MOLECULAR CLONING OF A SERINE BETA-FIBRINOGENASE HOMOLOG, A NOVEL GENE FROM RUSSELL'S VIPER VENOM (*DABOIA RUSSELLII SIAMENSIS*)

Miss Umaporn Methmaolee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

การโคลนนิ่งเซอร์รีนเบต้า-ไฟบริโนจิเนสโฮโมลอค, ยีนใหม่จากพิษงูแมวเซา

นางสาวอุมาภรณ์ เมธเมาลี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

492114

Thesis Title	MOLECULAR CLONING OF A SERINE BETA-FIBRINOGENASE HOMOLOG, A NOVEL GENE FROM RUSSELL'S VIPER VENOM (*DABOIA RUSSELLII SIAMENSIS*)
By	Miss Umaporn Methmaolee
Field of Study	Medical Science
Thesis Advisor	Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D. Ph.D
Thesis Co-advisor	Associate Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

P. Kamolratanakul ..... Dean of the the Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

Issarang Nuchprayoon ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D. Ph.D)

Wilai Anomasiri ..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.)

Ponlapat Rojnuckarin ..... Member

(Associate Professor Ponlapat Rojnuckarin, M.D., Ph.D.)

อุมาภรณ์ เมธเมาลี : การโคลนนิ่งเซอร์รีนเบต้า-ไฟบริโนจิเนสโฮโมลอค, ยีนใหม่จากพิษงูแมวเซา. (MOLECULAR CLONING OF A SERINE BETA-FIBRINOGENASE HOMOLOG, A NOVEL GENE FROM RUSSELL'S VIPER VENOM (*DABOIA RUSSELLII SIAMENSIS*).) อ. ที่ปรึกษา รศ.นพ.อิศรางค์ นุชประยูร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. วิไล อโนมะศิริ, 89หน้า.

งูแมวเซาเป็นงูที่มีพิษร้ายแรง พบในประเทศไทย รวมถึงประเทศในแถบเอเชียใต้และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ องค์ประกอบในพิษงูแมวเซาส่วนใหญ่เป็น digestive enzyme หรือ โปรตีนที่มีผลต่อการแข็งตัวของเลือด ในการศึกษานี้ได้ทำการโคลนนิ่งและศึกษาลักษณะเฉพาะของ เซอร์รีนเบต้า-ไฟบริโนจิเนสโฮโมลอค ซึ่งเป็นยีนใหม่ที่ได้จากห้องสมุดยีนของพิษงูแมวเซา โดยลำดับซีดีเอ็นเอสายเต็มของ เซอร์รีนเบต้า-ไฟบริโนจิเนสโฮโมลอค ของงูแมวเซา (RV SBF) ได้ถูกสร้างขึ้นจากเอ็มอาร์เอ็นเอของต่อมพิษงูแมวเซาโดยวิธี revere-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) และ 5' rapid amplification of cDNA end (5' RACE) แล้วโคลนนิ่งเข้าสู่ ดีเอ็นเอพาหะเพื่อสร้างดีเอ็นเอลูกผสม ผลจากการวิเคราะห์ ลำดับซีดีเอ็นเอ RV SBF ที่สมบูรณ์ด้วย โปรแกรม PROSITE ซึ่งสามารถทำนายคุณสมบัติต่างๆ ของยีนและโปรตีนที่ถูกถอดรหัสได้ พบว่าโครงสร้างของโปรตีนเซอร์รีนเบต้า-ไฟบริโนจิเนสโฮโมลอค ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 258 กรดอะมิโน และองค์ประกอบภายในโปรตีนมี กรดอะมิโนซิสเทอีนที่ conserve จำนวน 12 กรดอะมิโน ซึ่งทำการสร้างพันธะซิสเทอีน 4 พันธะและส่วนของปลายด้านเอ็นของสายโปรตีนเป็นsignal peptideจำนวน 18 กรดอะมิโน, activation peptide จำนวน 6 กรดอะมิโน และ mature protein จำนวน 234 กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบลำดับซีดีเอ็นเอของ RV SBF กับฐานข้อมูล GENBANK พบว่ามีความคล้ายกับ โปรตีนเซอร์รีนเบต้า-ไฟบริโนจิเนสของงู Lavantine viper (*Macrovipera lebetina*) ร้อยละ 91 นอกจากนี้จากการศึกษาแผนภูมิต้นไม้เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการ โดยนำลำดับซีดีเอ็นเอของ RV SBF วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLASTALX และ MEGA 3.1 พบว่ามีความสัมพันธ์กับงูในกลุ่ม (งูพิษ) vipers และพิษงูในกลุ่มเซอร์รีนเบต้า-ไฟบริโนจิเนส ผลจากการศึกษานี้ ทำให้ทราบลำดับเบสและ ลำดับกรดอะมิโนเต็มสายของ RV SBF และเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาต่อไปในความเป็นพิษที่เกิดจากการถูกกัดด้วยงูแมวเซา รวมถึงทำการศึกษาโปรตีน เซอร์รีนเบต้า-ไฟบริโนจิเนสโฮโมลอคที่ได้จากการสกัดโดยตรงจาก crude venom และโปรตีนที่ได้จากการผลิต recombinant protein ซึ่งจะทำให้สามารถศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเซอร์รีนเบต้า-ไฟบริโนจิเนสโฮโมลอคของพิษงูแมวเซาในเชิงลึกต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต อุมาภรณ์ เมธเมาลี
ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา วิไล นุชประยูร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศิริ อโนมะศิริ

