagcaatcagtcgccattttaccgacgccaactctatagatactattctggaacgttttggcttttttgaattaaactctgtgcacttttaattttgcac 925
 aatttcagaatcttacaataaagaagaatgggaatggaccgccggagggcataaaacagaataattcttaaggaatatacagccatgccgcgtggcgatatttgataaacgggttacaaa 1045
 aaaaaaaaagacgtacttatcgattattacttttaataaacaacttccaatttcacgttgcgtctccgggaacttcttctttacgagtcctttacgcctcggttcccttgc 1165
 HSR12 HSF11
 tattataggtctattttatagtcgaacaaacaccggagttactaatgttttctcttttcag ATGAAGAGAAGATACAAAAGAAAATTGACGAAAAATAGGAAATATATCCTCGGAGGGA 1285
 E E K I Q K K I D E K I G N N I L G G M 43
 TGGCTAAGGCCGTGCTCCACAACTGGCGAAGGGCGAATTCCAATGCGTGGCAAAATATTGATACGATGGGAAATTGCGAGACTCACTGCCAAAAACCTCAGGTGAAAAGGGATCTGCC 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 CX₄₋₁₆CX₂HGX₆₋₉GX₁CX₄₋₉CX₁C จะป้ายไว้ด้วยแถบสีเหลือง

HS-1	MNSKLTALIFLGLVAIASCGWINEEKIQKKIDEKIGNNILGGMKAVVHKLAKGEFQCYA 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 มีรายงาน ถึงเปปไทด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในน้ำพิษของแตนว่า ประกอบด้วย β -pompilidotoxin และ α -pompilidotoxin ทั้งคู่เป็น neurotoxic protein จับกับ sodium-potassium channel แล้วทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงระบบการเปิด-ปิด channel โดย α -pompilidotoxin เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงนี้ (Konno และคณะ, 1998, 2000) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งและกระตุ้น ion channel, receptor และ transporter ชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของเส้นประสาทในเซลล์สัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนม และเซลล์แมลง (de O Belebony และคณะ, 2004) นอกจากนี้ ยังพบว่า toxin ในพิษ ของแตน *Vespa magnifica* มีฤทธิ์ต้านต่อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และเชื้อรา *C. albicans* อีก ด้วย (Xu และคณะ, 2006a)

เมื่อกล่าวแล้ว พิษของต่อประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก ดังต่อไปนี้

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

2. kinins หรือ vespakinins ปัจจุบันพบจำนวน 17 ชนิด เป็นสารที่ทำให้เกิดการหดตัวของ กล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจ็บปวด ยกตัวอย่างเช่น vespakinin 1 ซึ่งแยกได้จากต่อสาย พันธุ์ *Paravespula maculifrons* (Ho และคณะ, 1999)

3. phospholipase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายฟอสโฟลิปิดไปเป็นกรดไขมัน มีหลาย ชนิดด้วยกัน 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 เป็นโมเลกุลทางชีวภาพที่ นำไปใช้ในทางเภสัชกรรม 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 ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 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 หลังจากที่ได้เตรียมน้ำมันพืชได้ใหม่ 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 ซื้อมาในท้องเย็นก่อนนำมาฉีดพิษ 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 ตัวสัตว์ให้อยู่นิ่ง 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 จึงจะถือว่ามียุทธในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ชนิดนั้น 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 เติมฟีนอลที่อิ่มตัวใน HMW buffer ปริมาตรเท่ากัน vortex ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 5 นาที นำ supernatant มาเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1 v/v) ที่อิ่มตัวด้วย 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) ที่อิ่มตัวด้วย 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 จากนั้นนำไป 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

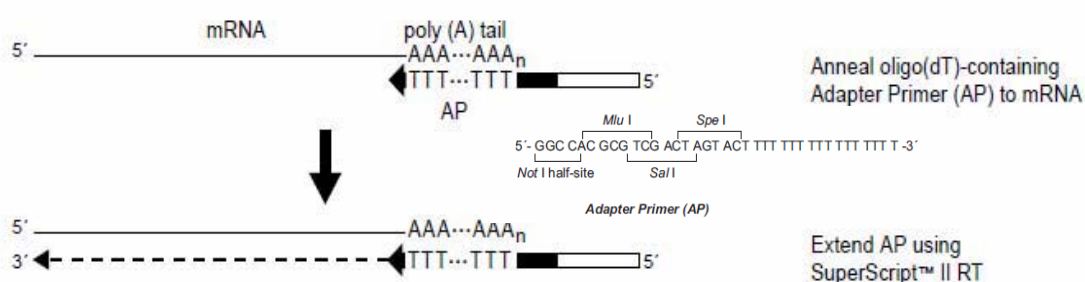
จากนั้นปั่น แล้วเก็บ supernatant กรองผ่าน 0.45 mm Millipore membrane แล้ว incubated กับ glutathione–sepharose 4B bead (Amersham-Pharmacia) ซึ่ง equilibrated กับ buffer ข้างต้นที่ 4 °C พร้อมกับเขย่า จากนั้นทำการล้าง bead แล้ว equilibrated ด้วย cleavage buffer (50 mM Tris–HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM 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

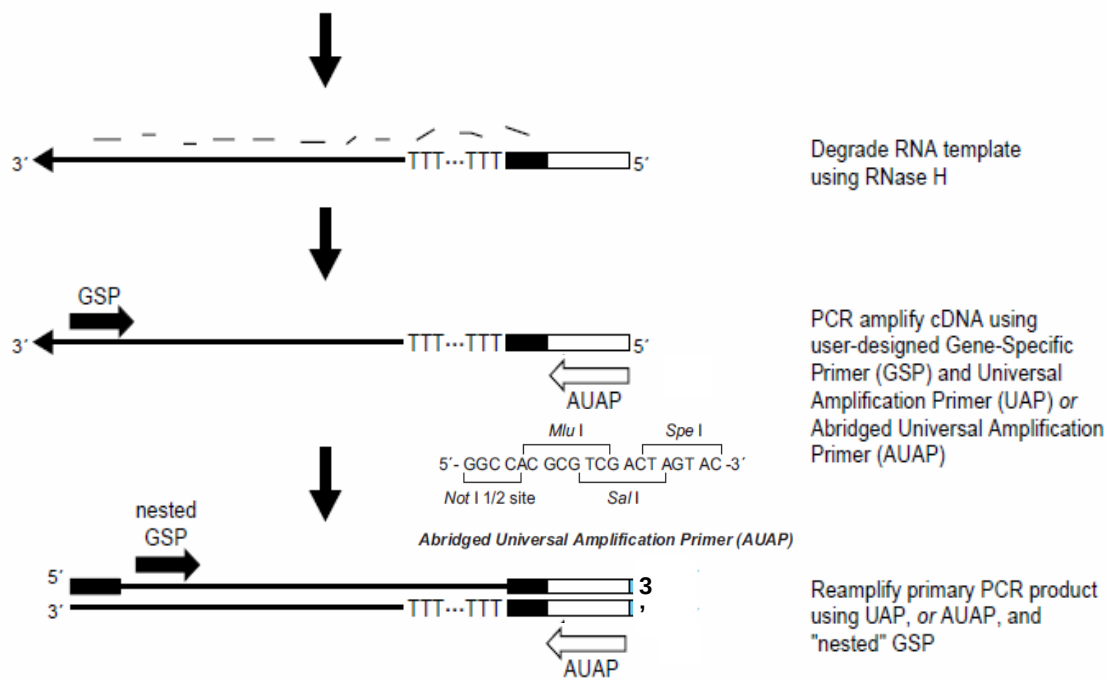
Refolding process (ดัดแปลงจาก Junn และคณะ, 2005)

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) ทิ้งไว้ข้ามคืน 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 เป็นไพรมเมอร์ (anchor base คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมีลำดับเบสที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2-3 ชนิด เพื่อใช้ในการต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับเวกเตอร์ภายหลัง) หรือเรียกว่า adapter primer เมื่อได้ cDNA สายแรกแล้วจึงย่อยอาร์เอ็นเอต้นแบบออกไปโดยใช้เอนไซม์ RNase H แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA สายเดียวที่ได้ด้วยวิธี PCR ใช้ไพรมเมอร์สองชนิด 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 ปล่อยให้แห้งตัวอย่างน้อย 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 ปล่อยให้แห้งตัวอย่างกับ 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

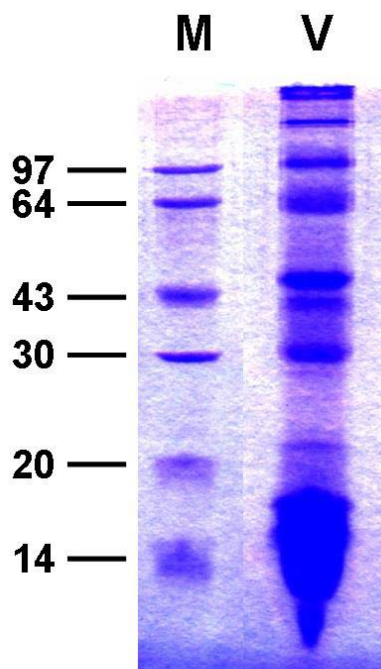


รูปที่ 4.1.1 การเลี้ยงแมงป่องช้าง

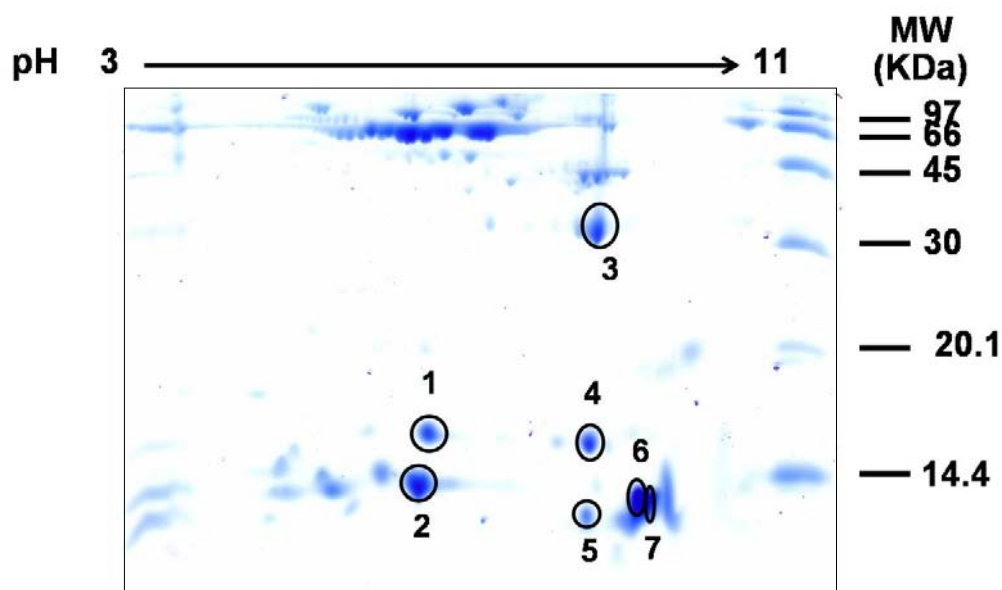
4.1.2 รูปแบบโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษแมงป่องช้าง

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

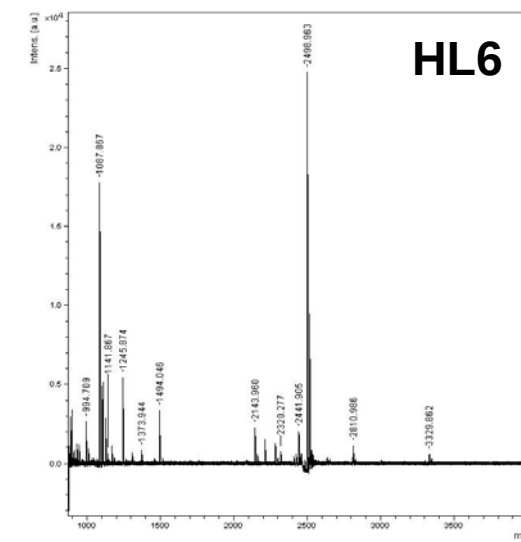
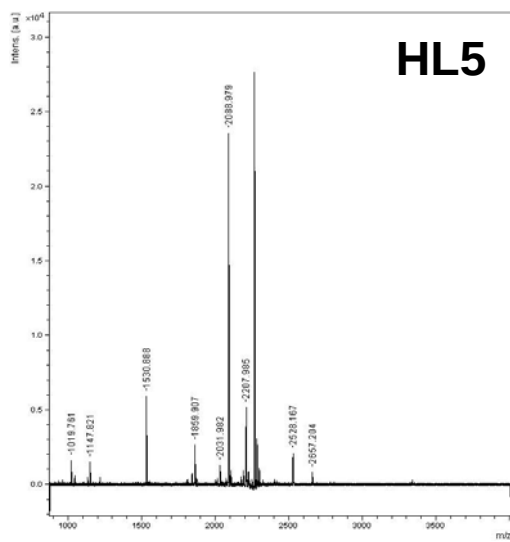
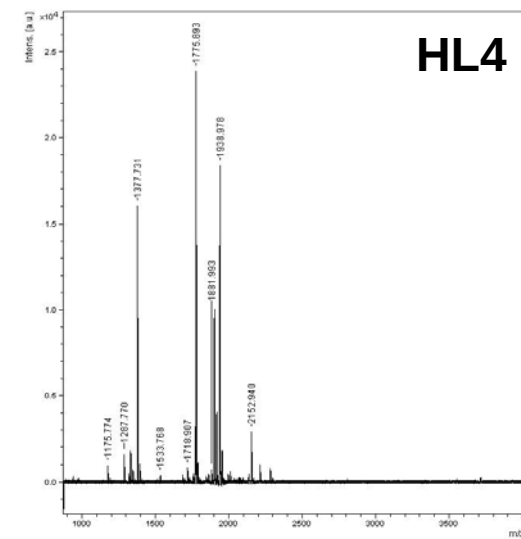
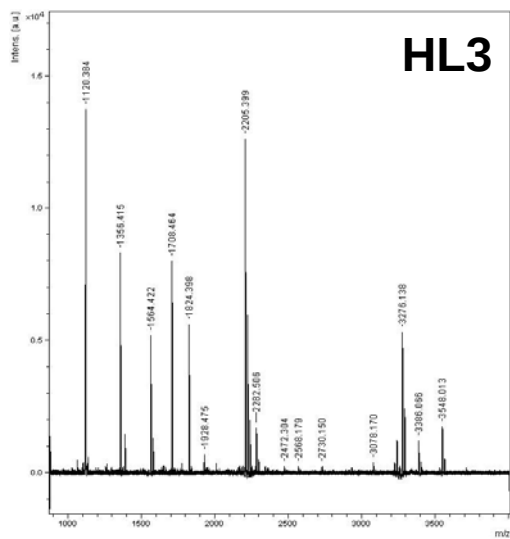
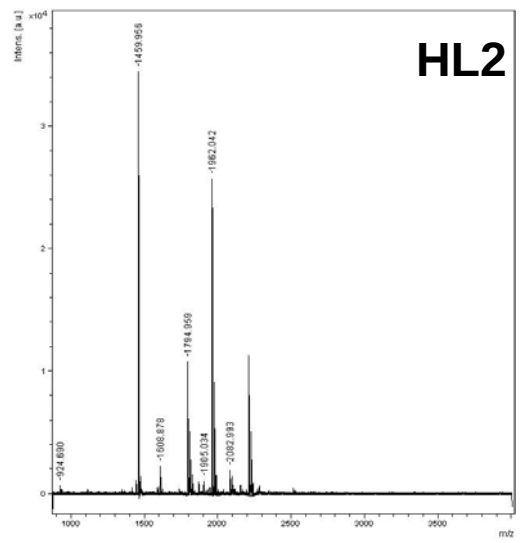
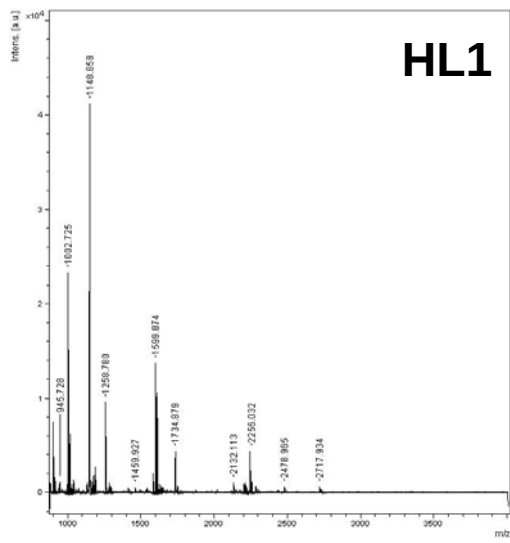
จากนั้น นำน้ำพิษมาแยกด้วย 2D-PAGE พบโปรตีนประมาณ 30 spot (รูปที่ 4.1.3) ทำการตัดโปรตีนที่เป็น major spot (วงกลมไว้ในรูป) ตั้งแต่ spot S1 ถึง S7 ส่งไปทำ peptide mass fingerprint ที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice Unit หรือ BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ trypsin 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)

