

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## ทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2552

### ชื่อแผนการวิจัย (Research Program)

- (ภาษาไทย) การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์
- (ภาษาอังกฤษ) Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness

### ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

รศ.นพ.ดร.อิศรางค์ นุชประยูร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### คณะผู้ร่วมวิจัย

น.ส.มณฑนา มาศ สุนทรวัฒน์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายพัทธคนย์ สุขพันธุ์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวธัญญา อ่อนดี หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## ทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2552

### ชื่อแผนการวิจัย (Research Program)

(ภาษาไทย) การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์  
(ภาษาอังกฤษ) Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness

### ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

รศ.นพ.ดร.อิศรางค์ นุชประยูร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### คณะผู้ร่วมวิจัย

น.ส.มณฑน์มาศ สุนทรวัฒน์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
นายพัทธคนย์ สุขพันธุ์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
นางสาวรัชฎา อ่อนดี หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ สภานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดเก็บตัวอย่างพืช และรีดพืชสมุนไพร และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยพืชและงูพิษกัด และศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ (CHULA-MRC) ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ

## บทคัดย่อ

ปัญหาพิษกัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย หนึ่งในงูพิษที่สำคัญในไทยคืองูแมวเซา (*Daboia russellii siamensis*) งูชนิดนี้พบมากในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกของไทย ผู้ที่ถูกงูชนิดนี้กัด มักมีอาการทางระบบเลือด และภาวะไตวายเฉียบพลัน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ที่ถูกงูแมวเซากัดเสียชีวิต ในปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับกลไกการเกิดพิษหลังถูกงูแมวเซากัด รวมทั้งโปรตีนสำคัญในพิษงูแมวเซาที่อาจมีประโยชน์ทางการแพทย์ ยังไม่มีการศึกษาอย่างแน่ชัด การศึกษาองค์ประกอบของพิษงูแมวเซาในเชิงลึก จะช่วยให้เข้าใจกลไกการเกิดพิษ นำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น พร้อมทั้งอาจนำความรู้ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป จากผลงานที่ผ่านมา ทางกลุ่มผู้วิจัยได้สร้างห้องสมุดยีน (cDNA library) จากต่อมพิษงูแมวเซาได้สำเร็จ และได้มีการศึกษาองค์ประกอบของพิษงูเบื้องต้นด้วยเทคนิค Expressed Sequence Tags Analysis พบว่าในพิษงูมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ haematostasis เป็นจำนวนมาก ซึ่งสัมพันธ์กับความเป็นพิษของงูแมวเซาที่มีผลโดยตรงต่อระบบเลือดของเหยื่อที่ถูกกัด หลังจากการศึกษาวิจัยในปีแรกได้ทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X และ PLA<sub>2</sub> ก่อนโดยใช้วิธี Gel filtration column chromatography และ Anion exchange column chromatography และทำโคลนและผลิตโปรตีนที่พบใน cDNA library ด้วย recombinant technology จำนวน 5 ยีน ได้สำเร็จ คือ phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), factor X activating enzyme (RVV-X), factor V activating enzyme (RVV-V), serine  $\beta$ -fibrinogenase และ rJerdostatin homolog (Daboistatin short disintegrin) โดยที่โปรตีนทุกตัวสามารถทำปฏิกิริยากับ anti his tag ได้ โดยในการศึกษานี้เป็นการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีน RVV-X ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง รวมถึงการทดสอบการทำงานของ recombinant protein ที่ผลิตได้ ซึ่งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

จกษ  
เลขหมู่ พ 15  
013607  
เลขทะเบียน 2552  
014632  
วัน, เดือน, ปี 27 ส.ค. 53

## Abstract

Venomous snake bite is an important medical problem in Thailand. The subspecies found in Thailand is *Daboia russellii siamensis* that is abundant in Eastern and Central of Thailand. Envenomation presents predominately with hematologic manifestations and acute renal failure (ARF) which are cause of death in Russell's viper bite victims. However, the exact pathogenesis following *Daboia russellii siamensis* envenomation is not well established. Since Russell's viper venom contains several active proteins that present different biological activities, the main toxin in Russell's viper venom involving pathogenesis remains unclear. Moreover, snake venom proteins are source of interested biomedical compounds which may useful for medical applications. Therefore, this research focuses on snake venom component identification to understand the role of toxins involving the pathogenesis for potential treatment in snake-bite patients and investigate the potential snake proteins for use in medical application. In previous study, we have constructed a cDNA library from Russell's viper venom gland and generated expressed sequence tags (ESTs), resulting in sequences associated with haematostasis abnormality found in snake-bite victims. After purification of RVV-X and PLA<sub>2</sub> by Gel filtration column chromatography and Anion exchange column chromatography, as well as cloning and expression of recombinant proteins-phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), factor X activating enzyme (RVV-X), factor V activating enzyme (RVV-V), serine β-fibrinogenase and rJerdostatin homolog (Daboistatin short disintegrin) found in cDNA library, this study has focused on determining biological activities of the purified RVV-X and other recombinant proteins. Studying these snake proteins can provides knowledge for medical useful.

## สารบัญ

|   | หน้า |
|---|------|
| กิตติกรรมประกาศ                           | 2    |
| บทคัดย่อ                                  | 3    |
| Abstract                                  | 4    |
| สารบัญ                                    | 5    |
| สารบัญภาพ                                 | 6    |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย | 7    |
| บทนำ                                      | 8    |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา                 | 8    |
| วัตถุประสงค์                              | 11   |
| ขอบเขตการวิจัย                            | 11   |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ                 | 11   |
| วิธีดำเนินการวิจัย                        | 12   |
| รูปแบบการวิจัย                            | 12   |
| ขั้นตอนการดำเนินงาน                       | 12   |
| ผลการวิจัย                                | 15   |
| สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง                  | 30   |
| บรรณานุกรม                                | 32   |
| ประวัตินักวิจัยและคณะ                     | 33   |
| ภาคผนวก                                   | 42   |

## สารบัญภาพ

|                  |   | หน้า |
|------------------|---|------|
| <u>รูปที่ 1</u>  | แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนพิษงูบริสุทรีชนิด RVV-X ในการกระตุ้นพลาสมาชนิดต่างๆ ให้แข็งตัวด้วยวิธี APTT                 | 17   |
| <u>รูปที่ 2</u>  | แสดงระดับ Plasma D-dimer ในหนู rat ที่ฉีดด้วยพิษงูรวม หรือ โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X ที่แยกบริสุทรีด้วยวิธีทางชีวเคมี ณ เวลาต่างๆ   | 18   |
| <u>รูปที่ 3</u>  | แสดงพยาธิสภาพชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 20 เท่า)   | 19   |
| <u>รูปที่ 4</u>  | แสดงชิ้นเนื้อหัวใจที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 20 เท่า)   | 19   |
| <u>รูปที่ 5</u>  | แสดงชิ้นเนื้อต่อมหมวกไตที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 20 เท่า)  | 20   |
| <u>รูปที่ 6</u>  | แสดงชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 20 เท่า)   | 20   |
| <u>รูปที่ 7</u>  | ผลจากการกระตุ้นการสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin โดยไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ที่เวลาต่างๆ                              | 22   |
| <u>รูปที่ 8</u>  | ผลจากการกระตุ้นการสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin ด้วย IPTG ความเข้มข้นต่างๆ   | 23   |
| <u>รูปที่ 9</u>  | ผลจากการกระตุ้นการสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin ด้วยเวลาต่างๆ  | 24   |
| <u>รูปที่ 10</u> | ผลจากการกระตุ้นการสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin ด้วยอุณหภูมิต่างๆ  | 25   |
| <u>รูปที่ 11</u> | แสดงผลการ purified rJerdostatin homolog protein โดยใช้วิธี Affinity chromatography ของ TALON <sup>R</sup> Metal Affinity Resin  | 26   |
| <u>รูปที่ 12</u> | แสดงผลของ rJerdostatin homolog protein ต่อการยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด  | 27   |
| <u>รูปที่ 13</u> | การทดสอบการทำงานของ recombinant RVV-V และ recombinant Serine $\beta$ -fibrinogenase ด้วย BAEE assay โดยใช้ trypsin เป็น control | 30   |