4674825330: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS:MOLECULAR CLONING / RUSSEL'S VIPER / SERINE BETA-FIBRINOGENASE HOMOLOG / *Daboia russellii siamensis*

UMAPORN METHMAOLEE : MOLECULAR CLONING OF A SERINE BETA-FIBRINOGENASE HOMOLOG, A NOVEL GENE FROM RUSSELL'S VIPER VENOM (*DABOIA RUSSELLII SIAMENSIS*). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ISSARANG NUCHPRAYOON, M.D., Ph.D., THESIS COADVISER : ASSOC. PROF. WILAI ANOMASIRI, Ph.D., 89 pp.

Russell's viper, RV, is a common venomous snake found in Thailand as well as South and Southeast Asian countries. RV venom consists of several digestive enzymes and proteins that affect coagulation. In this study, we cloned and characterized a novel serine beta-fibrinogenase homolog from RV venom gland cDNA library. Russell's viper a full-length Serine beta-fibrinogenase (RV SBF) cDNA was cloned by revere-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and 5' rapid amplification of cDNA end (5' RACE) into a plasmid vector from mRNA RV venom gland. The complete cDNA sequences was analyzed by PROSITE program, and predicted a 258-amino acids protein with 12 conserve cysteines internal forming 4 cysteines bond, with an N-terminal region of 18 amino acids signal peptide, 6 amino acids activation peptide and 234 amino acids mature protein. The sequence of RV SBF was compared to previously published snake venom SBF in the GENBANK database, and is 91% identical to *Macrovipera lebetina* serine beta-fibrinogenase. Using CLASTALX and MEGA 3.1 Program, a phylogenetic relationship between various vipers and other snake venom serine beta-fibrinogenase was constructed. These data is useful for future work on purification and recombinant expression of this protein.

Field of study Medical Science Student's signature Umaporn Methmaolee

Academic year 2006 Advisor's signature Issarang Nuchprayoon

Co-advisor's signature Wilai Anomasiri

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis has been successful due to the valuable help, advice, suggestions and interest of my advisor, Associate Professor Dr. Issarang Nucnprayoon M.D., Ph.D., my co-advisor, Associate Professor Dr. Wilai Anomasiri and Chairman, Medical Science Division Associate Professor Dr. Vilai Chentanez M.D., Ph.D. for them kindness, invaluable advice and constant encouragement throughout my study in Chulalongkorn University.

I would like to express my deep gratitude. I am very much grateful to Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D., Associate Professor Ponlapat Rojnuckarin, M.D., Ph.D. for their valuable comments and suggesting in the thesis committee.

I would like to give my special thank to Mr. Arkhom Saingam, Miss Vivornpun Sanprasert, Miss Pornpun Jaratsing, Miss Alisa Junpee, Mister Pattadon Sukkapan for their help and cheerful. In addition, I would like to express my special thank to the Snake bite and Venom research unit of the Chulalongkorn university for providing me the conveniences.

Forthemore, this study was supported by the Molecular Biology Department of Research Affairs, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Graduate School, Chulalongkorn University. Specials thanks to zeeta, Yang and my friends who work on the 10th floor of Chula MRC for their help, sincerity and friendship.