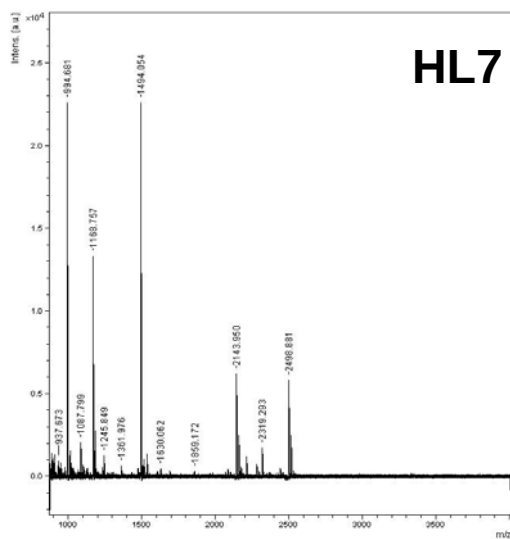


รูปที่ 4.1.2 การตรวจสอบแถบโปรตีนในพิษแมง
ป่องช้างด้วยวิธี SDS-PAGE โดยนำพิษแมงป่องมา
ผสมกับ solubilizing buffer แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย
12% SDS-PAGE แล้วนำไปย้อมด้วย 0.1%
Coomassie brilliant blue

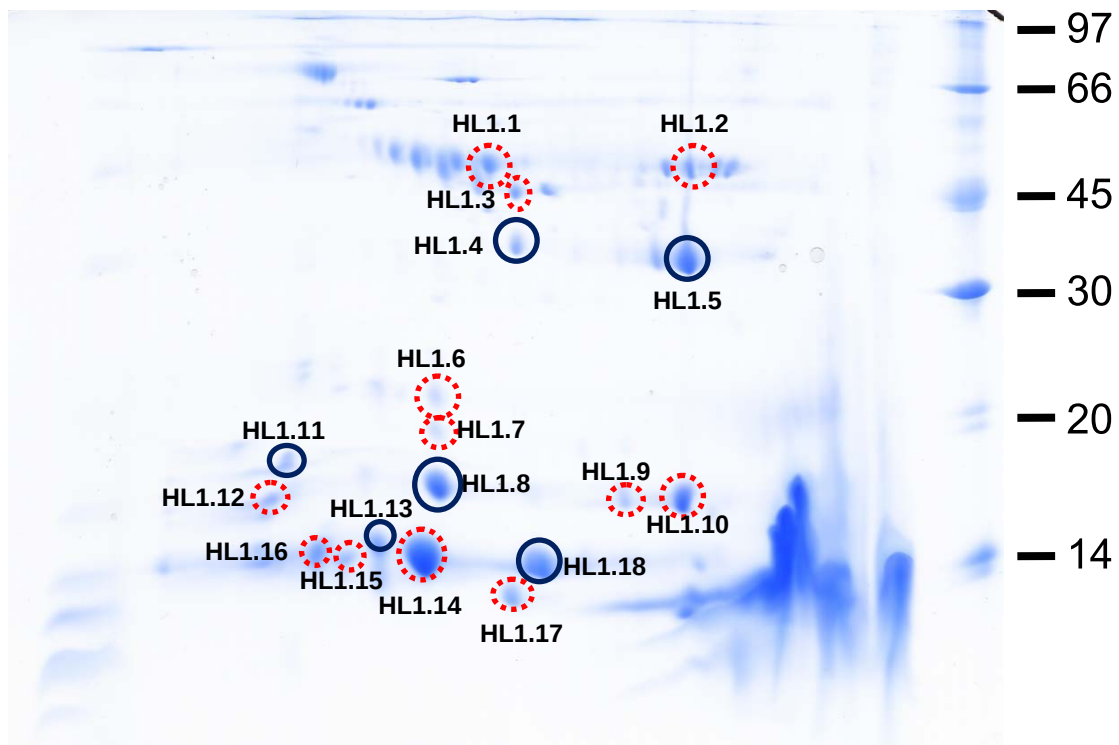


รูปที่ 4.1.3 2D-PAGE profile ของน้ำพิษแมงป่องช้าง (load ปริมาณโปรตีนรวมประมาณ 100 ไมโครกรัม) ภายหลังย้อมด้วยสี Coomassie สำหรับ first dimension ใช้ strip pH 3-11 ส่วน second dimension นั้น ใช้ 16.5% Tris-tricine gel electrophoresis หมายเลข 1 ถึง 7 คือ spot HL1 ถึง HL7 ซึ่งได้ตัดส่งวิเคราะห์ peptide mass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





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

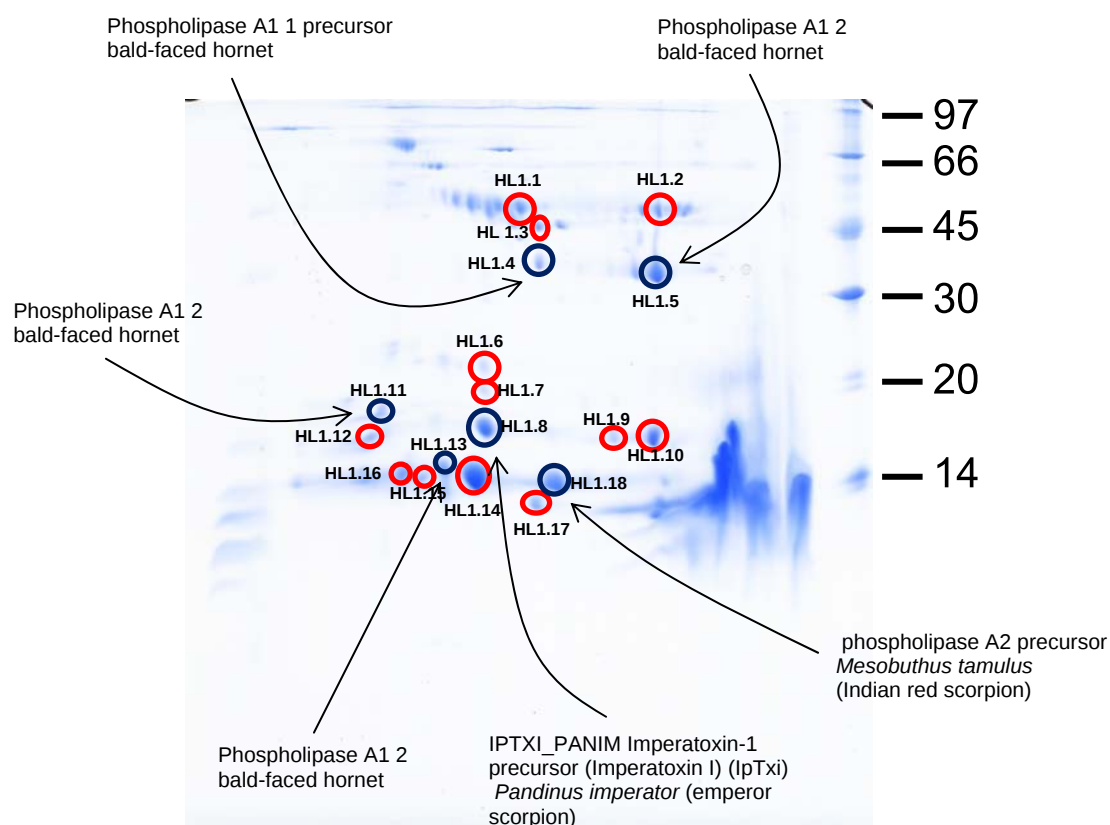


รูปที่ 4.1.5 2D-PAGE profile ของน้ำพิษแมงป่องช้าง ภายหลังย้อมด้วย Coomassie blue วงกลมทั้งประและไม่ว่า คือ spot HL1.1 ถึง 1.17 ที่ถูกส่งไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

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

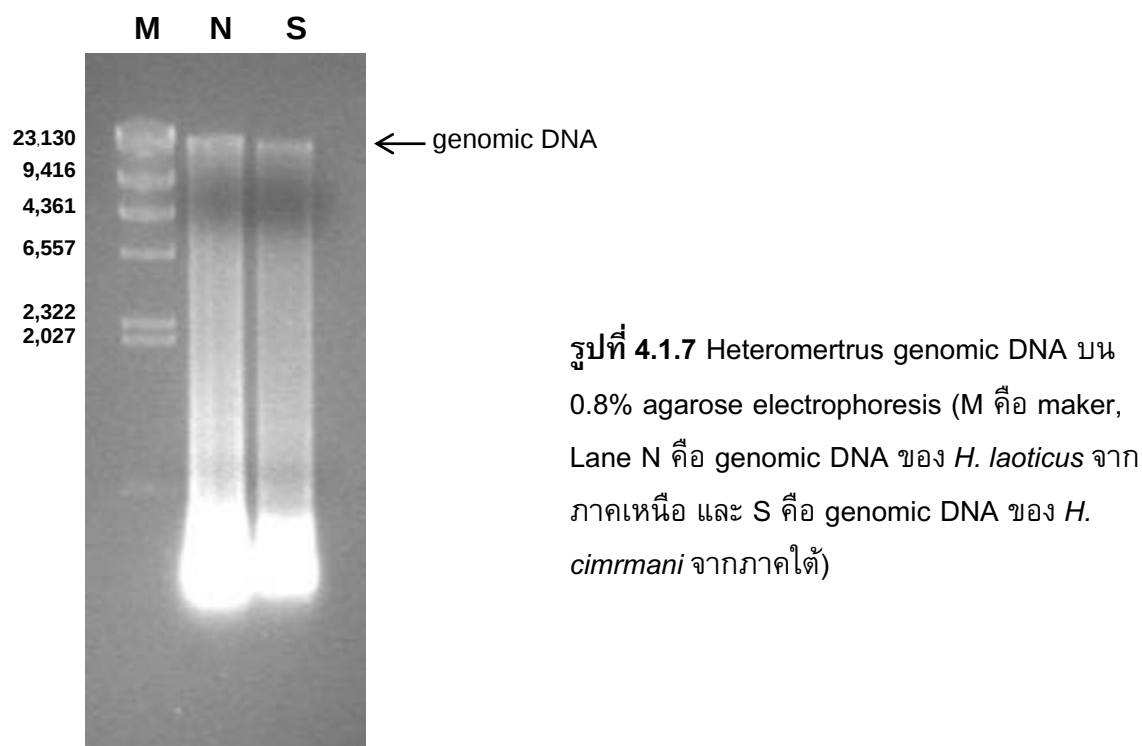
Spot No.	Reference scan	Peptide	Score XC	Source
HL1.8	gi 37079101 sp P59888 IPTXI_PANIM Imperatoxin-1 precursor (Imperatoxin I) (IpTxi) (Imperatoxin inhibitor) [Contains: Imperatoxin-1 large subunit (Imperatoxin I large subunit) Imperatoxin-1 small subunit (Imperatoxin I small subunit)]	R.THDHCDNIPSGQTK.Y	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) ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากน้ำพิษของแมงป่องช้าง *H. laoticus* ได้ลงตีพิมพ์ในวารสาร Toxicon เมื่อปี 2007 แล้ว (Uawonggul และคณะ, 2007) ต่อมาเพื่อหา isoform อื่นในกลุ่มเดียวกันจาก *Heterometrus* อื่น ๆ ด้วยหลักการที่ว่า การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนแม้เพียงลำดับเดียว ก็อาจจะได้โปรตีนที่มีฤทธิ์ต่างออกไป ดังนั้น จึงหวังว่าอาจจะได้ isoform ของ Heteroscorpine ใน *Heterometrus* อื่นที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงขึ้น ดังนั้น จึงได้นำแมงป่องช้างจากภาคเหนือ (จ.พะเยา) และแมงป่องช้างจากภาคใต้ (จ.ปัตตานี) มาเลี้ยงไว้ ซึ่งเมื่อจำแนกชนิดโดย อ. โกวิท น้อยโคตร แห่งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง พบว่าจากภาคเหนือ คือ *H. laoticus* และภาคใต้ คือ *H. cimrmani*