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| cDNA library     | = | complementary DNA  |
| DIC              | = | Disseminated intravascular coagulation                     |
| ESTs             | = | Expressed Sequence Tags                                    |
| kDa              | = | kilodalton   |
| ml               | = | Milliliter   |
| nm               | = | nanometre  |
| PLA <sub>2</sub> | = | phospholipase A2   |
| pNA              | = | p-nitroaniline   |
| RVV-V            | = | factor V activating enzyme                                 |
| RVV-X            | = | factor X activating enzyme                                 |
| SDS-PAGE         | = | sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis |



## บทนำ

### □ ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัญหางูพิษกัดยังคงจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของไทยและอีกหลายๆ ประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพ จึงมีงูพิษอาศัยอยู่หลายชนิด หนึ่งในงูพิษที่สำคัญของประเทศไทยคืองูแมวเซา (Russell's viper) โดยจะพบมากในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีรายงานการถูกงูแมวเซากัดในประเทศไทย 44 ราย ในปี พ.ศ. 2546 หรือคิดเป็นร้อยละ 3.9 ของงูพิษกัด ทั้งหมดในประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ค่านี้อาจต่ำกว่าความเป็นจริงมาก เนื่องจากผู้ป่วยหลายรายไม่ได้ไปพบแพทย์ที่โรงพยาบาลและทำการรักษากันเองตามวิธีพื้นบ้าน

ในปัจจุบันความรู้ของกลไกการเกิดพิษหลังถูกงูแมวเซากัด ยังไม่ทราบแน่ชัดนัก การรักษาจึงเป็นการรักษาตามอาการ และการให้เซรุ่มแก้พิษงู เซรุ่มดังกล่าวผลิตจากการกระตุ้นม้าด้วยพิษงูแมวเซารวม ทำให้เซรุ่มที่ได้มีความจำเพาะต่อการกำจัดพิษตัว ในการรักษาจึงต้องให้เซรุ่มแก้พิษงูในปริมาณมาก อาจนำไปสู่ความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแพ้ในผู้ป่วยได้ ดังนั้นหากเราสามารถเข้าใจองค์ประกอบของพิษงูที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพิษ ย่อมเป็นประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซากัดอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การพัฒนาสร้าง toxin-specific antivenom รวมทั้งสามารถดัดแปลงใช้ประโยชน์จากโปรตีนบางชนิดที่มีในพิษงูแมวเซา เพื่อนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของ factor ต่างๆ ทางระบบเลือดของผู้ป่วยต่อไป

ฤทธิ์ของพิษของงูแมวเซามีผลต่อระบบโลหิต (hematoxin) เป็นหลัก เมื่อถูกงูแมวเซากัดพบว่าเกิดอาการเฉพาะที่ตรงบริเวณที่ถูกกัดผู้ป่วยจะมีอาการปวดที่แผลและปวดร้าวกระจายไปเป็นบริเวณกว้าง ตำแหน่งที่ถูกกัดจะบวมมากมีโลหิตไหลซึมจากแผลเนื่องจากมี extravasation ของเม็ดเลือดแดงและพลาสมาเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังทำให้บริเวณนั้นมีสีคล้ำ อาการแสดงที่สำคัญที่พบได้ในผู้ถูกกัดคือความผิดปกติของระบบโลหิตเนื่องจากการลดลงของโปรตีนปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด เนื่องจากการทำงานของโปรตีนในพิษงู เป็นผลให้การแข็งตัวของเลือดผิดปกติและผู้ป่วยมีอาการเลือดไม่หยุดไหล

โดยผลงานที่ผ่านมา หน่วยวิจัยพิษงูและงูพิษกัดได้รับทุนวิจัยจาก สวทช. เพื่อทำการศึกษาองค์ประกอบของพิษงูแมวเซา ด้วยความร่วมมือจากสวนงู สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ในการจัดหาต่อมพิษงูแมวเซาและน้ำพิษงู ทางกลุ่มผู้วิจัยได้สร้างห้องสมุดยีน (cDNA library) จากต่อมพิษงูแมวเซาได้สำเร็จและได้มีการศึกษาองค์ประกอบของพิษงูเบื้องต้นด้วยเทคนิค Expressed Sequence Tags Analysis พบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ haematostasis เป็นจำนวนมากในพิษงู ซึ่งสัมพันธ์กับความเป็นพิษของงูแมวเซาที่มีผลโดยตรงต่อระบบเลือดของเหยื่อที่ถูกกัด โปรตีนสำคัญที่

พบ คือ phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), factor X activating enzyme (RVV-X), factor V activating enzyme (RVV-V), serine  $\beta$ -fibrinogenase, short disintegrin และ โปรตีนอื่นๆ อีกหลายชนิด

Factor X activating enzyme (RVV-X) เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (92 kDa) ที่มีหลายโดเมน มีคาร์บอกไฮเดรต 13% ประกอบด้วย heavy chain (57 kDa) และ light chain (19.4 และ 16.4 kDa) ซึ่งยึดกันด้วยพันธะ disulfide มี N-linked oligosaccharides 6 ตำแหน่งโดยที่อยู่บน heavy chain 4 ตำแหน่ง บน heavy chain ประกอบด้วย metalloprotease domain ซึ่งมี conserved HExxH เป็น active site, disintegrin domain และ cysteine-rich region โดย metalloprotease domain คือ catalytic domain ที่ใช้ในการกระตุ้น Factor X ส่วน light chain มีความคล้ายคลึงกับ C-type (Ca<sup>2+</sup>-dependent) lectins ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการจับกับ Factor X RVV-X สามารถกระตุ้นการทำงานของ blood coagulation factor X โดยการตัดที่พันธะ Arg-Ile ที่ตำแหน่ง 194 เป็นผลให้ blood coagulation cascade ทำงานและเกิดการแข็งตัวของเลือด (Disseminated intravascular coagulation, DIC) ในขณะเดียวกันการที่ blood coagulation factor X ถูกใช้ไปส่วนมากเป็นผลให้เลือดของผู้ถูกกัดไม่สามารถแข็งตัวได้ตามปกติและมีความเสี่ยงต่อการเกิด bleeding นอกจากนี้ยังพบว่า RVV-X ยังสามารถกระตุ้น factor IX และ protein C ได้ด้วย

Factor V activator (RVV-V) เป็นอีกโปรตีนที่พบในพิษงูแมวเซาซึ่งทำงานควบคู่กับ RVV-X ในการกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด โดยที่ RVV-V กระตุ้นการทำงานของ Factor V ซึ่งจะทำงานร่วมกับ Factor X ในการกระตุ้นให้เกิด fibrin clot ได้ จึงพบว่าผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซากัดจะมีระดับของ Factor V ในเลือดต่ำกว่าปกติเช่นเดียวกับ Factor X ส่งผลให้เลือดแข็งตัวยาก ดังนั้น RVV-V จึงเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซากัด RVV-V ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม serine proteinase มีน้ำหนักโมเลกุล 29 kDa ประกอบด้วย 236 amino acid, catalytic triad ซึ่งประกอบด้วย His<sup>44</sup>, Asp<sup>88</sup> และ Ser<sup>182</sup>, 6% carbohydrate และ 12 cysteins ซึ่งจะสร้าง 6 disulfide bonds การกระตุ้น Factor V โดย RVV-V แตกต่างจากการกระตุ้นโดย thrombin ที่กระตุ้นโดยการตัด Factor V 3 ตำแหน่งในขณะที่ RVV-V ตัดเพียง 2 ตำแหน่งแต่ให้ active factor V ที่ทำงานได้เท่ากัน พบว่า RVV-V ถูกยับยั้งการทำงานได้โดย diisopropylfluorophosphate (DFP)