Finally, I will not forget to give special thanks to my parents and every members in my family for support during my graduate study and their kindness, understanding all the time; thank you very much.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) iv

ABSTRACT (ENGLISH) v

ACKNOWLEDGMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES xii

LIST OF FIGURES xiii

LIST OF ABBREVIATIONS xv

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

1. Background and Rationale 1

2. Research Questions 8

3. Objectives of the Study 8

4. Keywords 8

5. Conceptual Framework 9

6. Expected Benefits and Applications 10

II LITERATURE REVIEW 11

1. Serine beta-fibrinogenase in snake venom 11

2. Characteristics and Relationships of Serine beta-fibrinogenase 13

III MATERIALS AND METHODS 25

1. Materials 25

1.1 Screening of Serine beta-fibrinogenase clones from ZAP Express cDNA Library 25

1.1.1 ZAP Express cDNA Library of Russell's viper venom Glands 25

1.1.2 Plaque Lift Hybridization and Detection System 26

1.1.3 The pBK-CMV Phagemid Vector containing partial Serine beta-fibrinogenase cDNA sequences from the Expressed Sequences Taqs (ESTs) study 26

1.1.4 Genotypes of *Escherichia coli* Strain 27

1.1.5 Enzymes 27

1.2 Molecular cloning of Full length Serine beta-fibrinogenase homolog 28

1.2.1 Obtaining cDNA encoding mature sequences by Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) is amplify 28

1.2.1.1 Subcloning in Plasmid *E. coli* Expression Vector 28

1.2.1.2 Enzymes 29

1.2.1.3 DNA Purification from Gel Slice 29

1.2.1.4 Genotypes of *Escherichia coli* Strain 29

1.2.2 Obtaining Full Length cDNA
5' Rapid Amplification of cDNA Ends
(5'RACE) 30
1.2.2.1 Gene Specific Primers (GSP)
or Primers 30
1.2.2.2 DNA Extraction and
Purification from gel slice 31
1.2.2.3 Cloning of PCR Products 31
1.2.2.4 DNA Sequencing Reaction 31
1.3 Chemicals 31
2. Methods
2.1 Screening of Serine beta-fibrinogenase Clones
from ZAP Express cDNA Library 32
2.1.1 Plaque-lift Hybridization 32
2.1.1.1 Plating 32
2.1.1.2 Lifting 32
2.1.1.3 Probe Labeling 33
2.1.1.4 Hybridization 33
2.1.1.5 Detection 34
2.1.1.6 Double Strand Phagemid
DNA Extraction by
Alkaline Lysis Method 34
2.1.2 Digestion of Restriction Endonucleases
and Analysis 35
2.1.3 Sequencing 35

2.2 Molecular cloning of Full length
Serine beta-fibrinogenase homolog 36
2.2.1 cDNA encoding mature sequence of
Serine beta-fibrinogenase homolog
was obtained by Reverse transcription-
polymerase chain reaction (RT-PCR) 36
2.2.1.1 Ligation into pGEM-T Vector 37
2.2.1.2 Transformation to E. Coli, *JM 109* 37
2.2.1.3 Restriction Endonuclease and
Electrophoresis 38
2.2.2 Subcloning to Expression Vector 38
2.2.2.1 DNA Purification from Gel Slice 38
2.2.2.2 Ligation of PCR Products
into Plasmid Vector 39
2.2.2.3 Preparation of *E. coli* Competent Cells
by $CaCl_2$ Method 40
2.2.2.4 Transformation of *E. coli*
Competent Cells 40
2.2.3 Obtaining full length Serine beta-fibrinogenase
homolog cDNA by 5' Rapid Amplification
of cDNA Ends (5'RACE) 40
2.2.3.1 DNA Extraction and Purification
from Gel Slice 42
2.3 Bioinformatics and Computational Searching
sequence analysis 42

IV RESULTS 43

1. Screening of Serine beta-fibrinogenase clones from cDNA Library 43

1.1 Plaque-lift hybridization 43

1.2 Analysis of the RVV141 pBK-CMV phagemid clone containing partial serine beta-fibrinogenase gene 44

1.3 Computational searching analysis of partial cDNA sequences 45

2. Molecular cloning of Full length cDNA of serine beta-fibrinogenase homolog (RV SBF) 47

2.1 Obtaining cDNA encoding mature sequence of serine beta- fibrinogenase homolog 47

2.2 Subcloning cDNA encoding mature sequence to Expression Vector 52

2.3 Obtaining Full length cDNA sequences of serine beta-fibrinogenase by 5'RACE 53

3. Sequences alignment and Computational Analysis of Serine beta-fibrinogenase homolog 57

3.1 The cDNA sequence alignment and Phylogenetic tree construct 57

3.2 Deduced amino acid alignment and computational analysis 63

V DISCUSSION AND CONCLUSION 68

REFERENCES 74

APPENDIX 82

BIOGRAPHY 89

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1 Distribution of *Daboia russellii* subspecies 2