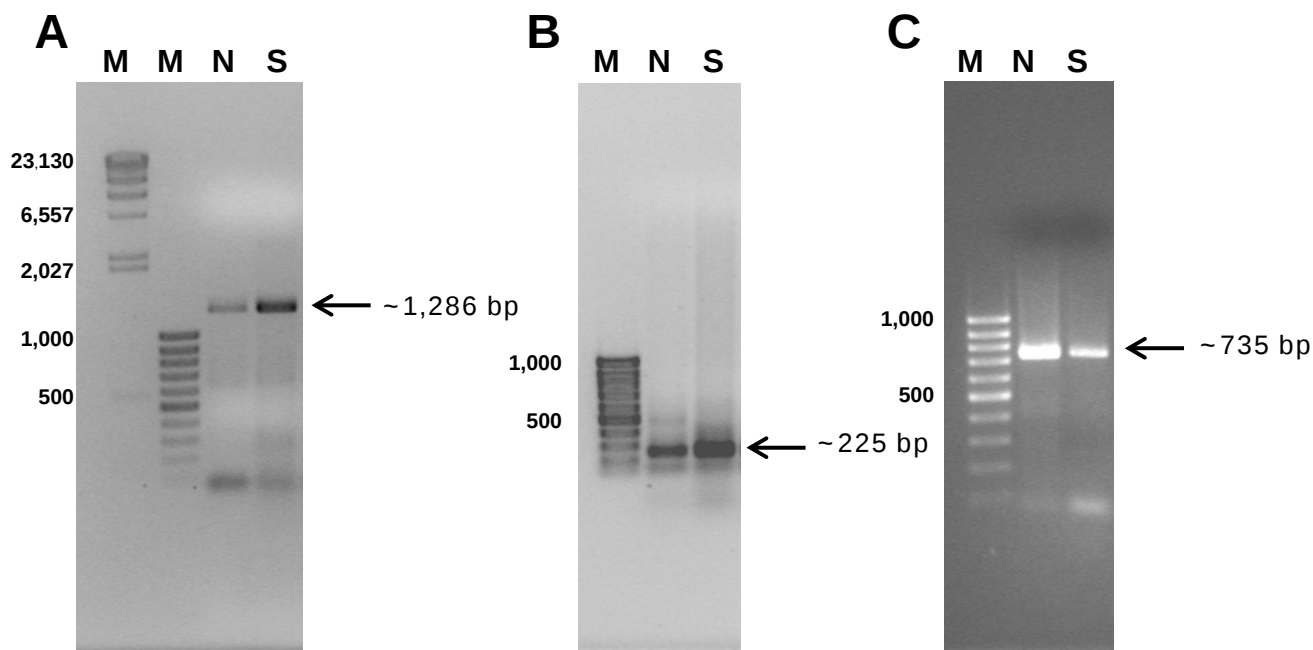
จากนั้น จึงได้นำแมงป่องชนิดต่าง ๆ มาสกัดดีเอ็นเอ (รูปที่ 4.1.7) จากนั้นนำไปทำ PCR โดยใช้ primer (ตารางที่ 4.1.3) ได้ PCR product (รูปที่ 4.1.8) แล้วส่งไปหา sequence ด้วยเครื่อง automated sequencer ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ทั้ง PCR และการ sequence ต้องทำ 3 รอบของแต่ละคู่ของ primer) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกันแล้วระหว่างโปรตีน HS-1 (Uawonggul และคณะ, 2007) กับ HS-2 ในพิษแมงป่องช้างจากภาคเหนือ และ HS-3 ในพิษแมงป่องช้างจากภาคใต้ของประเทศไทย (รูปที่ 4.1.9 และตารางที่ 4.1.4 สำหรับลำดับด้าน 5' และปลาย N และ รูปที่ 4.1.10 และตารางที่ 4.1.5 สำหรับลำดับด้าน 3' และปลาย C) พบว่ามีความคล้ายกันเกินร้อยละ 80 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มเส้นของทั้งสามตัวด้วยโปรแกรม CustalW (รูปที่ 4.1.11) พบว่า มีความเหมือนกันเกิน 90% บริเวณที่ต่างอย่างเด่นชัดคือบริเวณ intron เมื่อนำเอาเฉพาะส่วนที่เป็น exon มาเปรียบเทียบกัน พบว่าเหมือนกันถึง 98% (รูปที่ 4.1.12A) และเมื่อ deduce เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีความเหมือนกัน 100% (รูปที่ 4.1.12B) แสดงว่า แมงป่องช้างทั้งสามชนิดมีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการมาก หรือไม่มีวิวัฒนาการต่างจนกระทั่ง 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 สูงกับโมเลกุลในกลุ่ม Scorpine (รูปที่ 4.1.14) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ HS-1, HS-2 และ HS-3 ไปสร้างโครงสร้างสามมิติ ด้วย DeepView Swiss-PdbViewer (รูปที่ 4.1.15) พบว่า domain ที่ประกอบขึ้นจากลำดับกรดอะมิโน ลำดับที่ 54 ถึง 89 ให้โครงสร้างเป็น helix ซึ่งบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ 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	TCTTCCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGCGGATGGATTAGTAAGTAAAAATTTTTATT	170
HS-2	TCTTCCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGCGGATGGATTAGTAAGTACAGTTTTTATT	169
HS-3	TCTTCCTCGGACTCGTAGCGATTGCCTCTTGCGGATGGATTAGTAAGT--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

ที

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	GGACTCGTAGCGATTGCCTCTTCGGATGGATTAGTAAGTAAATTTTATGTTATTGATGAGCCTTCCGAGAGTTTCGGCATGAAAAGTGCTCAGTTTATGAACATTCAACCACCAAGTTAGAGTACTTGAACA	280
HS-2	*****	277
HS-3	*****	279
HS-1	ACTGCTCATATACTGAACGAAGCCAGATATTAGACACTATTGGTGAGTTCGATAGCGAAACTGCATGCGGTAGCATGAAACGAATAAGGTAATGTTATACAGTCGATATAATTACGTATCGAATCTGAGGCTCT	420
HS-2	*****	417
HS-3	*****	419
HS-1	AATATAAGCCAGTCGATTTCCGTAGCAGTCAGGCGATACCGCCTAATAGTCACACGGATTCTGTGATTAAATAATAGAGCACCATAAACCAATTATCCTCCATTGAAAATGAATTTATTAAATGTCACAATCTAGCGAC	560
HS-2	*****	557
HS-3	*****	559
HS-1	TAGTCTATTATCTTCATCTAAAAAGTTTCATGAACAGGATTGATTACTATTGTTACGTAATAATATATACTTCGGGATGATCGTTACGTAATCATAACGTTAATGAGGATTGTGGTATATATTTTTTCTGAAACTTGA	700
HS-2	*****	697
HS-3	*****	699
HS-1	TTACAGCCAGTGAAGTTCCGAATTTAATATATTTGAAACTTCCTTAC-----TTTTTATATCAGCAGATTATGTATAGTGAATTCGCTTCTGCTCCAGAGTCGAATTTAAATAGACTGCTCTCCGCTCTTAAGGAG	839
HS-2	*****	836
HS-3	*****	838
HS-1	TTAATGGTAGCAATCAGTCCGCCATTTTACCGCAGCAACTCTAGTACTATTCTGGAACGTTTGGCTTTTGTGAATTAACTCTGTGCACCTTAAATTTGCAAAATTTCAAAGATCTTACAAAAAGAGAAAT	978
HS-2	*****	968
HS-3	*****	976
HS-1	GGAATGACCGCGGAGCATAAACAAGAAATTTCTTAAGGAATATACGAGCCATGCCCGGCGATATTTGATAAACGGGTTACAAAAAAGAGAGCTACTTATCGATTATTACTTTTA-----AAATAACCA	1111
HS-2	*****	1101
HS-3	*****	1114
HS-1	ACTTCCATTTCAAGTTGTCCTCGCTCTCCGGGACTTCTCTTTACGAGTCTTTACGCTGGGTTCCCTGCTATTATAGGCTATTTTATAGTCTAACAAACACCGAGTTAACTAATGTTTCTCTTTCCAGATGAA	1249
HS-2	*****	1241
HS-3	*****	1253
HS-1	GAGAAGATACAAAGAAATTTGACGAAAAATAGGAATAATATCTCGAGGGATGGCTAAGCCGCTGCTCCACAACTGCGCAAGGCGAATTCATGCGTGGCAATATTGATACGATGGAAATTCGGAACCA	1389
HS-2	*****	1381
HS-3	*****	1393
HS-1	CTGCCAAAAACGTCAGGTGAAAAGGATTCTGCCACGGTACCAAATGCAAGTGTGGAAAACATTATCTACTAA	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
*****