Serine  $\beta$ -fibrinogenase (SBF) เป็น enzyme arginine esterhydrolase ชนิดหนึ่ง ซึ่งจำเพาะต่อ  $\beta$ -fibrinogen chain โดย hydrolyzes ester และ amides ของ arginine ใน  $\beta$ -fibrinogen chain ทำให้สลายหรือตัด  $\beta$ -fibrinogen chain ซึ่งไปรบกวนระบบ haemostasis และ thrombosis เนื่องจากเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เลือดไม่แข็งตัว แต่ไม่พบ caseinolytic activity ของเอนไซม์ จากการศึกษากับ *Vipera lebetina* fibrinogenase (VIF) พบว่ามี cleavage site ในการ cleave fibrinogen ที่ต่างจาก plasmin และยังสามารถ inhibited platelet aggregation ใน human rich plasma ที่ถูกกระตุ้นโดย ADP และ collagen และยังพบว่ามี fibrinogenolytic effect ในหนูทดลองอีกด้วย โดยพบว่ามี phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) และ diisopropylfluorophosphate (DFP) เป็น inhibitor ต่อ enzyme

Disintegrin เป็น peptide ขนาดเล็กที่พบได้ในพิษงูทั่วไป จัดเป็น cysteine-rich peptide active site ของ disintegrin ประกอบด้วย amino acid 3 หน่วยโดยที่พบส่วนมากคือ Arg-Gly-Asp (RGD)

sequence ซึ่งใช้ในการจับกับ target integrin บน platelet ซึ่งมีผลให้เกิดการยับยั้งการเกาะกลุ่มของ platelet อย่างไรก็ดี ปัจจุบันมีการพบ disintegrin หลายชนิดที่มี active site เป็น non-RGD ซึ่งมีการทำงานที่หลากหลายแตกต่างกันไป ในที่นี้ได้ตั้งชื่อยีน disintegrin ที่พบใหม่นี้ว่า rJerdostatin homolog (Daboistatin short disintegrin)

การโคลนยีน และ express ยีนเหล่านี้ เพื่อสร้าง recombinant proteins ที่สามารถทำงานได้เหมือน native protein สามารถนำไปใช้ในศึกษากลไกการเกิดพยาธิสภาพหลังถูกงูแมวเซากัด รวมทั้งยังทำให้มีโอกาศศึกษา protein-structure function relationship เช่น การทำ mutagenesis หรือการหา functional domain ของ enzyme เป็นต้น ในขณะที่เดียวกันการแยกโปรตีนต่างๆ ที่สำคัญในพิษงูโดยเทคนิคทางชีวเคมีนั้น เป็นอีกทางหนึ่งที่ใช้แยกโปรตีนพิษงูที่สำคัญออกมาศึกษาได้เช่นกัน โดยในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาผลของโปรตีน RVV-X ที่แยกสกัดจากพิษงูแมวเซาต่อการเกิดพยาธิสภาพทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง ซึ่งความรู้ที่ได้ไปสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

## □ วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของพิษงูแมวเซาในเชิงลึก ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเข้าใจกลไกการเกิดพิษ และนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น
2. สามารถคัดแปลงใช้ประโยชน์จากโปรตีนบางชนิดที่มีในพิษงูแมวเซา เพื่อนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบเลือด

## □ ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้จะทำการทดสอบการทำงานของโปรตีนที่พบในพิษงูแมวเซา เช่น RVV-X, PLA<sub>2</sub>, RVV-V,  $\beta$ -fibrinogenase และ rJerdostatin homolog (Daboistatin short disintegrin) โดยใช้เทคนิคทางชีวเคมี ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ได้จากการสร้างโดยอาศัย recombinant technology ที่คาดว่าจะมีความสามารถในการทำงานได้เหมือน native proteins เพื่อนำไปศึกษาหาโปรตีนพิษงูที่สามารถนำมาประโยชน์ทางการแพทย์ รวมถึงการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนพิษงูซึ่งความรู้ที่ได้จะนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

## □ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจองค์ประกอบของพิษงูแมวเซามากขึ้น และสามารถอธิบายกลไกการเกิดพิษ หลังถูกงูกัดได้
2. สามารถนำโปรตีนพิษงูไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ เช่น การใช้ในงาน diagnosis, การใช้โปรตีนพิษงูรักษาโรคเฉพาะทางบางชนิด หรือการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูที่มี ประสิทธิภาพสูงขึ้น
3. สามารถผลิตโปรตีนที่มีความสามารถในการผลิตขายและจดสิทธิบัตรแข่งขันในตลาดได้
4. ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

## วิธีดำเนินการวิจัย

- รูปแบบการวิจัย (Research design)  
รูปแบบการศึกษาเป็นแบบ Descriptive Research
- ขั้นตอนการดำเนินงาน

### วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีนพิษชนิด RVV-X แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวเคมี, recombinant RVV-XH หรือ RVV-XL ในหลอดทดลอง

ทดสอบการกระตุ้นพลาสมาชนิดต่างๆ ให้แข็งตัวด้วยวิธี APTT

พลาสมาชนิดต่างๆ ที่นำมาทดสอบ คือ Normal plasma, Cryoprecipitate plasma, Cryo-removed plasma, FVIII deficiency plasma และ FX deficiency plasma ขั้นตอนการวิจัย ทดสอบโดยการนำพลาสมาชนิดต่างๆ ปริมาณ 100  $\mu$ l ผสมกับ โปรตีนพิษ RVV-X บริสุทธิ์ที่แยกด้วยวิธีทางชีวเคมี, recombinant RVV-XH หรือ RVV-XL ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 100  $\mu$ l ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 3 นาที ต่อจากนั้นเติม 25mM CaCl<sub>2</sub> ปริมาณ 100  $\mu$ l และจับเวลาทันทีเมื่อสังเกตเห็นก้อนพลาสมาที่แข็งตัว หลอดควบคุมเหมือนกับหลอดทดลองทุกประการ แต่แทนที่โปรตีนพิษ RVV-X ด้วยสารละลายที่ใช้สำหรับเจือจาง โปรตีนพิษ RVV-X และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละการทดลอง

ทดสอบการกระตุ้นเลือด (Whole blood) ให้แข็งตัวด้วยวิธี VCT

เจาะเลือดของคนปกติหรือของคนไข้โรค hemophilia ชนิด A ที่มี FVIII inhibitor ปริมาณ 1 ml ใส่ในหลอดทดลองที่ไม่มีหรือมีโปรตีนพิษ RVV-X ความเข้มข้น 2  $\mu$ g/ml อยู่แล้ว ปริมาณ 100  $\mu$ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจับเวลาทันทีที่เลือดแข็งตัว

2. การทดสอบภาวะการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด และพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อ เมื่อฉีดโปรตีนพิษชนิด RVV-X แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวเคมีในสัตว์ทดลอง