Figure 2 Morphology of *Daboia russellii* 4

Figure 3 Alignment of sequences of ancrod, batroxobin, crotalase, TSV-PA, and TM-VIG 24

Figure 4 Map of the ZAP Express vector 25

Figure 5 Map of the pBK-CMV vector 26

Figure 6 Map of the pTrcHisA and pET-32a(+) expression vector 29

Figure 7 The hybridized membranes of serine beta-fibrinogenase clones in plaque lift hybridization 43

Figure 8 An ethidium bromide stained agarose gel of double strand phagemid of RVV141 pBK-CMV digested by *EcoR* I and *Xho* I 44

Figure 9 Partial cDNA sequence of RVV141 45

Figure 10 Homology searching of partial cDNA sequence RVV141 using BLAST N program 46

Figure 11 An ethidium bromide stained agarose gel of cDNA encoding mature sequence serine beta-fibrinogenase 48

Figure 12 An ethidium bromide stained agarose gel showing *EcoR* I digested recombinant serine beta-fibrinogenase/pGEM®-T easy vector 49

Figure 13 An alignment comparison of cDNA encoding mature sequences serine beta-fibrinogenase homolog and *Macrovipera lebetina* serine beta-fibrinogenase precursor using CLASTALX program 50

Figure 14 An alignment of 10 cDNA clones encoding mature sequences of serine beta-fibrinogenase homolog using CLASTAL X program 51

Figure 15 An alignment of selected mature cDNA clones of serine beta fibrinogenase from pGEM®-T easy cloning 52

Figure 16 An ethidium bromide stained agarose gel showing the PCR product from 5' RACE 54

Figure 17 An ethidium bromide stained agarose gel showing *EcoR* I digested recombinant 5' RACE PCR product/pGEM®-T easy vector 55

Figure 18 Full length cDNA sequences of Serine beta-fibrinogenase homolog 56

Figure 19 Homology searching of full length cDNA sequences of serine beta-fibrinogenase homolog using BLAST N program 60

Figure 20 An alignment of cDNA encoding mature peptide between serine beta – fibrinogenase homolog and other 10 highly homology 61

Figure 21 Phylogenetic tree of snake venom protease. The species name and the GenBank accession number are indicated in the tree 62

Figure 22 Homology searching of full length cDNA sequences of serine beta-fibrinogenase homolog using BLAST N program 64

Figure 23 The Amino acid composition of serine beta-fibrinogenase homolog 65

Figure 24 Predicted physical properties of deduced amino acid Serine beta-fibrinogenase homolog 66

Figure 25 The active protein sequences alignment between Serine beta-fibrinogenase homolog and other 10 highly similarity sequences 67

LIST OF TABLES

Page

Table 1 Geographical variation in the clinical manifestations of *Daboia russellii* bite 5

Table 2 Properties of snake venom β– chain Fibrinoginase 16

Table 3 Restriction enzymes with their recognition sites, recommended buffer and manufacturer 27

Table 4 Oligonucleotides and their descriptions 30

Table 5 The Amino acid composition of serine beta-fibrinogenase homolog 65

LIST OF ABBREVIATIONS

aa	amino acid
ATP	adenosine triphosphate
bp	base pair
BCA	bicinchoninic acid
°C	degree Celsius
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cm	centimeter
Cys	cysteine
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP and dCTP
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
g	gram
IPTG	isopropy1-β-D-thiogalactopyranoside
Kb	kilobase
kDa	kiloDalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani media
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
nM	nanomolar
M	molar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
N	normal

ng	nanogram
nm	nanometer
OD	optical density
pmol	picomole
PCR	polymerase chain reaction
RACE	rapid amplification of cDNA end
rpm	round per minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
sec	second
SDS	sodiumdodecylsulphate
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
UV	ultraviolet
UTR	untranslated region
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
µg	microgram
µl	microliter
x g	gravity