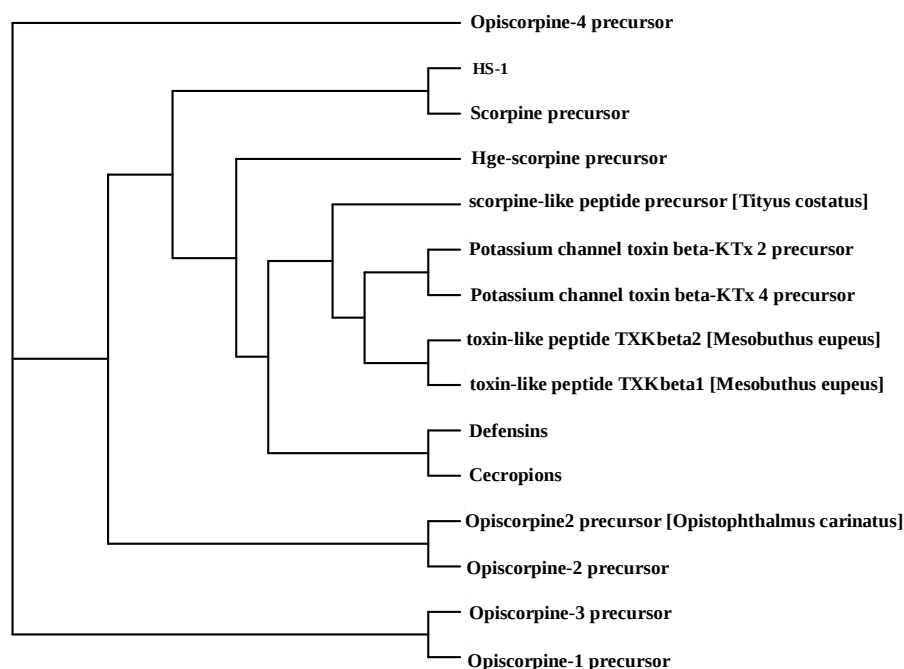
HS-1 NIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGTKCKCGKPLSY 100%
HS-2 NIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGTKCKCGKPLSY 100%
HS-3 NIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGTKCKCGKPLSY 100%
*****

```

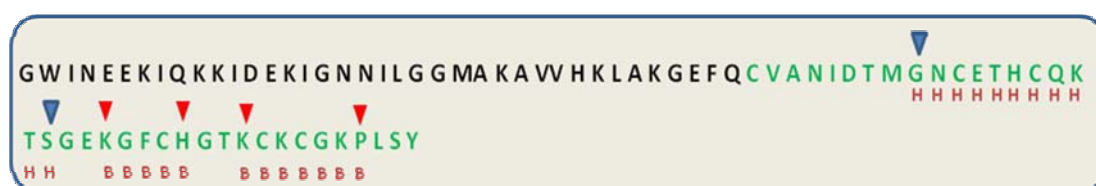
รูปที่ 4.1.12 (A) ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน exon ของยีน HS-1, HS-2 และ HS-3 และ (B) ผลการ deduce และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HS-1, HS-2 และ HS-3 ด้วยโปรแกรม ClustalW เครื่องหมาย * แสดงหน่วยที่เหมือนกัน

	10	20	30	40	50	60	70	80	90			
HS-1	1	MNSKLTALIF	LGLVAIASCG	WINEEKIQKK	IDEKIGNNLI	GGMAKAVVHK	LAKGEFQCV	NIDTMGNCE	HCQKTSGEK	-GFCHG-TKCK	CGKPLSY--	
PANTM Scorpine	1	MNSKLTALIF	LGLIAIAYCG	WINEEKIQKK	IDERMGNVTL	GGMAKAIVHK	MAKNEFQCV	NMDMLGNCE	HCQ-TSGEK	-GYCHG-TKCK	CGTPLSY--	
Opiscorpine2 p	1	MNNKLTALIF	LGLLAIASCK	WLNEKSIQNK	IDEKI~GKNE	LGGMAKAVVHK	KLAKNEFMCMA	ANNDPTGSC	THCQKASGEK	-GYCHG-TKCK	KCGVPLSY--	
SCR2 OPICA Opiscor	1	MNNKLTALIF	HGLLAIASCK	WLNEKSIQNK	IDEKIGKNFL	GGMAKAVVHK	LAKNEFMCMA	NMDPTGSCET	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	VKYAVPVGTL	RTIIQTVVHK	LCKTQFCCPA	---	YQGYCDD	HCQDIKKEE	-GFCHG-FKCK	CGIPMGF--
toxin-like peptide	1	MQRNLVLLF	LGMVALSSCG	-FREKHVQRF	VKYAVPESTL	RTVLIQTVVHK	VGKTQFCCPA	---	YQGYCDD	HCQDIEKKE	-GFCHG-FKCK	CGIPMGF--
toxin-like pep	1	MQRNLVLLF	LGMVALSSCG	-FREKHVQRF	VKYAVPESTL	RTVLIQTVVHK	VGKTQFCCSA	---	YQGYCDD	HCQDIEKKE	-GFCHG-FKCK	CGIPMGF--
scorpine-like	1	MERKLAPLIF	LGMVTLASCG	-LREKHVQKL	VA-LIPNDQL	RSILKAVVHK	VAKTQFCCPA	---	YEGYQNN	HCQDIERKD	-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 ด้วยอักษรสีเหลืองแสดงกรดอะมิโนชนิด cysteine



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



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 นั้นแตกต่างจาก opiscorpine แต่กลับใกล้เคียงกับ toxin ของแมงป่องในกลุ่ม *Isometrus* มากกว่า ส่วน 3' splice site ใกล้เคียงกับ BmTXKS2 จากแมงป่อง *Buthus martensii* Karsch มาก ความสำคัญของลำดับ intron ที่เปลี่ยนไปนี้จำเป็นต้องได้รับการศึกษาต่อไป



B

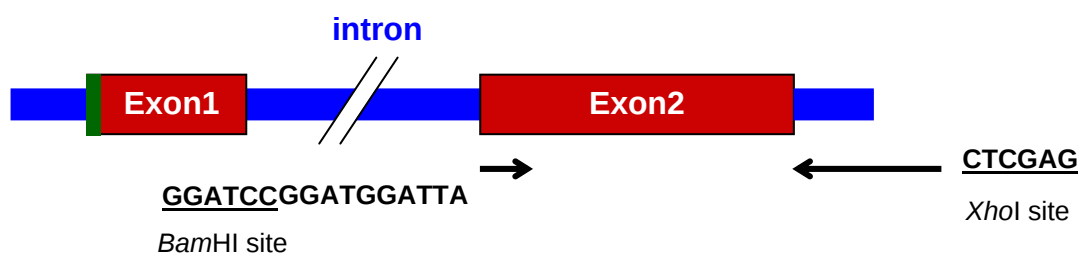
Gene	5'splice	Branch site	3'splice
HS-1	gtaagtaaaa	ctttaat	ctctttccag
HS-2	gtaagtaaaa	ttttaat	ctccttccag
HS-3	gtaagtacag	ttttaat	ctctttccag
Opiscorpine	ggaagtagtc	gtatt	ttctttccag
KTX2	gtaattacga	cattaat	aatattttag
BmTXKS2	gtaagttaat	ctttaat	ttaaatttag
Consensus	gtaagtnnnn	ynttaat	nnnatttttag

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*)

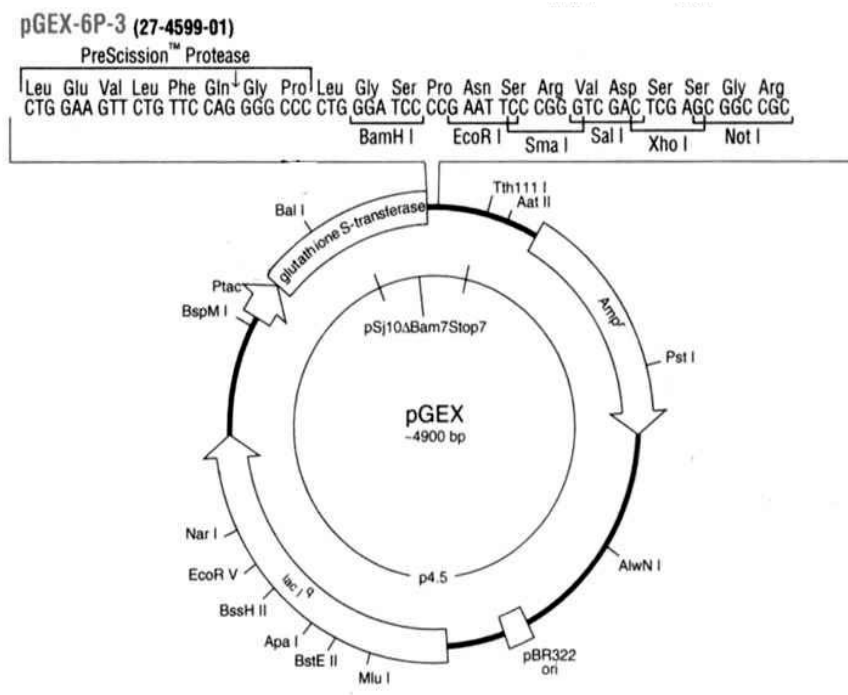
4.1.4 การสร้างยีน *recombinant Heteroscorpine-1 (rechS-1)* และการผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน *recombinant HS-1 (rechS-1)*

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



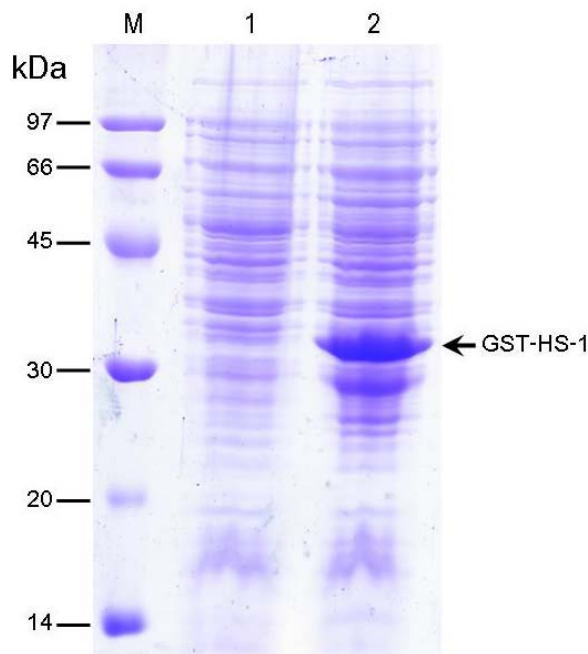
รูปที่ 4.1.17 Primer สำหรับยีน *HS-1* (ไม่มี leading sequence)



รูปที่ 4.1.18 pGEX expression vector จะเห็นตำแหน่งแทรกชิ้นยีน *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 rec*HS-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)

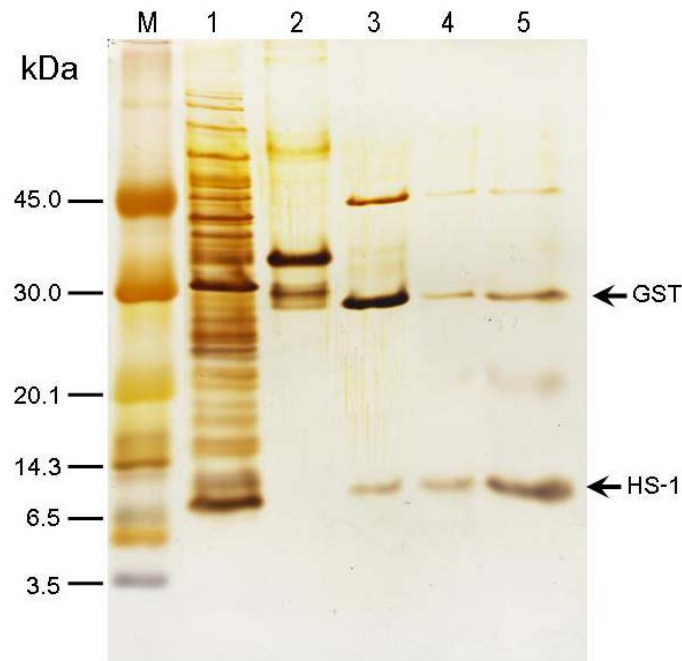
4.1.4.3 การทำ refold ของโปรตีน recHS-1

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)



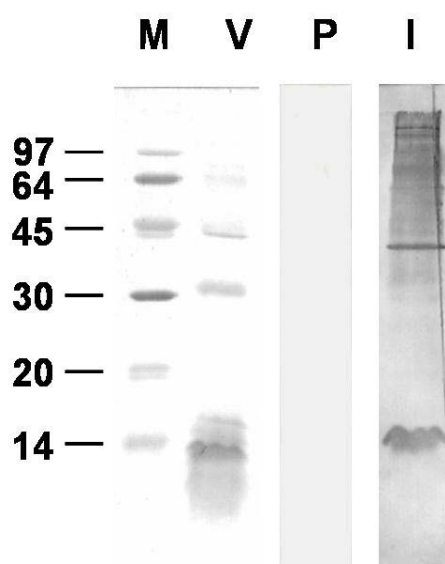
รูปที่ 4.1.20 ผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีน recGST-HS-1 และตรวจสอบด้วย 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE (M คือ marker, lane 1 คือ supernatant ก่อนตัดด้วยเอนไซม์, 2 คือ bead ก่อนตัดด้วยเอนไซม์, 3 คือ bead หลังตัดด้วยเอนไซม์, 4 คือ supernatant หลังตัดด้วยเอนไซม์ และ 5 คือ refolded HS-1)

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

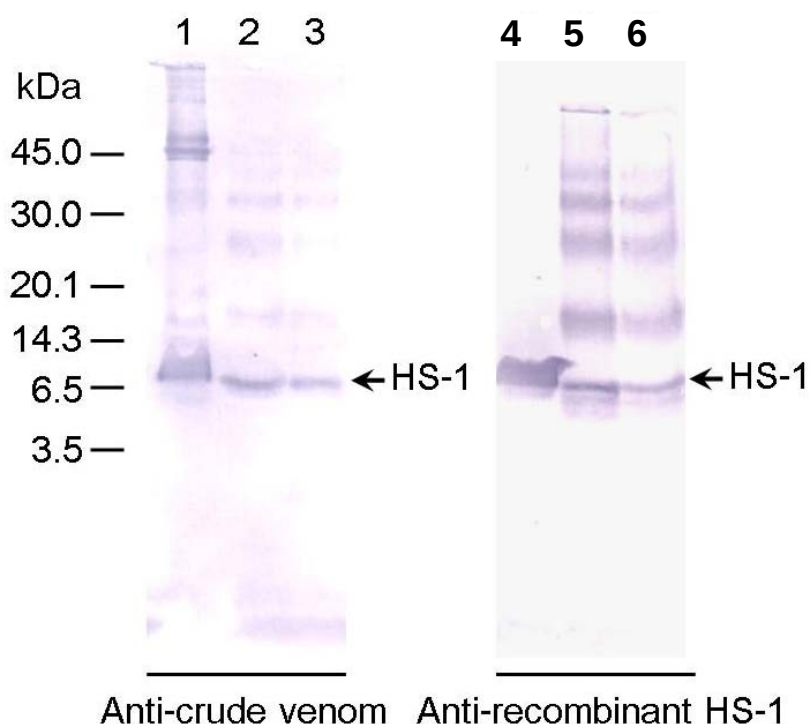
เมื่อนำ anti-recHS-1 antibody มาตรวจฤทธิ์ต้านพิษของแมงป่องช้างในจิ้งหรีด (ตารางที่ 4.1.8) พบว่า แอนติบอดีสามารถต้านฤทธิ์ของแมงป่องช้าง โดยสามารถเพิ่มค่า paralyzed dose 50 (PD₅₀) และเมื่อใช้สัดส่วนของน้ำพิษต่อซีรัมเท่ากัน anti-crude venom antibody สามารถลดความเป็นพิษของน้ำพิษของแมงป่องช้างได้ดีกว่า anti-recHS-1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

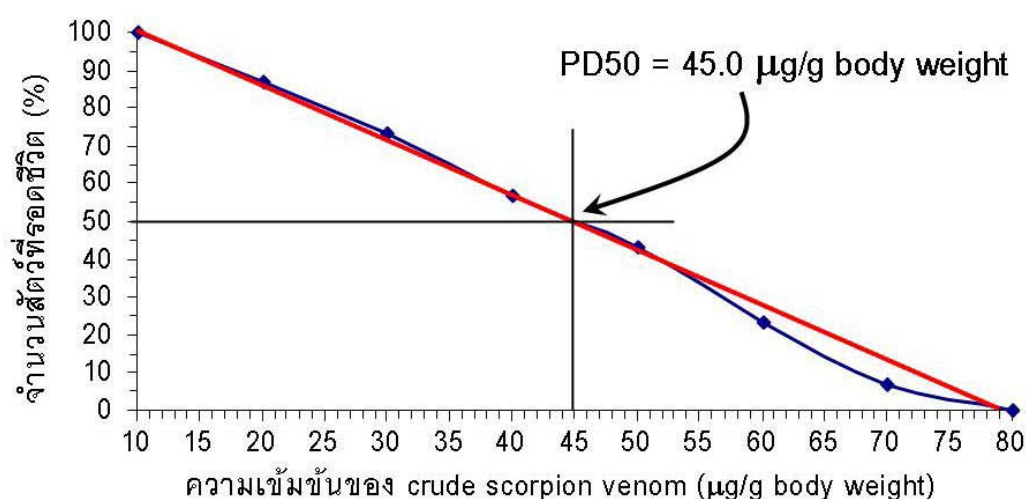
เพื่อเป็นการตรวจสอบโครงสร้างเบื้องต้นของโปรตีน recHS-1 ว่าน่าจะยังคล้าย native protein หรือไม่ จึงได้นำโปรตีน recHS-1 และ refolded HS-1 มาแยกด้วย SDS-PAGE จากนั้นทำ Western immunoblotting กับ anti-crude scorpion venom antibody และ anti-HS-1 antibody ที่ค่าการเจือจาง 1:100 จะเห็นได้ว่า anti-crude scorpion 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 พบว่าได้ค่า PD₅₀ ของ crude scorpion venom ในหนอนนกเท่ากับ 45.0 $\mu\text{g}/\text{กรัม น้ำหนักตัว 1 กรัม}$ (รูปที่ 4.1.23) ส่วนค่า PD₅₀ ของ recHS-1 และ refolded HS-1 ได้ค่ามากกว่า 150.0 และเท่ากับ 51.5 $\mu\text{g}/\text{กรัม น้ำหนักตัว 1 กรัม}$ 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 ($\mu\text{g}/\text{กรัม น้ำหนักตัว 1 กรัม}$)
crude scorpion venom	45.0
recHS-1	>150.0
refolded recHS-1	51.5

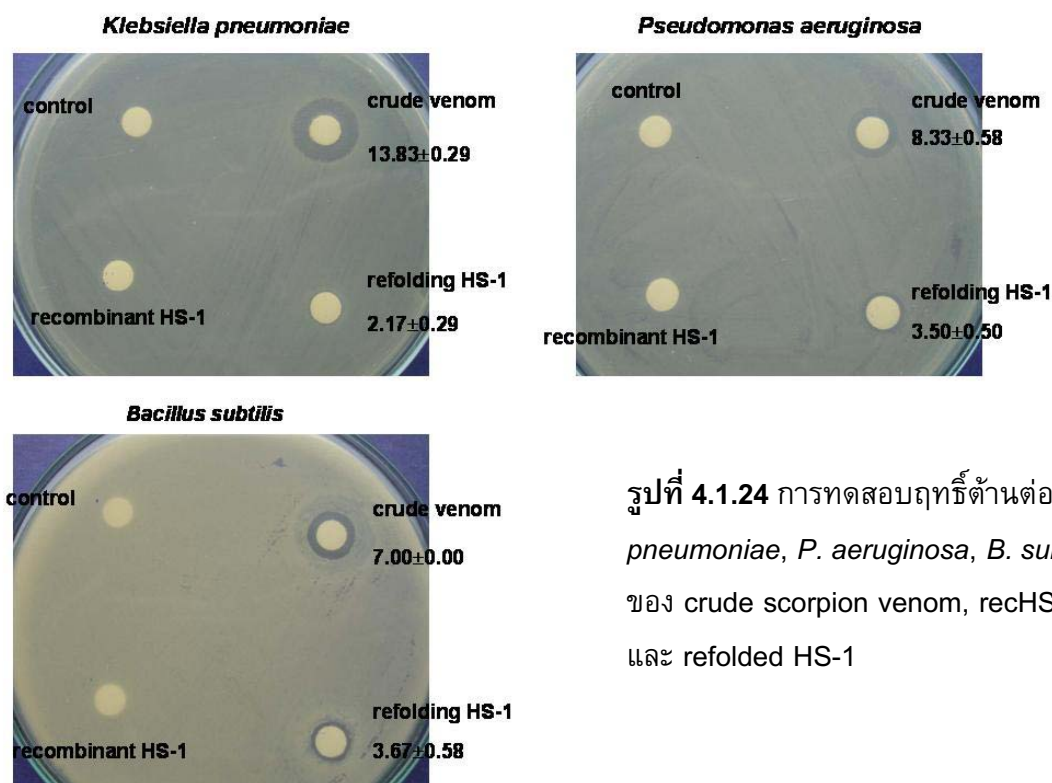
ตารางที่ 4.1.10 ค่า PD₅₀ ของ crude scorpion venom, recHS-1 และ refolded HS-1 ในจังหวัด