คณะผู้วิจัยใช้ หนู rat ในการทดลอง แต่ละกลุ่มทดลองใช้หนูกลุ่มละ 6 ตัว โดยมีกลุ่ม Negative control คือกลุ่มที่ฉีดหนูด้วยน้ำเกลือ, กลุ่ม Positive control คือกลุ่มที่ฉีดหนูด้วยพิษรวมที่ความเข้มข้น 7  $\mu$ g/kg และหนูกลุ่มทดลอง คือกลุ่มที่ฉีดหนูด้วยโปรตีนพิษชนิด RVV-X ที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวเคมี หนูถูกวางยาสลบตลอดการทดลอง

ทดลองโดยการฉีดพิษรวมที่ความเข้มข้น 7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Positive control), โปรตีนพิษชนิด RVV-X ที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวเคมีที่ความเข้มข้น 1.75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (equipotent sublethal dose) หรือน้ำเกลือ (Negative control) เข้าทางเส้นเลือดดำที่ขา (femoral vein) และทำการเก็บเลือดในหลอดที่ผสมสารกันเลือดแข็ง 3.8% sodium citrate ที่เวลา 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาทีหลังได้รับโปรตีนพิษชนิด RVV-X หลังเก็บเลือดที่นาทีที่ 180 ทำการเก็บชิ้นเนื้อจากไต, ต่อมหมวกไต, หัวใจ, ปอด, ตับ, ม้าม ทันทันใน 10% formalin และย้อมชิ้นเนื้อด้วย Hematoxylin and eosin (H&E), Periodic acid Schiff (PAS) และ Masson's trichrome สำหรับการทดสอบภาวะการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด ทดสอบโดยการวัด ปริมาณ D-dimer ในพลาสมา โดยใช้ commercial D-Dimer test kit (NycoCard) กลุ่มควบคุมคือหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยน้ำเกลืออย่างเดียว

**3. การทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง recombinant Jerdostatin homologue**

หลังจากที่โคลน Jerdostatin homolog cDNA เข้า pET 32a plasmid และ transform เข้า *E.coli* BL21 แล้วได้ทำการคัดเลือก single colony มา 4 clone เพื่อทำ cell culture แล้วกระตุ้น express proteins ด้วย IPTG 1 mM และทำการกระตุ้นการสร้าง recombinant Jerdostatin homolog protein ในสถานะต่างๆเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง recombinant ดังกล่าว โดยตรวจสอบจากการทำ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) และ Western blotting

**4. การแยกโปรตีนพิษชนิด recombinant Jerdostatin homolog protein ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography**

จากการศึกษาผลการการกระตุ้น express recombinant Jerdostatin homolog protein ได้สถานะที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.7 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 30°C ในเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงนำ rJerdostatin homolog protein ที่ได้้นั้นมาแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Affinity chromatography ของ TALON<sup>R</sup> Metal Affinity Resin โดย rJerdostatin homolog protein ซึ่งบรรจุ anti-Histidine tag จะถูกจับกับ Co<sup>2+</sup> ที่บรรจุอยู่ใน TALON<sup>R</sup> Metal Affinity Resin ของ column และ pooled fraction ทั้งหมดของ rJerdostatin homolog protein เพื่อทำ refold โดยใช้วิธี Dialysis ซึ่งเป็นการทำให้โปรตีนคืนสภาพเดิมในธรรมชาติ แล้วจึงเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ Amicon<sup>R</sup> Ultra-15 centrifugal Filter Devices โดยวัดปริมาณโปรตีนที่ได้ในทุกขั้นตอน

## 5. การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนพิษงูบริสุทซ์ชนิด recombinant Jerdostatin homolog protein ในการยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยวิธี platelet aggregation assay

การทดสอบ specific activity ของ rJerdostatin homolog protein โดยวิธี specific Platelet aggregation inhibition test โดยนำ whole blood ของคนปกติจำนวน 3 คน ใส่ในแต่ละหลอดที่มี 3.2% sodium citrate ในอัตราส่วน 9:1 เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว หลังจากนั้นนำมาปั่น 1,000xg 10 นาที เพื่อให้ได้ PRP (platelet-rich plasma) ซึ่งจะถูกทำให้เจือจางด้วย PPP (platelet-poor plasma) ซึ่งเป็นการนำ PRP มาปั่น 3,500xg 15 นาที เพื่อให้ได้  $250 \times 10^9$  specific Platelet aggregation inhibition test /L แล้ว incubate 37 °C 10 นาที นำ rJerdostatin homolog protein ผสมกับ platelet ที่ได้ โดยใช้โปรตีนในปริมาณ 1, 5, 10, 20, 40 และ 50 µg/ml ตามลำดับ โดยใช้ BSA เป็น negative control แล้วจึงนำเข้าเครื่อง Helena Aggregometer โดยกระตุ้นด้วย collagen 2 µg/ml เครื่อง Aggregometer จะอ่านค่าการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด โดยทำการทดสอบการทำงานของ rJerdostatin homolog protein ที่ความเข้มข้นต่างๆ

## 6. การทดสอบการทำงานของ recombinant RVV-V และ recombinant Serine $\beta$ -fibrinogenase

ทำการผลิต recombinant RVV-V และ recombinant Serine  $\beta$ -fibrinogenase ใน E. coli ด้วยการกระตุ้นด้วย IPTG ในเชื้อ 1 ลิตร โปรตีนที่ได้ถูกนำมาสกัดด้วย metal affinity resin และทำการ refold โปรตีนจาก inclusion body ด้วยการทำ dialysis ใน buffer โปรตีนที่ได้นำมาทดสอบการทำงานด้วย synthetic substrate คือ BAEE (N-benzoyl-L-arginine ethyl ester)

## ผลการวิจัย

1. การทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีนพิษงูชนิด RVV-X แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวเคมี, recombinant RVV-XH หรือ RVV-XL ในหลอดทดลอง

### 1.1 ทดสอบการกระตุ้นพลาสมาชนิดต่างๆ ให้แข็งตัวของโปรตีนพิษงูชนิด RVV-X ที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวเคมี, recombinant RVV-XH และ RVV-XL ด้วยวิธี APTT

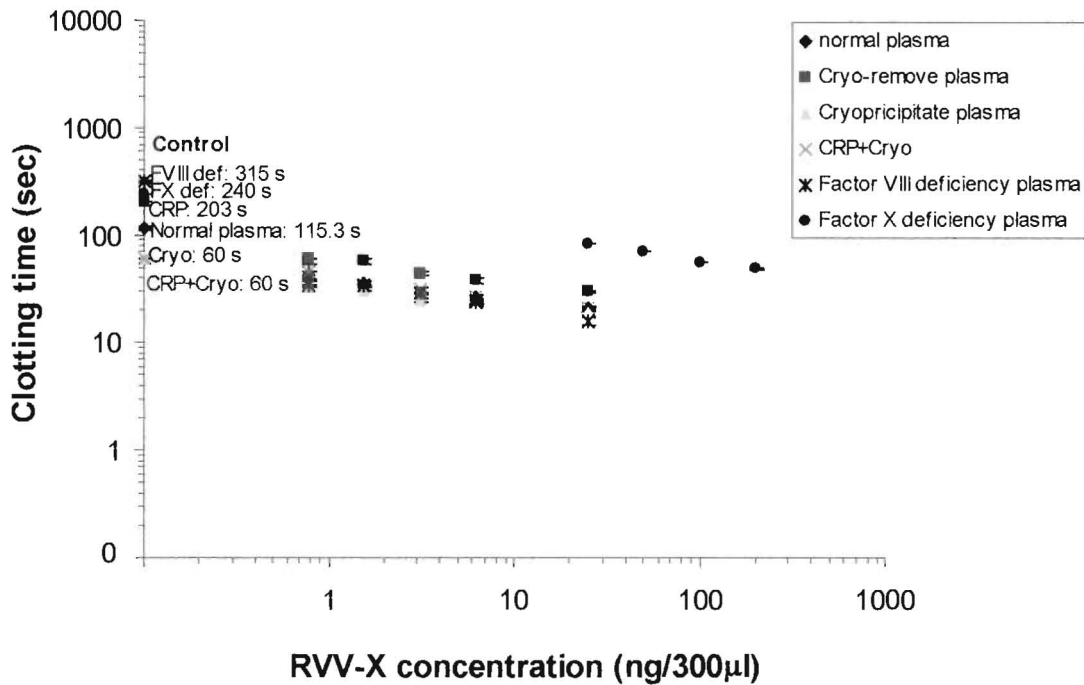
จากการศึกษาผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนพิษงูบริสุทธิ์ชนิด RVV-X ในการกระตุ้นพลาสมาชนิดต่างๆ ให้แข็งตัวด้วยวิธี APTT พบว่าโปรตีนพิษงูบริสุทธิ์ชนิด RVV-X สามารถกระตุ้นให้พลาสมาชนิดทุกชนิดแข็งตัวได้อย่างรวดเร็ว เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนพิษงูเพิ่มขึ้น เทียบกับหลอดควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถกระตุ้นให้พลาสมาของผู้ป่วยโรค hemophilia ชนิด A (ขาด factor VIII) แข็งตัวได้ในเวลาที่ใกล้เคียงกับพลาสมาของคนปกติ อย่างไรก็ตามโปรตีนพิษงูบริสุทธิ์ชนิด RVV-X ใช้เวลานานในการกระตุ้นให้พลาสมาที่ขาด factor X แข็งตัวได้ เมื่อเทียบกับพลาสมาของคนปกติ ดังแสดงในรูปที่ 1 ในขณะที่ recombinant RVV-XH และ RVV-XL กระตุ้นพลาสมาปกติให้แข็งตัวภายในเวลา 112, 107 วินาที ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับกลุ่ม negative control (ตารางที่ 1) แสดงว่า recombinant RVV-XH และ RVV-XL ไม่สามารถกระตุ้นให้พลาสมาปกติแข็งตัวได้ จึงไม่ได้ทำการทดสอบในพลาสมาชนิดอื่นๆ ดังนั้นเฉพาะ โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X ที่แยกบริสุทธิ์ทางชีวเคมีเท่านั้นที่นำไปทดสอบการกระตุ้นให้เลือด (Whole blood) แข็งตัวด้วยวิธี VCT

### 1.2 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนพิษงูบริสุทธิ์ชนิด RVV-X ในการกระตุ้นให้เลือดแข็งตัวด้วยวิธี VCT

จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนพิษงูบริสุทธิ์ชนิด RVV-X ในการกระตุ้นให้เลือดแข็งตัวด้วยวิธี VCT พบว่าโปรตีนพิษงูบริสุทธิ์ชนิด RVV-X ที่ความเข้มข้น 0.2  $\mu\text{g/ml}$  สามารถกระตุ้นให้เลือดของผู้ป่วยโรค hemophilia ชนิด A ที่มี FVIII inhibitor และเลือดของคนปกติแข็งตัวได้ภายในเวลา 2 นาที ในขณะที่ปกติแล้วเลือดของผู้ป่วยโรค hemophilia ชนิด A และเลือดของคนปกติ ใช้เวลาในการแข็งตัวนานถึง 260 นาที และ 20 นาที ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2



รูปที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของ โปรตีนพิษงูบริสุทธิ์ชนิด RVV-X ในการกระตุ้นพลาสมาชนิดต่างๆ ให้แข็งตัวด้วยวิธี APTT



ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของ recombinant RVV-XH, RVV-HL ในการกระตุ้นพลาสมาปกติและพลาสมาที่ขาด coagulation factor X ให้แข็งตัวด้วยวิธี APTT

| Plasma                      | Clotting time (sec)                      |                      |                      |                               |                               |
|-----------------------------|--|----------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                             | Crude Russell's viper venom <sup>a</sup> | rRVV-XH <sup>b</sup> | rRVV-XL <sup>c</sup> | Positive control <sup>d</sup> | Negative control <sup>e</sup> |
| Normal plasma               | 35                                       | 112                  | 107                  | 37                            | 117                           |
| Factor X - deficient plasma | 300                                      | -                    | -                    | 119                           | -                             |

<sup>a</sup>พิษงูแมวเซารวมที่ความเข้มข้น 20 µg/ml

<sup>b</sup>Recombinant RVV-XH ที่ความเข้มข้น 2.05 mg/ml

<sup>c</sup>Recombinant RVV-XL ที่ความเข้มข้น 0.91 mg/ml

<sup>d</sup>Positive control คือการแข็งตัวของพลาสมาถูกกระตุ้นด้วย Cephalin และ 25mM CaCl<sub>2</sub>

<sup>e</sup>Negative control เหมือนกับหลอดทดลองทุกประการ แต่แทนที่โปรตีนพิษงู RVV-X ด้วยสารละลายที่ใช้สำหรับเจือจางโปรตีนพิษงู RVV-X

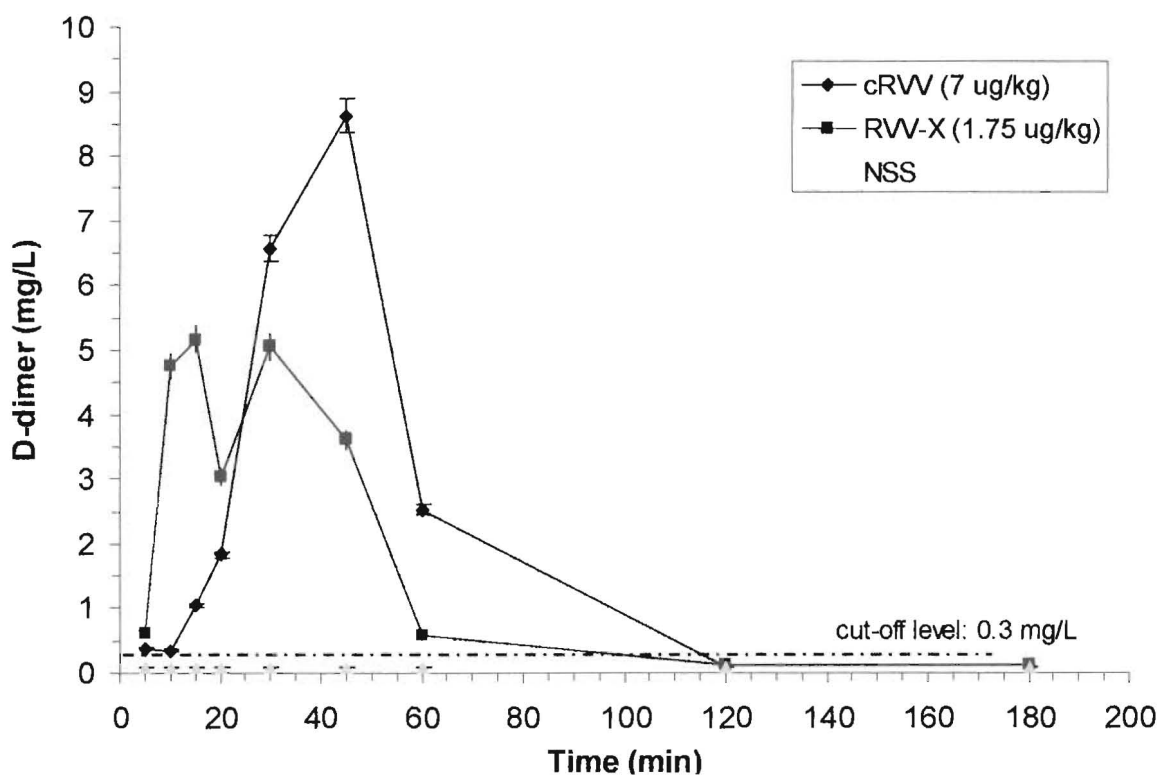
ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนพิษงูชนิด RVV-X ในการกระตุ้นให้เลือดแข็งตัวด้วยวิธี VCT

| Blood                        | Clotting time (min±SD) |            | P Value  |
|------------------------------|------------------------|------------|----------|
|                              | without RVV-X          | with RVV-X |          |
| Hemophilia whole blood (n=1) | 274                    | 2.3        | -        |
| Normal whole blood (n=5)     | 20.46±3.98             | 2.35±0.32  | 1.65E-05 |

2. การทดสอบภาวะการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด และพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อ เมื่อฉีดโปรตีนพิษงูชนิด RVV-X แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวเคมีในสัตว์ทดลอง

หลังจากฉีดโปรตีนพิษงูชนิด RVV-X ที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวเคมีในหนู rat พบว่าระดับ Plasma D-dimer สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่นาที่ที่ 15 และสูงสุดอีกครั้งที่นาที่ที่ 30 มีปริมาณเท่ากับ 5.17 mg/L และ 5.05 mg/L ตามลำดับ ขณะที่ระดับ Plasma D-dimer ของหนูที่ฉีดด้วยพิษงูแมวเซาเพิ่มขึ้นสูงสุดที่นาที่ที่ 45 มีปริมาณเท่ากับ 8.63 mg/L แสดงดังรูปที่ 2

รูปที่ 2 แสดงระดับ Plasma D-dimer ในหนู rat ที่ฉีดด้วยพิษงูรวม หรือ โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X ที่แยก



สำหรับการทดสอบพยาธิสภาพชิ้นเนื้อจากอวัยวะต่างๆ ของหนูหลังได้รับพิษงูแมวเซา หรือ โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X ที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางชีวเคมี แสดงพยาธิสภาพคล้ายๆ กัน คือพบลิ่มเลือด (fibrin thrombi) กระจายทั่วไปในหลอดเลือด และ glomerulus ของไต และพบการเปลี่ยนแปลงบริเวณ

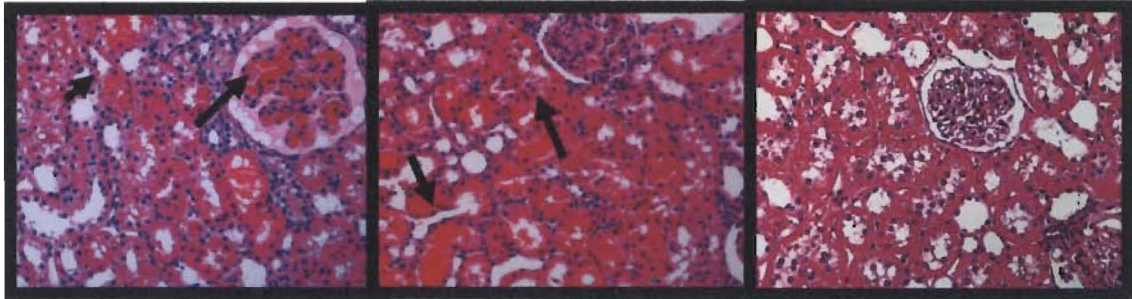
หลอดเลือดที่โตเล็กน้อย (รูปที่ 3) ในปอดพบ minimal intrapulmonary haemorrhage มีการรวมกลุ่มของ inflammatory cell และพบการอักเสบของเส้นเลือดที่ปอด (vasculitis) พบเซลล์ขนาดใหญ่ในม้าม อย่างไรก็ตามไม่พบพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อหัวใจ ต่อมหมวกไต และตับ (รูปที่ 4-6 ตามลำดับ)

รูปที่ 3 แสดงพยาธิสภาพชิ้นเนื้อไตที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 20 เท่า)

A) cRVV

B) pRVV-X

C) NSS



ถูกสรุซึ่งแสดงพยาธิสภาพที่พบในชิ้นเนื้อ

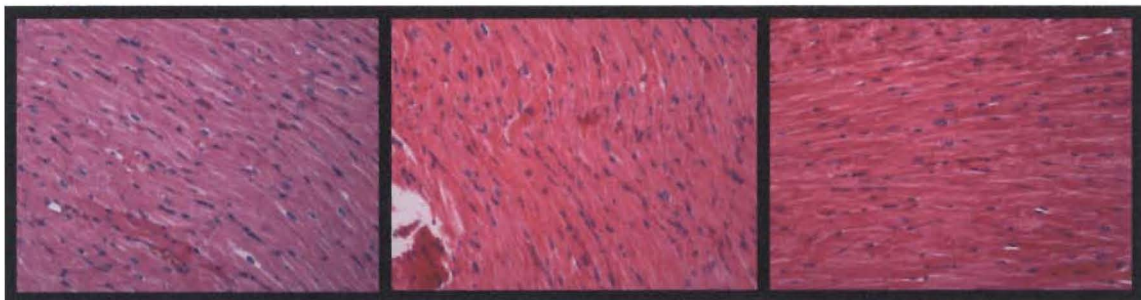
- A) ชิ้นเนื้อไตของหนูหลังได้รับพิษงูแมวเซา (cRVV) 3 ชั่วโมง
- B) ชิ้นเนื้อไตของหนูหลังได้รับ โปรตีนพิษงูบรูซิซูทรีชนิด RVV-X (purified RVV-X: pRVV-X) 3 ชั่วโมง
- C) ชิ้นเนื้อไตของหนูหลังได้รับน้ำเกลือ 3 ชั่วโมง

รูปที่ 4 แสดงชิ้นเนื้อหัวใจที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 20 เท่า)

A) cRVV

B) pRVV-X

C) NSS



- A) ชิ้นเนื้อหัวใจของหนูหลังได้รับพิษงูแมวเซา (cRVV) 3 ชั่วโมง
- B) ชิ้นเนื้อหัวใจของหนูหลังได้รับ โปรตีนพิษงูบรูซิซูทรีชนิด RVV-X (pRVV-X) 3 ชั่วโมง
- C) ชิ้นเนื้อหัวใจของหนูหลังได้รับน้ำเกลือ 3 ชั่วโมง

รูปที่ 5 แสดงชิ้นเนื้อต่อมหมวกไตที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 20 เท่า)

A) cRVV

B) pRVV-X

C) NSS



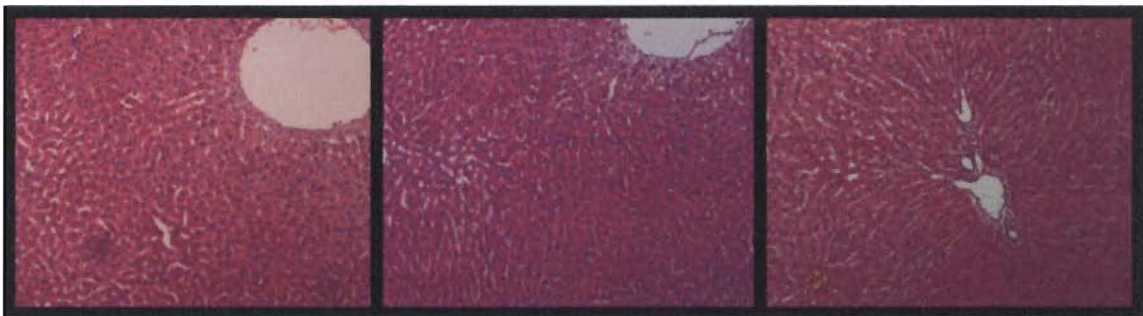
- A) ชิ้นเนื้อต่อมหมวกไตของหนูหลังได้รับพิษงูแมวเซา (cRVV) 3 ชั่วโมง
- B) ชิ้นเนื้อต่อมหมวกไตของหนูหลังได้รับ โปรตีนพิษงูบริสุทธีชนิด RVV-X (pRVV-X) 3 ชั่วโมง
- C) ชิ้นเนื้อต่อมหมวกไตของหนูหลังได้รับน้ำเกลือ 3 ชั่วโมง