	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*

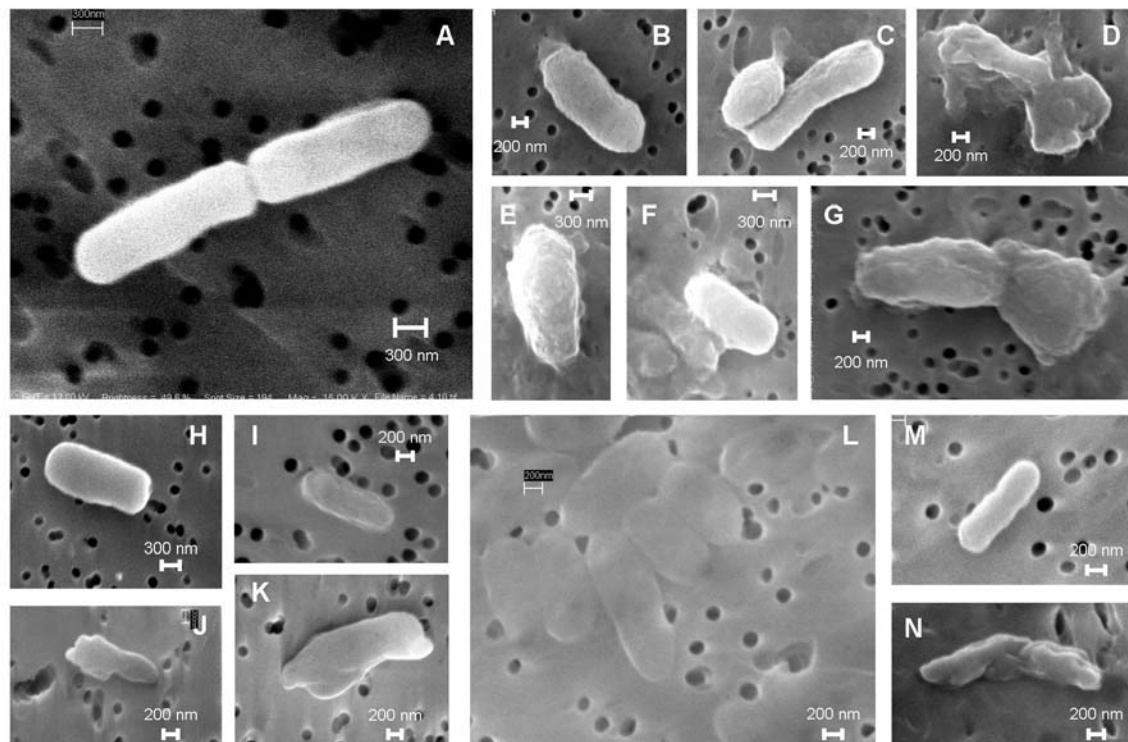
ต่อมาได้ทำการตรวจรูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 4.1.25) พบว่า *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* ตอบสนองต่อ refolding HS-1 โดยมีรูปร่างบิดเบี้ยวไปจากปกติ คล้ายกับที่เกิดจากการใช้ crude venom



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

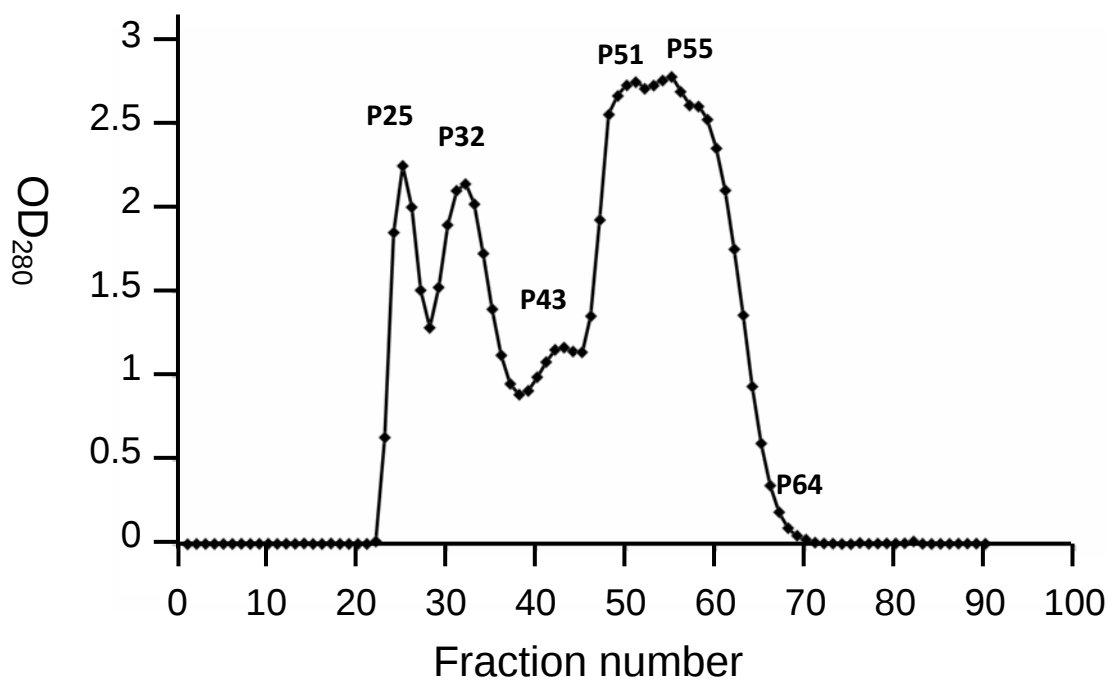


รูปที่ 4.1.25 รูปถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเชื้อ *Bacillus subtilis* (A-G), *Klebsiella pneumoniae* (H-K) และ *Pseudomonas aeruginosa* (L-N) เมื่อไม่ได้รับสารใด ๆ (A, H และ L) หรือได้รับน้ำพิษแมงป่องช้าง (*H. laoticus*) (B-D, I และ M) หรือได้รับ refolding HS-1 (E-G, J-K และ N) จากการทดสอบด้วย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

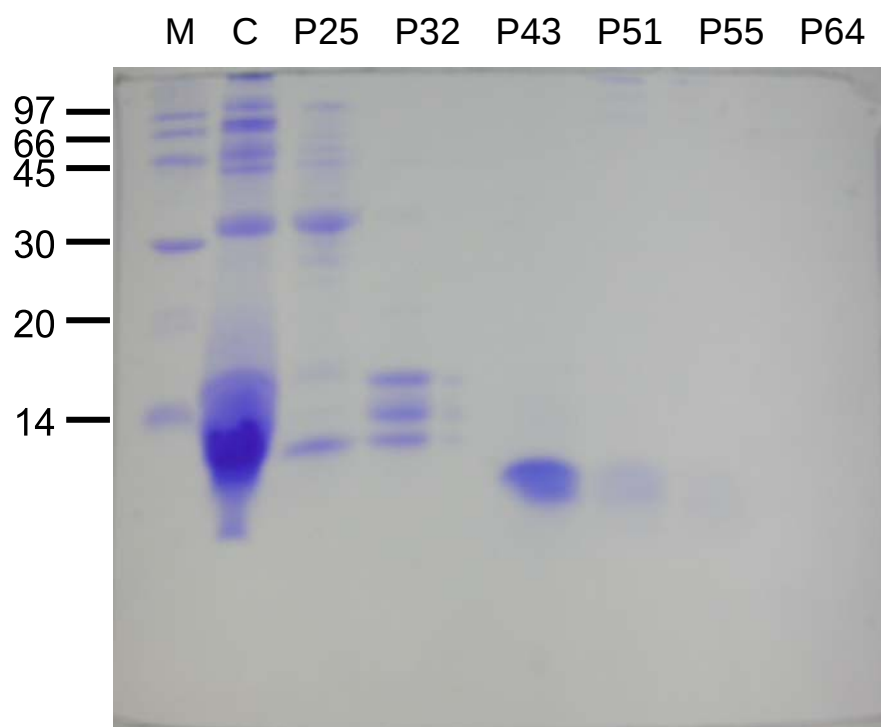
4.1.5 การทำบริสุทธิ์, หาลำดับกรดอะมิโน, ตรวจสอบสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีน Heteromtoxin (HmTx) ในน้ำพิษแมงป่องช้าง

4.1.5.1 การทำบริสุทธิ์โปรตีน Heteromtoxin (HmTx)

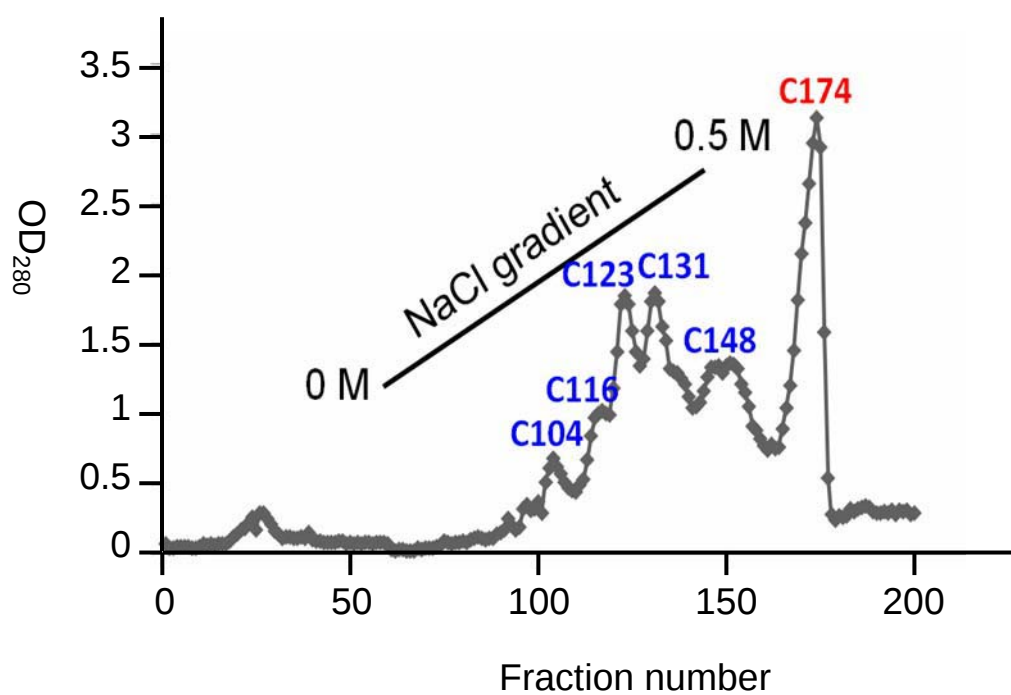
การทำบริสุทธิ์ HmTx เริ่มด้วยदनำน้ำพิษแมงป่องช้างมาผ่าน Sephadex G50 gel filtration column chromatography โดยนำพิษแมงป่อง 50 มิลลิกรัม มา load บน column จากนั้นล้าง แล้ว equilibrate และ elute ด้วย 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 (รูปที่ 4.1.26) วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 4.1.27) 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



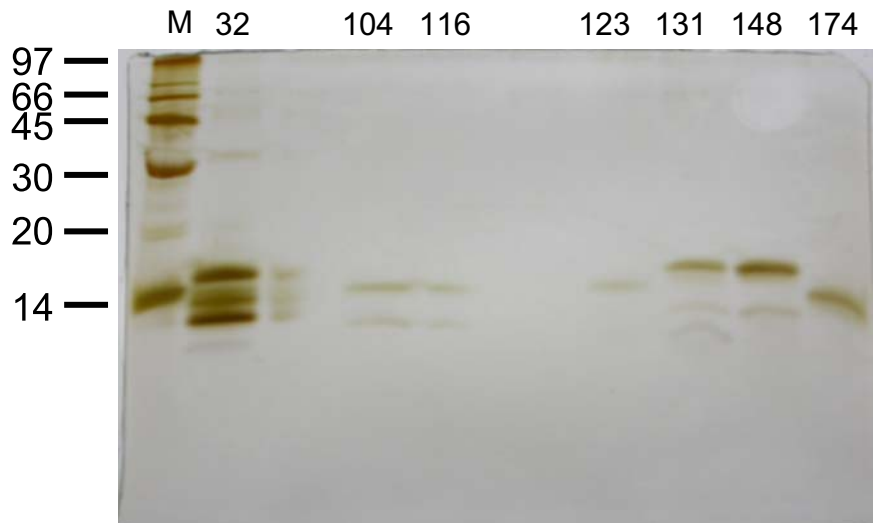
รูปที่ 4.1.26 Chromatogram ของการแยกบริสุทธิ์น้ำพิษแมงป่องช้าง ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-50 gel filtration chromatography



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)



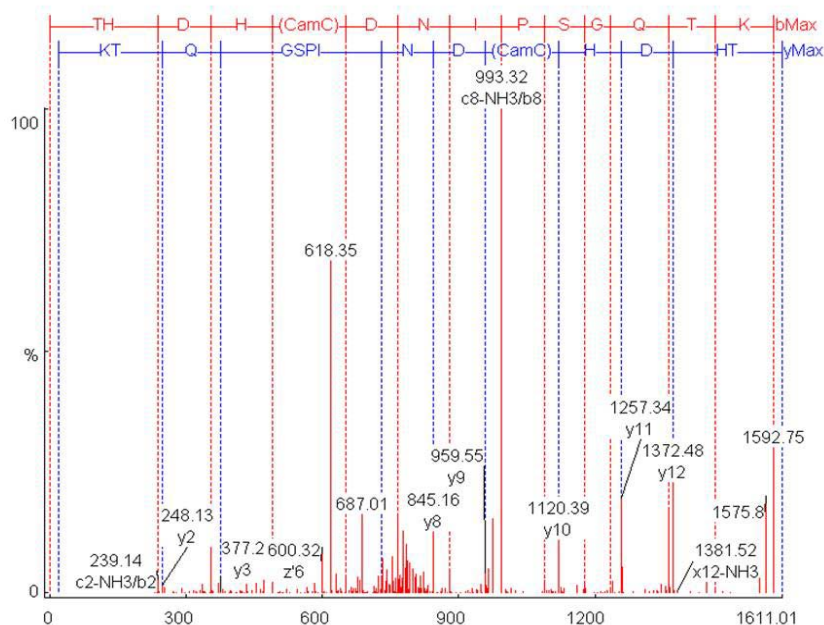
รูปที่ 4.1.28 Elution profile จาก CM Toyopearl cationic column chromatography ภายหลังจาก fraction 28-37 จาก gel filtration มา load แล้ว elute ด้วย 0-0.5 M NaCl gradient



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

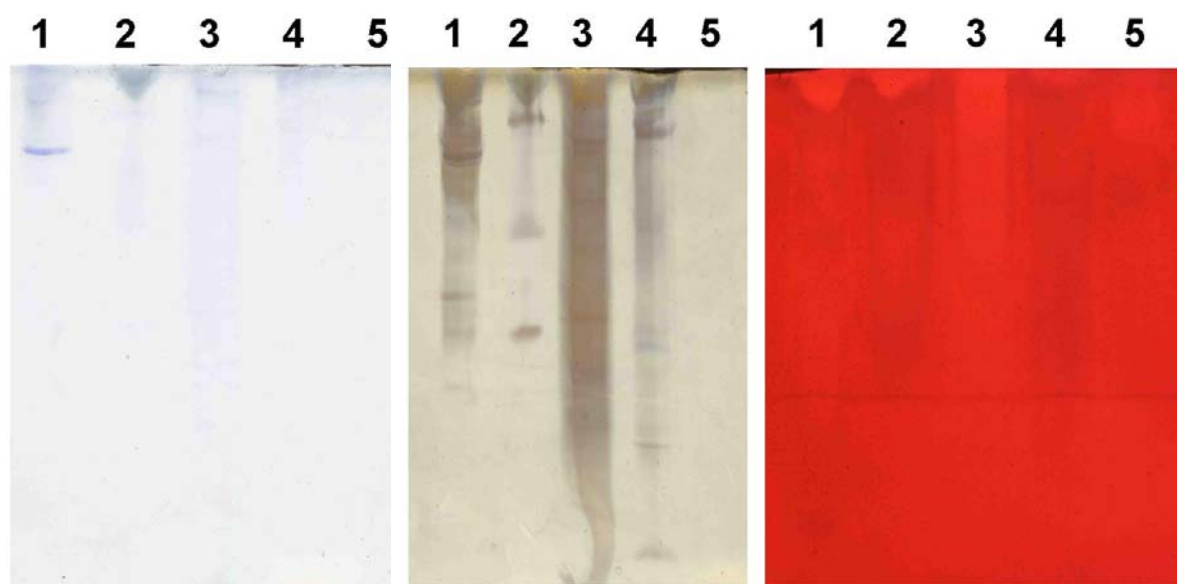
ตารางที่ 4.1.12 ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนด้วย LC-MS/MS และวิธี De novo ของโปรตีน fraction 174 จาก CM Toyopearl 650M cationic column chromatogram

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 จนกระทั่งพื้นหลังใสหรือไม่เจลก้จะถูกบ่มกับ 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



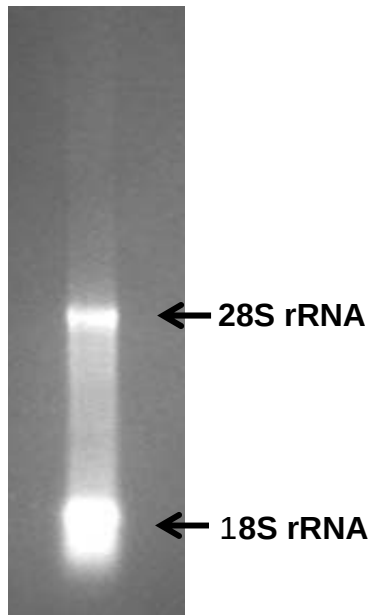
รูปที่ 4.1.31 การทดสอบ Phospholipase activity ของ HmTx ซึ่ง lane 1 คือ น้ำพิษของงูจงอาง (*O. hannah*) 5 µg, lane 2: งูเห่า (*N. n. siamensis*), 5 µg, lane 3: ต่อหลุม (*V. tropica*) 5 µg, lane 4: แมงป่องช้าง (*H. laoticus*) 5 µg, lane 5: HmTx, รูปซ้าย วิเคราะห์บน 15% Native PAGE 25 mA ที่ 4°C แล้วย้อมด้วย 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
 HIF2
 CGAAGGGAGGTGTGAACGCATGGGGGAAGCAGACGAGACTATGTGGGGAACCAAATGGT
 GTGGAAGCGGAAACGAGGCTACAGATATTTGAGAACTTGGTTACTGGAGTAATTTAGATT
 HIF3
 CGTGTTGTAGGACCCACGACCATTGTGACAATATTCCATCAGGGCAAATAAATATGGTC
 TGACGAATGAAGGAAAATACACAATGATGAACTGCAAATGCGAGACGGCATTGGAACAAT
 HIR3
 GTCTGAGAAACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCTGCTGGCTTTGTTAGAAAACTT
 HIR2
 ATTTTGACTTATATGGGAATGGGTGCTACAACGTGCAATGTCCCTCTCAGAGAAGATTGG
 CAAGAAGTGAAGAGTGTCTGATGGTGTGGCAACGTATACAGGAGAAGCTGGGTATGGT
 HIR1
 GCATGGGCGATTAAACAACTGAATGGTTAA

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' GGTCTTCCATACCTCCAGT 3'	20 base	55	57	

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

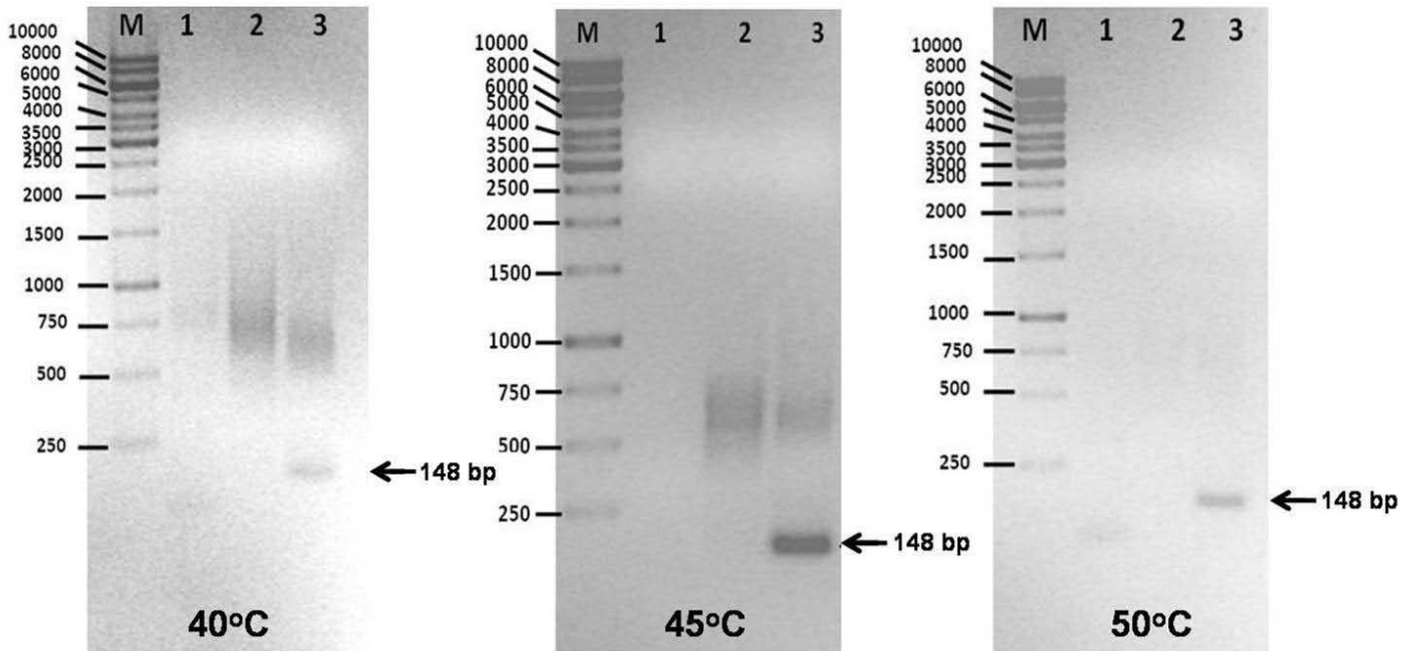
4.1.5.6 การหาลำดับกรดอะมิโนเต็มเส้นของ HmTx ด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

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%

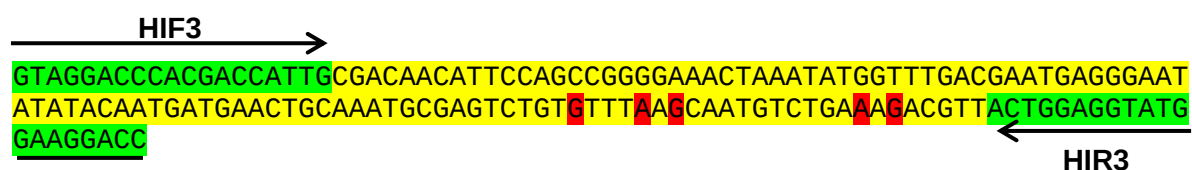
จากนั้น ทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าได้ 167 ลำดับ (รูปที่ 4.1.44) เมื่อเปรียบเทียบกับ imperotoxin I และ toxin จาก *Mesobuthus tamulus* (รูปที่ 4.1.45) พบความเหมือนประมาณร้อยละ 80

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

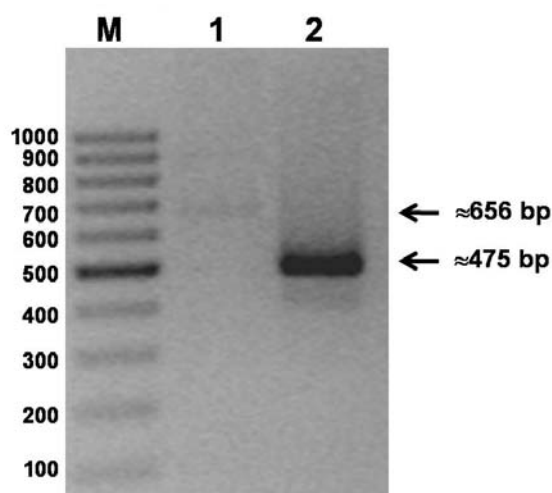
SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 ImperatoxinI	504	2 Heteromtoxin	148	88

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

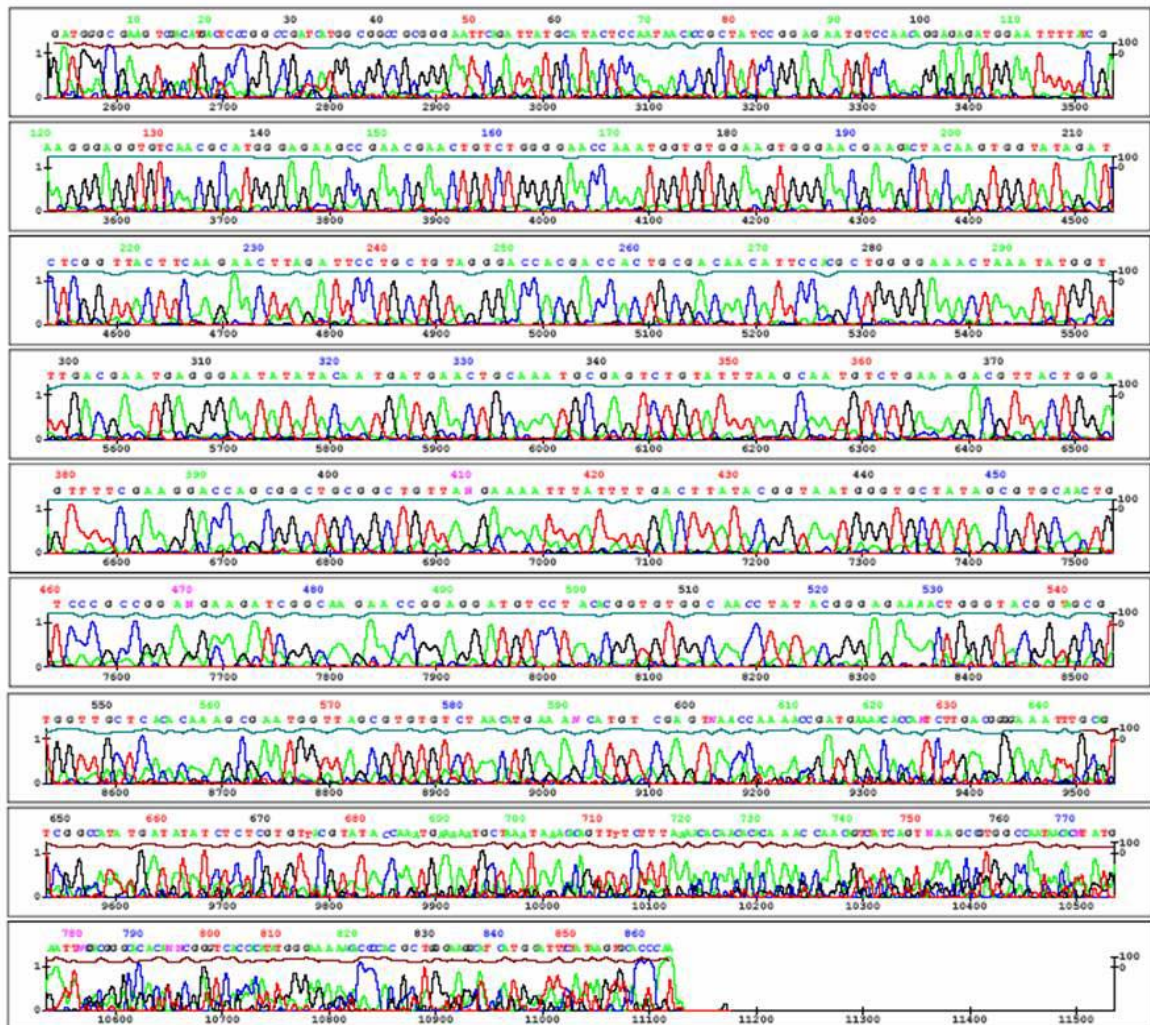
ImperatoxinI	AATGAAGGAAAATACACAATGATGAACTGCAATGCGAGACGGCATTGTAACAATGTCTG	300
Heteromtoxin	AATGAGGGAATATATACAATGATGAACTGCAATGCGAGTCTGTGTTTAAGCAATGTCTG	119

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)



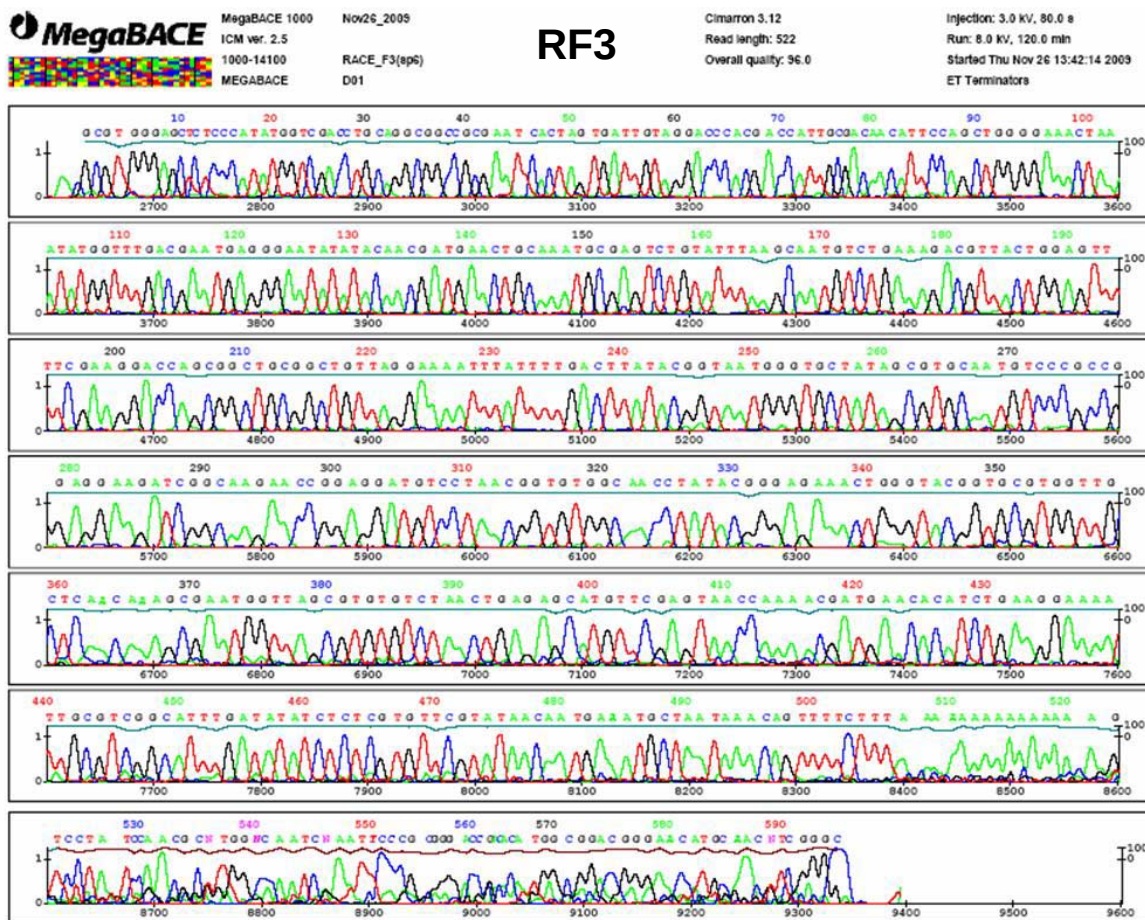
รูปที่ 4.1.37 แสดง 3' RACE product ใน lane ที่ 1 ใช้ primer F1 คู่กับ AUAP และ ใน lane ที่ 2 ใช้ primer F3 คู่กับ AUAP



HIF1

ATGCATACTCCAATAACACCGCTATCCGGAGAATGTCCAACAGGAGAGATGGAATTTTATCGAAGGGAGGTGT
 CAACGCATGGGAGAAGCCGAACGAAGTGTCTGGGAACCAAATGGTGTGGAAGTGGGAACGAAGACTACAAGT
 GGTATAGATCTCGTTACTTCAAGAACTTAGATTCTGTGTAGGGACCACGACCACTGCGACAACATTCCAC
 GCTGGGAACTAAATATGTTTACGAATGAGGGAATATACAATGATGAAGTGCAAATGCGAGTCTGTAT
 TTAAGCAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGTTTTTGAAGGACGAGCGGCTGCGGCTGTTANGAAAAATTTATTT
 TGACTTATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAACTGTCCGCGCGGANGAAGATCGGCAAGAACCGGAGGATG
 TCCTACACGGTGTGGCAACCTATACGGGAGAAAACCTGGGTACGGTAGCGTGGTTGCTCACACAAAGCGAATGG
 TTAGCGTGTGTCTAATCATGAAANCATGTGCGAGTNAACCAAAACCGATGAAAACACCANTCTTGACGGGGAAAT
 TTGAGTCGGCCATATGATATATCTCTCGTGTTACGTATACCAATGAAAAATGCTAAATAAACACAGTTTTTC
 TTTAAACACAAACACACAAACCAACAGTCTATCAGTNAAGCCGTGGCCAATAACACNTATGAATTNCGACGGG
 CACACANNCGGGTCACCACATATGGGAAAAACACCCACGCTGGGAAGGCATCATGGATTTCTATAAGTGCAC
 CCAA

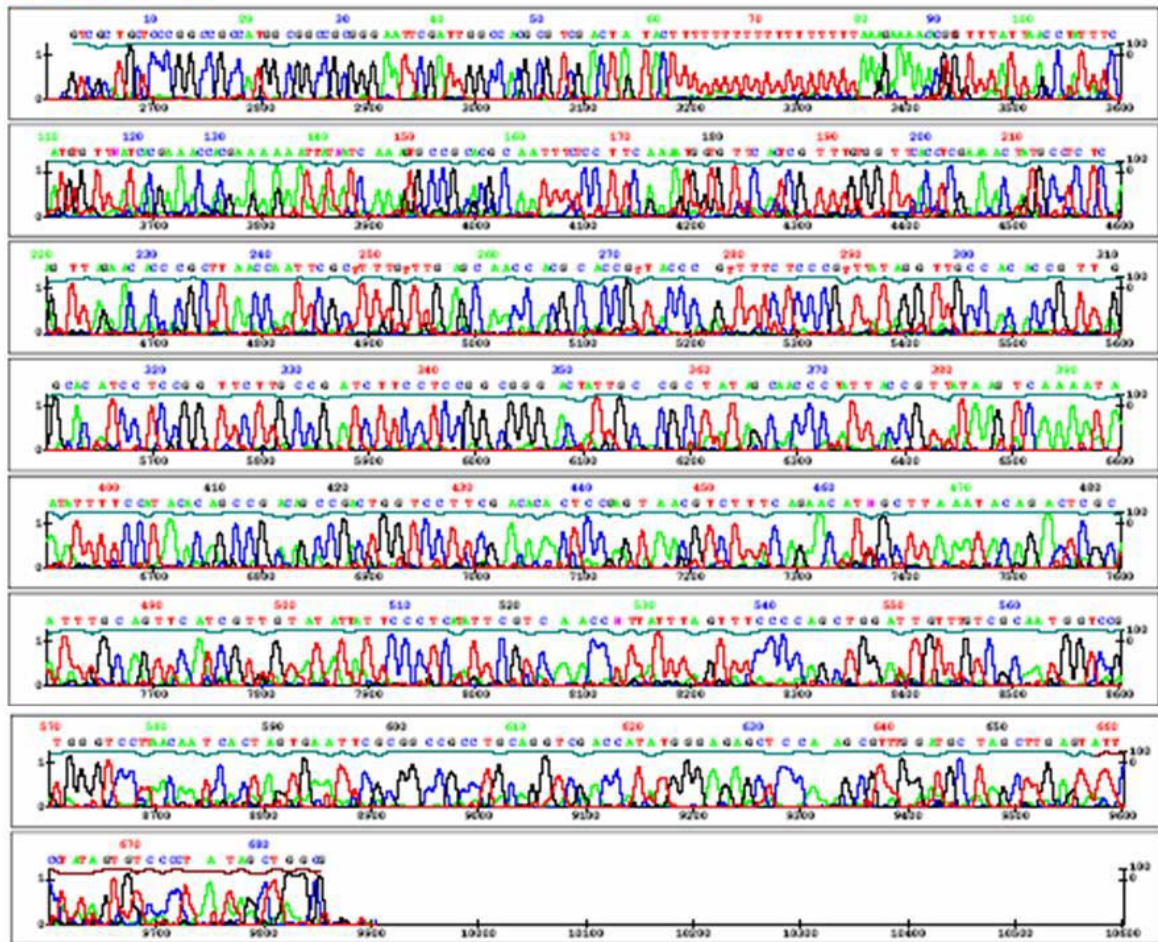
รูปที่ 4.1.38 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Heteromtoxin (HmTx) ของ 3' RACE product ขนาดราว 656 bp โดยใช้ mRNA จากต่อมพิษของ *H. laoticus* เป็นแม่แบบ และใช้ primer HIF1 กับ AUAP
 ลูกศรแสดงตำแหน่งจับของ primer HIF1



>> RF3

GTAGGACCCACGACCATTGCGACAACATTCCAGCTGGGGAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATA
 TACAACGATGAACTGCAAATGCGAGTCTGTATTTAAGCAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGTTTTTCGAAGGA
 CCAGCGGCTGCGGCTGTTAGGAAAAATTTATTTTGAATTATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCG
 CCGGAGGAAGATCGGCAAGAACC GGAGGATGTCCTAACGGTGTGGCAACCTATACGGGAGAAAACCTGGGTACGG
 TGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAGCGTGTGTCTAACTGAGAGCATGTTTCGAGTAACCAAAACGATG
 AACACATCTGAAGGAAAATTGCGTCGGCATTTGATATATCTCTCGTGTTTCGTATAACAATGAAATGCTAATAA
 ACAGTTTTCTTTAAAAAAGTCCCTATCCAACGCNTGGNCAATCNAATTCCCGCGGGACCGACACA
 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
TTTGTGGTTACCTCGAAAACTATGCCTCTCAGTTAGAACACCCGCTTAACCAATTCGCTTTTGTGTTGAGCAA
CCACGCACCGTTACCCGTTTTCTCCCGTTTATAGGTTGCCACACCGTTGGCACATCCTCCGTTCTTGCCGAT
CTTCTCCGGCGGGACTATTGCCGCTATAGCAACCTATTACCGTTATAAGTCAAAAATAATATTTTCCATACA
CAGCCGACAGCCGACTGGTCTTCGACACACTCCGAGTAACGTCTTTCAGAACATNGCTTAAATACAGACTCG
CATTTGCAGTTTCATCGTTGTATATTATTTCCCTCATATTCGTCAACNTTATTTAGTTTCCCAAGCTGGATTGT
TTGTCGAATGGTCCGTGGGTCTTAACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGA
GAGCTCCAAGCGTTTGGATGCTAGCTTGAGTATTCCTATAGTGTCCTTATAGCTGGCG

>> FF3 (reverse)

CGCCAGCTATAGGGGACACTATAGGAATACTCAAGCTAGCATCCAAACGCTTGGAGCTCTCCCATATGGTCGA
CCTGCAGGCGGCCGGAATCACTAGTGATTGTTAAGGACCCACGGACCATTCGCACAAACAATCCAGCTGGGG
AACTAAATAANGTTGACGAATATGAGGGAATAATATACAACGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAA
GCNATGTTCTGAAAGACGTTACTCGGAGTGTGTGCAAGGACCACTCGGCTGTCGGCTGTGTATGGAAAAATATT
ATTTTGACTTATAACGTAATAGGGTTGCTATAGCGGCAATAGTCCCGCCGGAGGAAGATCGCAAGAACCGG
AGGATGTGCAACGGTGTGGCAACCTATAACGGGAGAAAACGGGTAACGGTGCCTGGTGTCTCAAAACAAAAG
CGAATTGGTTAAGCGGGTGTCTAACTGAGAGGCATAGTTTTTCGAGGTGAACCACAAACGAGTGAACACCATT
TTGAAGGAGAAATTGCGTGCAGCACTTTGATNATAATTTTTTCGTGGTTTCGTGATNAACACATGAAATAGGT
TAATAAACACGTGTTTTCTTTAAAAAAGTATAGTCGACGCGTGGCC

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      -----TAGGACCCACG-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
CGCATGGGAGAAGCCGAACGAACGTCTGGGGAACCAATGGTGTGGAAGTGGGAACGAAGCTACAAGTGGTA
TAGATCTCGTTACTTCAAGAACTTAGATTCTGCTGTAGGGACCACGACCACTGCGACAACATTCCAGCTGG
GGAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATATACAATGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAAG
CAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGTTTTCGAAGGACCAGCGGCTGCGGCTGTTAGGAAAAATTTATTTTGACT
TATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCGCCGGAAGAAGATCGGCAAGAACCAGGAGGATGTCCTAA
CGGTGTGGCAACCTATACGGGAGAAAACCTGGGTACGGTGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAGCGTGT
GTCTAACTGAAGCATGTCGAGTAACCAAAACCGATGACACCATCTTGACGAAATTTGCAGTCGGCCATATGAT
ATATCTCTCGTGTTACGTATACCAAAATGAAAAATGCTAAATAAACACAGTTTTCTTTAAAAACACAACACAA
ACCAACAGTCTATCAGTGAAGCCTGGCCAATAACACATATGAATTCGACGGGCACACAAGCGGGTCACCACAT
ATGGGAAAAACACCCACGCTGGGAAGGCATCATGGATTTCTATAAGTGCACCCAA

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

GTAGGACCCACGACCATTGCGACAACATTCCAGCTGGGGAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATA
TACAACGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAAGCAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGTTTTCGAAGGA
CCAGCGGCTGCGGCTGTTAGGAAAAATTTATTTTGACTTATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCG
CCGGAGGAAGATCGGCAAGAACCAGGAGGATGTCCTAACGGTGTGGCAACCTATACGGGAGAAAACCTGGGTACGG
TGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAGCGTGTGTCTAACTGAGAGCATGTTGAGTAACCAAAACGATG
AACACATCTGAAGGAAAATTGCGTCGGCATTTGATATATCTCTCGTGTTCTGATAACAATGAAATGCTAATAA
ACAGTTTTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTATAGTCGACGCGTGGCC

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

GTAGGACCCACGACCATTGCGACAACATTCCAGCGGGGAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATA
TACAATGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTGTTAAGCAATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGGTATGGAAGGA
CC

- เมื่อทำการสรุปรวม ได้ Heteromtoxin (HmTx) เต็มเส้นขนาด 648 bp ดังนี้

ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCGGAGAATGTCCAAAGGAGAGATGGAATTTTTCGAAGGGAGGTGTCAAC
GCATGGGAGAAGCAGAACGAACTGTCTGGGGAACCAAAATGGTGTGGAAGTGGAAACGAAGCTACAAGTGGTAT
AGATCTCGGTTACTTTCAAGAACTTAGATTCTGCTGTAGGACCCACGACCATTGTGACAACATTCCAGCTGGG
GAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATATACAATGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAAGC
AATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCGGCTGCGGCTGTTAGAAAAATTTATTTTGACTT
ATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCGCCGGAAGAAGATCGGCAAGAACCAGGAGGATGTCCTAAC
GGTGTGGCAACCTATACGGGAGAAAACCTGGGTACGGTGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAGCGTGTGT
CTAACTGAGAGCATGTTGAGTAACCAAAACGATGAACACATCTGAAGGAAAATTGCGTCGGCATTTGATATA
TCTCTCGTGTTCTGATAACAATGAAATGCTAATAAACAGTTTTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

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

ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCGGAGAATGTCCAAAGGAGAGATGGAATTTTTCGAAGGGAGGTGTCAAC
GCATGGGAGAAGCAGAACGAACTGTCTGGGGAACCAAAATGGTGTGGAAGTGGAAACGAAGCTACAAGTGGTAT
AGATCTCGGTTACTTTCAAGAACTTAGATTCTGCTGTAGGACCCACGACCATTGTGACAACATTCCAGCTGGG
GAACTAAATATGGTTTGACGAATGAGGGAATATATACAATGATGAACTGCAAAATGCGAGTCTGTATTTAAGC
AATGTCTGAAAGACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCGGCTGCGGCTGTTAGAAAAATTTATTTTGACTT
ATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCGCCGGAAGAAGATCGGCAAGAACCAGGAGGATGTCCTAAC
GGTGTGGCAACCTATACGGGAGAAAACCTGGGTACGGTGCGTGGTTGCTCAACAAAGCGAATGGTTAG

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      ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCGGAGAATGTCCAAAGGAGAGATGGAATTTTCGAA 60
M.tamulus ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCGGAGAATGTCCAAAGGAGAGATGGAATTTTCGAA 60
ImperatoxinI ATGCATACTCCAAAACACGCTATCCAGAGAATATCCAAAGAAGAGATGGAATTTCTTCGAA 60
*****

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

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

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

HmTx      AATGAGGGAATATATACAATGATGAAGTGCAAATGCGAGTCTGTATTTAAGCAATGTCTG 300
M.tamulus AATGAGGGAATATATACAATGATGAAGTGCAAATGCGAGTCTGCATTCGAGAAATGTCTG 300
ImperatoxinI AATGAAGGAAATACACAATGATGAAGTGCAAATGCGAGACGGCATTTGAACAATGTCTG 300
*****

HmTx      AAAGACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCGGCTGCGGCTGTTAGAAAAATTTATTTT 360
M.tamulus AGAGACGTGCGTGGAAATTTTGAAGGAAAAGCGGCTGCCGCTGTTAGGAAAATTTATTTT 360
ImperatoxinI AGAAACGTTACTGGAGGTATGGAAGGACCAGCTGCTGGCTTTGTTAGAAAAATTTATTTT 360
*

HmTx      GACTTATACGGTAATGGGTGCTATAGCGTGCAATGTCCCGCCGGAAGAAGATCGGCAAGA 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
MHTPKHAIRRMASKGEMEFFEGRRCQRMGEAERTVWGTKWCGSGNEATSGIDLGYFKNLDSCCRTHDHCNIPAGETKYGLTN
EGIYTMNCKCESVFKQCLKDVTGGMEGPAAAVRKIYFDLYGNGCYSVQCPAGRRSARTGGCPNGVATYTGGETGYGAWLL
NKANG
>M. tamulus
MHTPKHAIRRMASKGEMEFFEGRRCQRMGEAKRTMWGTKWCGSGNEAINYTDLGYFSNLDSCCRTHDHCDSIPAGETKYGLTN
EGKYTMNCKCESAFEKCLRDVIRGILEGKAAAVRKTYFDLYGNGCFNVKCPSGARSARSEECTNGMATYTGGETGYGAWAI
NKLNG
>IpTxi_P. imperator
MHTPKHAIQRISKEEMEFFEGRRCERMGEADETMWGTKWCGSGNEATDISELGYWSNLDSCCRTHDHCNIPSGQTKYGLTN
EGKYTMNCKCETAFEKCLRNVTGGMEGPAAGFVRKTYFDLYGNGCYNVQCPQRSRLARSEECPDGVATYTGGEAGYGAWAI
NKLNG
>HgPLA2
MSLIIVLVISVLSADAVLSMDNELYNLNEPSQRSSWPVARAVRMQFSKRSEGGRESRKMQGCQILESLNDIAREALRTPRH
TTKRISKDEMEFFEGRCLSVGESERTVLGKWKCGAGNEAANYSDLGYNVDRCCREHDHCNIPAGETKYGLKNEGTYTM
MNCKCEKAFDKCLSDISGYFTRKAVSAVKFTYFTLYGNGCYNVKCENGRSPSNECPNGVAEYTGGETGLGAKVINFGK
>H. fulvipes
TMWGKWKWCGSGNKAINYTDLGYFSNLDSCCRTHDHCNIAAGETKYGLTNEGKYTMNCKCEATFQQCLRDVHGPLEGKAA
FTIRKLYFGLYGNCFNVQCPS
>A. Phaiodactylus
MVKRVSKEEMDALERSCSQPFEERFLIVSGTKWCGNNNIAANYSDLGFLKADKCCRHDHCDHIASGETKYGLNKGFLT
ILNCDCEAFDHCLKEISNNVTDIRQKGAENVWFYFQWYNANCYRLYCKDEKSARDEACTNQYAVVKKNFVTQ
>A. mellifera
MQVVLGSLFLLLLSTSHGWQIRDRIGDNELEERIIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMCPDVM SAGESKH
GLTNTASHTRLSCDDCKFYDCLKNSADTISSYFVGKMYFNLIIDTKCYKLEHPVTGCGERTEGRCLHYTVDKSKPKVYQWF
DLRKY
>1POC_A A. mellifera
IIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMCPDVM SAGESKHGLTNTASHTRLSCDDCKFYDCLKNSADTISSY
FVGKMYFNLIIDTKCYKLEHPVTGCGERTEGRCLHYTVDKSKPKVYQWFDLRKY
>A. cerana
IIYPGTLWCGHGNVSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMCPDVM SAGESKHGLTNTASHTRLSCDDTFYDCLKNSGEKISSY
FVGKMYFNLIIDTKCYKLEHPVTGCGERTEGRCLRYTVDKSKPKVYQWFDLRKY
>Bos_taurus
MGVLVLLGVLSFLGRITLGGSPALHWDSTSCHLARPGRPLRSLFSLGKDAQGLALFHAHWDGHGRLQVCSRQDEPDLTA
AYGALCAGEITRGSFIHTPGPELQALATLQSQWEACRGPASPAGTREKRAAGQNGVPGIGRQWVKRGWTVPGTLWCGVG
DSAGNSELGVFGPDLCREHRCPHNVSPFQYNYGIRNYRFHTISHCNCDAFQQCLQDQRDSVDIMGVAFFNVLAIP
CFVLEEQEQACVEWYWWGGCRRYGSVPFARLQPRTFYNASWSSPATSLTPSPQNPALSRPQMHPQWPSEWKEKSPSKT
NATALQAPVASPGSDRASTVQLEVTHPGFQGTGGRKPPGAHRACRSFRHLDQCEHQIGPQETKQFLNSAHEPLFHCNCT
RRLARFLRLHGPVVGASMLWELPGMTCFKLAPPLDCAEGKGCPDRPRAFKVSARHLLRLQQRRLQLQGTGTGNGQVWPSED
QGAPISFYNRCLQLT
>Pediculus_humanus_corporis
MKQSPNVRGSGSSSGGSDGGSSGGGGGGGGDESLIVDEKLGRTKWCGTGNVANSYNDLGIWVKEDRCCREHDHCPIQLEP
GQCRNGICNFSPTFRSHCDNAFRRCLEKTKSNIANIIGSIYFNVAQGTICISERRFCPQAMRCSVGEFRRNRPYPKSSSF
SFSSGSGSSGLVRIYNLKKKLFSLNLSFGIFGGNRHLIIL
>B. jararacussu
```