รูปที่ 6 แสดงชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 20 เท่า)

A) cRVV

B) pRVV-X

C) NSS

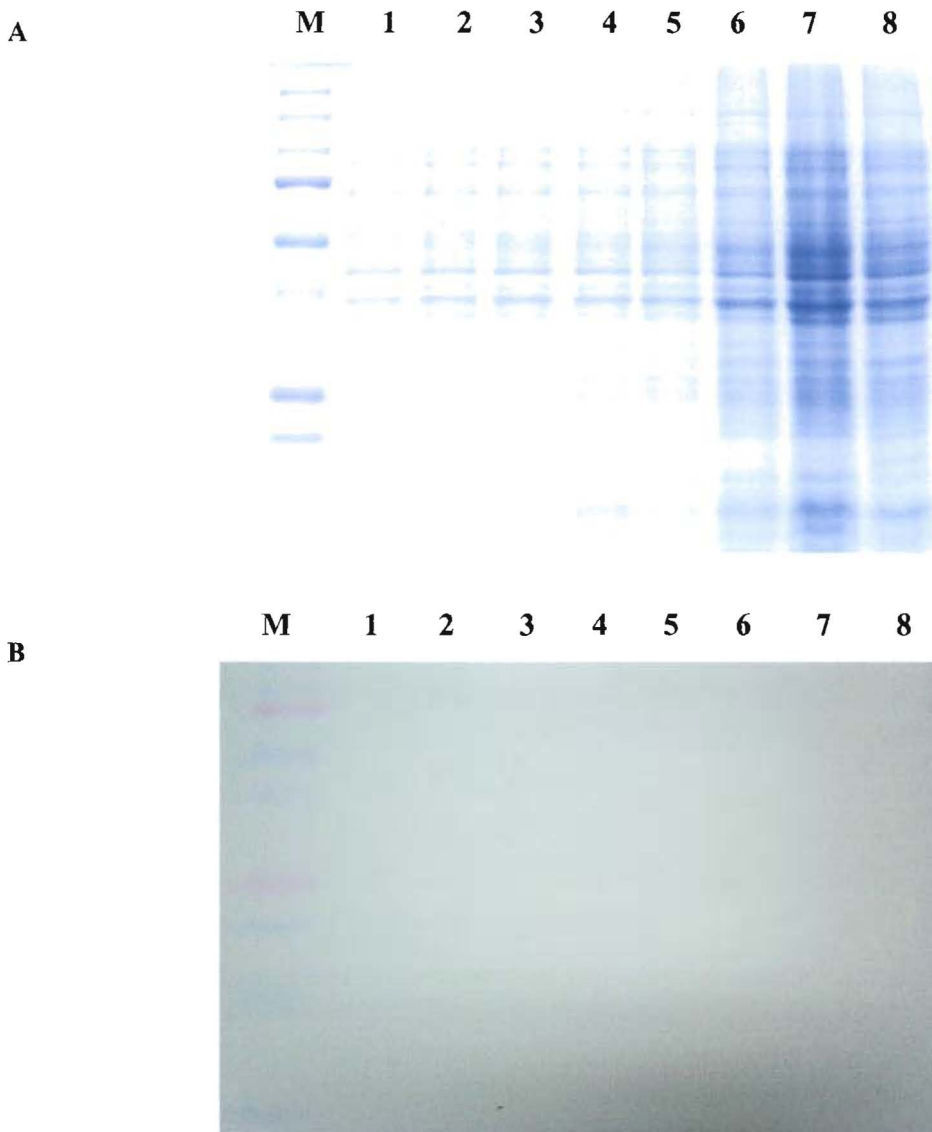


- D) ชิ้นเนื้อตับของหนูหลังได้รับพิษงูแมวเซา (cRVV) 3 ชั่วโมง
- E) ชิ้นเนื้อตับของหนูหลังได้รับ โปรตีนพิษงูบริสุทธีชนิด RVV-X (pRVV-X) 3 ชั่วโมง
- F) ชิ้นเนื้อตับของหนูหลังได้รับน้ำเกลือ 3 ชั่วโมง

### 3. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต recombinant Jerdostatin homolog protein

หลังจากที่โคลน recombinant Jerdostatin homolog disintegrin cDNA เข้า pET 32a plasmid และ transform เข้า *E. coli* BL21 พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้าง recombinant Jerdostatin homolog disintegrin protein ได้ และหลังจากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) พบว่ามีโปรตีนขนาด 24 KDa ดังนั้นเพื่อให้ได้โปรตีนในปริมาณมาก จึงจำเป็นต้องค้นหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยการค้นหา (Optimization) ปริมาณ IPTG , เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อกระตุ้นการ express rJerdostatin homolog proteins แล้วตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ rJerdostatin homolog proteins ที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับ anti-histidine tag ซึ่งพบใน pET 32a โดยแสดงผลจากการทำ western blot ดังต่อไปนี้

พบว่าในกรณีที่สร้าง rJerdostatin homolog disintegrin โดยไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG จะไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ anti-Histidine tag ได้ ดังรูปที่ 7