MRTLWIMAVLLVGVGDLWQFGQMILKETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDCCYGKLTNCKPKTD RYS
YSRENGVIICGEGTPCEKQICECDKAAAVCFRENLRITYKKRYMAYPDVLCCKPAEK

>*N. naja*

MNPAHLLILAAVCVSPLGASSNRPMPLNLYQFKNMVQCTVPNRSWDFADYGCYCGRGGSGTPVDDLDRCCQVHDNCYGEA
EKISRCWPYFKTYSYEQSGTLTCKGGNNACAAVCDCLAAICFAGAPYNDNNYNIDLKARCQ

>*V. ammodytes*

MRTLWIVAVCLIGVEGSLLEFGMMILGETGKNPLTSYSFYGCYCGVGGKGTGPKDATDRCCFVHDCCYGNLPDCSPKTD RYKYHRENGAIVC
GKGTSCENRICECDRAAICFRKNLKTNYIYRNPDLCKKESEK

>P04054.3_ *H. Sapiens* IB

MKLLVLAVLLTVAAADSGISPRVWQFRKMIKCVIPGSDPFLEYNNYGCYCGLGSGTPVDELKCCQTHDNCYDQAKKLDSC KFLLDNPY
THTYSYSCSGSAITCSSKNKECEAFICNCDRNAICFSKAPYNKAHKNLDTKKYCQS

>Q9NZ20_ *H. Sapiens* III

MGVQAGLFGMLGFLGVALGGSPALRWYRTSCHLTAKVPGNPLGYLSFLAKDAQGLALIHARWDAHRRLQACSWEDEPELTA
AYGALCAHETAWGSFIHTPGPELQRALATLQSQWEACRALEESPAAGARKKRAAGQSGVPGGGHQREKRGWTMPGTLWCGVG
DSAGNSSELGVFQGPDLCCREHRCQPQNISPLQYNYGIRNYRFHTISHCDDTRFQQCLQNQHDSISDIVGVAFFNVLEIP
CFVLEEQAACVAVYWWGGCRMYGTVPRLARLQPRTFYNASWSSRATSPTPSSRSPAPPKPRQKQHLRKGPHPHQKSGKRPSKA
NTTALQDPMVSPRLDVAPTGLQGPQGGGLKQGARWVCRSFRRLDQCEHQIGPREIEFQLLNSAQEPLFHCNCTRRRLARFL
RLHSPPEVTNMLWELLGTTCTFKLAPPLDCVEGKNCSDRPRAIRVSARHLRLQQRHQLQDKGTDERQWPWPSEPLRGPMSF
YNQCLQLTQAARRPDRQKQSWSQ

>060733.2_ *H. Sapiens*

MQFFGLVNTFSGVTNLFSPNFRVKEVAVADYTSSDRVREEGLILFQNTPNRTWDCVLVNPRNSQSGFRLFQLELEADAL
VNFHQYSSQLLPFYESSPQVLHTEVLQHLTDLIRNHPWSVAHLAVELGIRECFHHSRIISCANCAENEEGCTPLHLACRK
GDGEILVELVQYCHTQMDVTDYKGETVFHYAVQGDNSQVLQLLGRNAVAGLNQVNNQGLTPLHLACQLGKQEMVRVLLCN
ARCNIMGPNGYPIHSAMKFSQKGAEMIISMDSQIHSKDPYRGASPLHWAKNAEMARMMLLKRCNVNSTSSAGNTALHVA
VMRNRFDCAIVLLTHGANADARGEHGNTPHLAMSKDNVEMIKALIVFGAEVDTPNDFGETPTFLASKIGRLVTRKAILTL
LRTVGAIEYCFPIHGVPAEQGSAAPHPFSLERAQPPPISLNNLELQDLMHISRARKPAFILGSMRDEKRTHDHLCLDGG
GVKGLIIIIQLLIAIEKASGVATKDLFDWAGTSTGGILALAILHKSMMAYMRGMYFRMKDEVFGRSRPYESGPLEEFLKRE
FGEHTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLVWRAARSSGAAPTYFRPNG
RFLDGGLLANNPTLDAMTEIHEYNQDLIRKGQANKVKKLSIVVSLGTGRSPQVPVTCVDVFRPSNPWELAKTVFGAKELGK
MVVDCCTDPDGRAVDRARAWCEMVGIIQYFRLNPQLGTDIMLDEVSDTVLVNALWETEVYIYEHREEFQKLIQLLLS

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