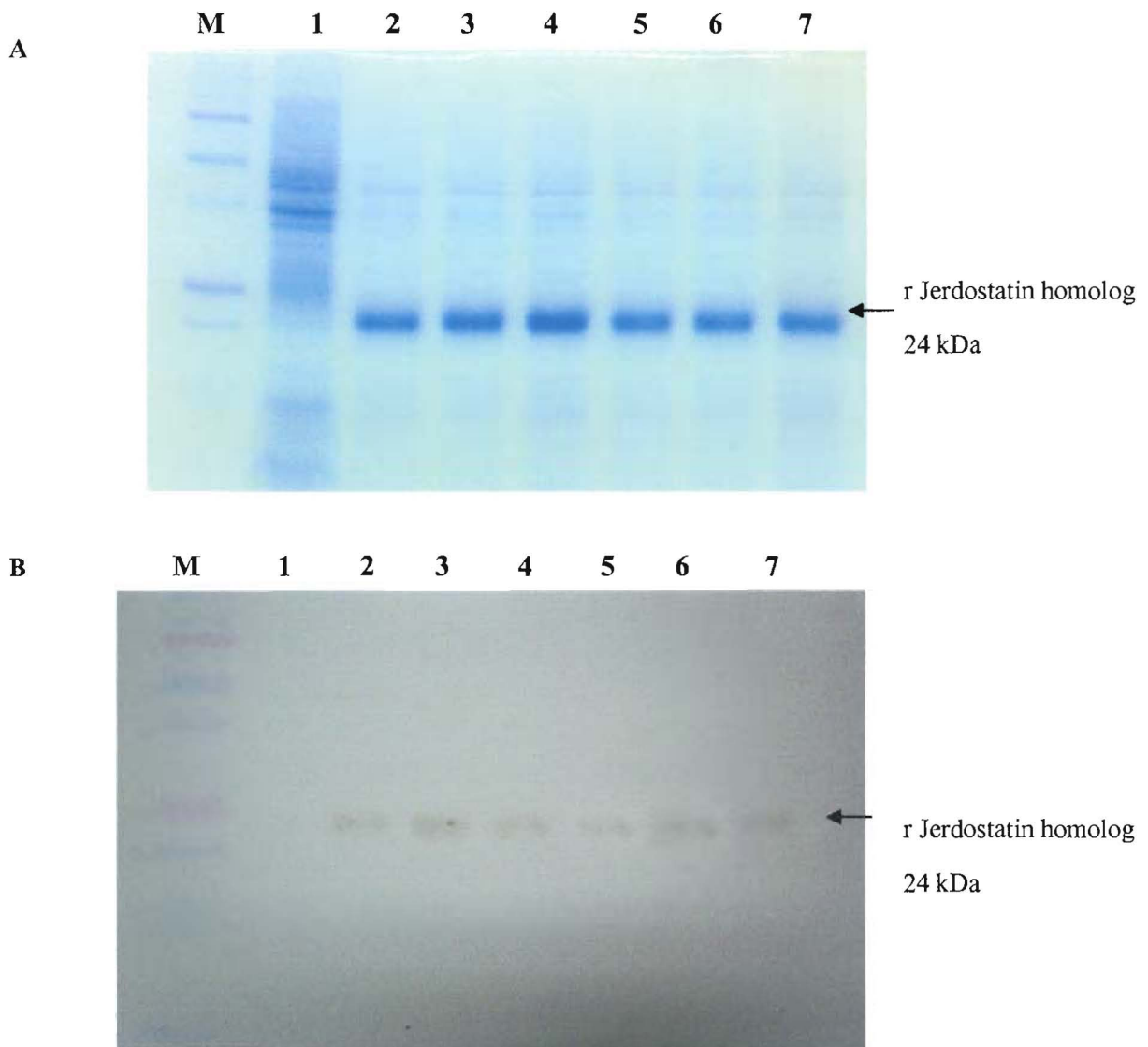


รูปที่ 7 ผลจากการกระตุ้นการสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin โดยไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ที่เวลาต่างๆ (A) แสดงผล SDS- PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel

Electrophoresis ) และ(B) แสดงผล western blot

หมายเหตุ Lane M: low molecular weight standard marker, lane 1- 8: incubated 0- 6 hour and overnight (16-20 hour ) cells lysate of recombinant Jerdostatin homolog ที่ 37 °C

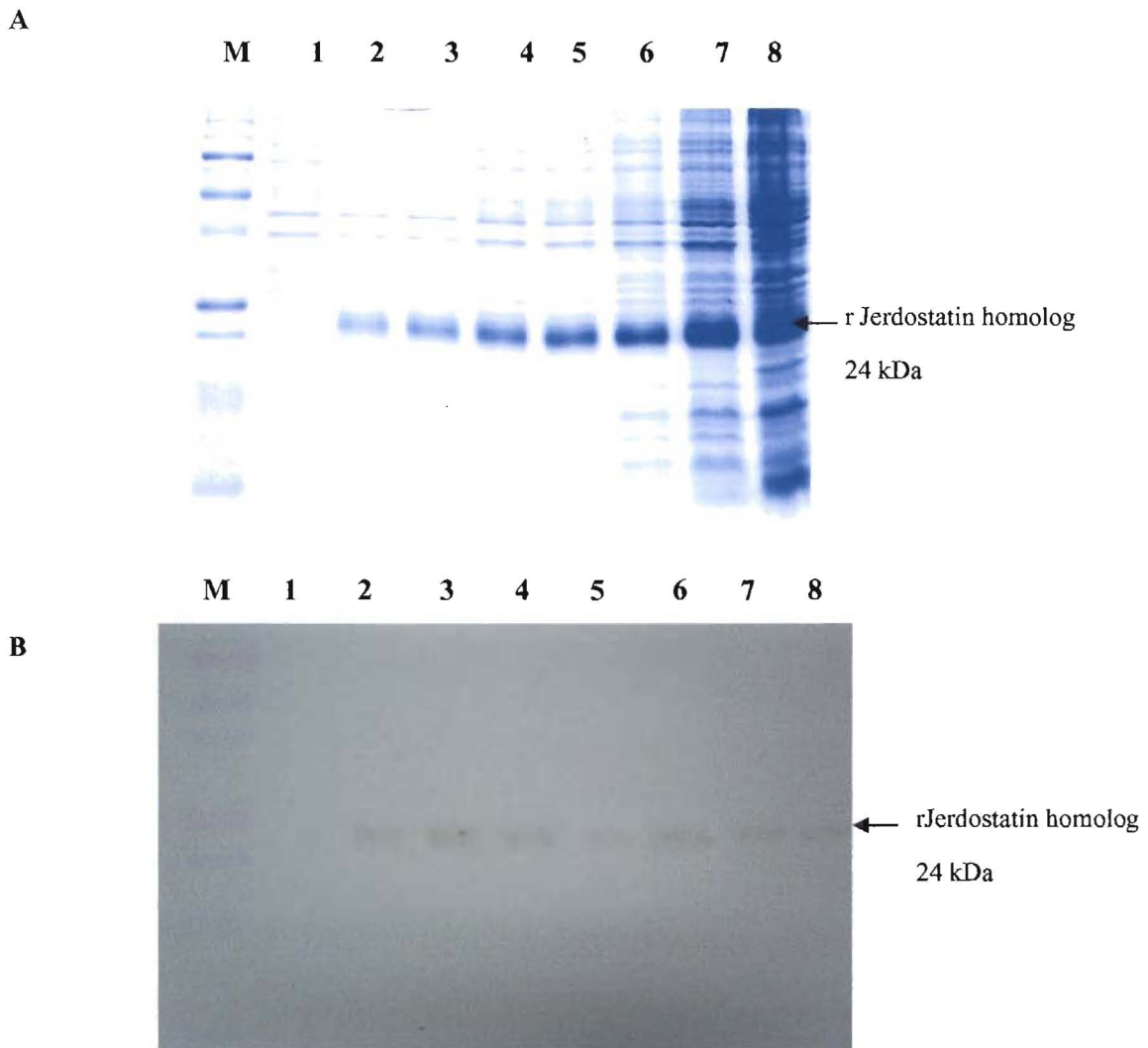
พบว่าหลังจากที่กระตุ้นด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน *E.coli* B121 สามารถสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin ได้ โดยจากการทำ SDS- PAGE และ western blot พบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 24 kDa ปรากฏขึ้นมาและสามารถทำปฏิกิริยากับ anti-Histidine tag ได้ ทั้งนี้ได้เลือกการกระตุ้น โปรตีน rJerdostatin homolog disintegrin โดยใช้ IPTG ที่ความเข้มข้น 0.7 mM ดังรูปที่ 8



**รูปที่ 8** ผลจากการกระตุ้นการสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin ด้วย IPTG ความเข้มข้นต่างๆ (A) แสดงผล SDS- PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) และ(B) แสดงผล western blot

**หมายเหตุ** Lane M: low molecular weight standard marker, lane 1: cells lysate of recombinant Jerdostatin homolog without of IPTG และ lane 2- 7: cells lysate of recombinant Jerdostatin homolog with IPTG ในปริมาณ 0.2, 0.5, 0.7, 1, 1.2 และ 1.5 mM ตามลำดับโดยใช้อุณหภูมิที่ 37 °C

พบว่าหลังจากที่กระตุ้นด้วย 0.5 mM IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน *E.coli* BL21 สามารถสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin ได้ โดยจากการทำ SDS- PAGE และ western blot พบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 24 kDa ปรากฏขึ้นมาและสามารถทำปฏิกิริยากับ anti-Histidine tag ได้ ทั้งนี้ได้เลือกการกระตุ้นโปรตีน โดยใช้เวลาที่ 5 ชั่วโมง ดังรูปที่ 9



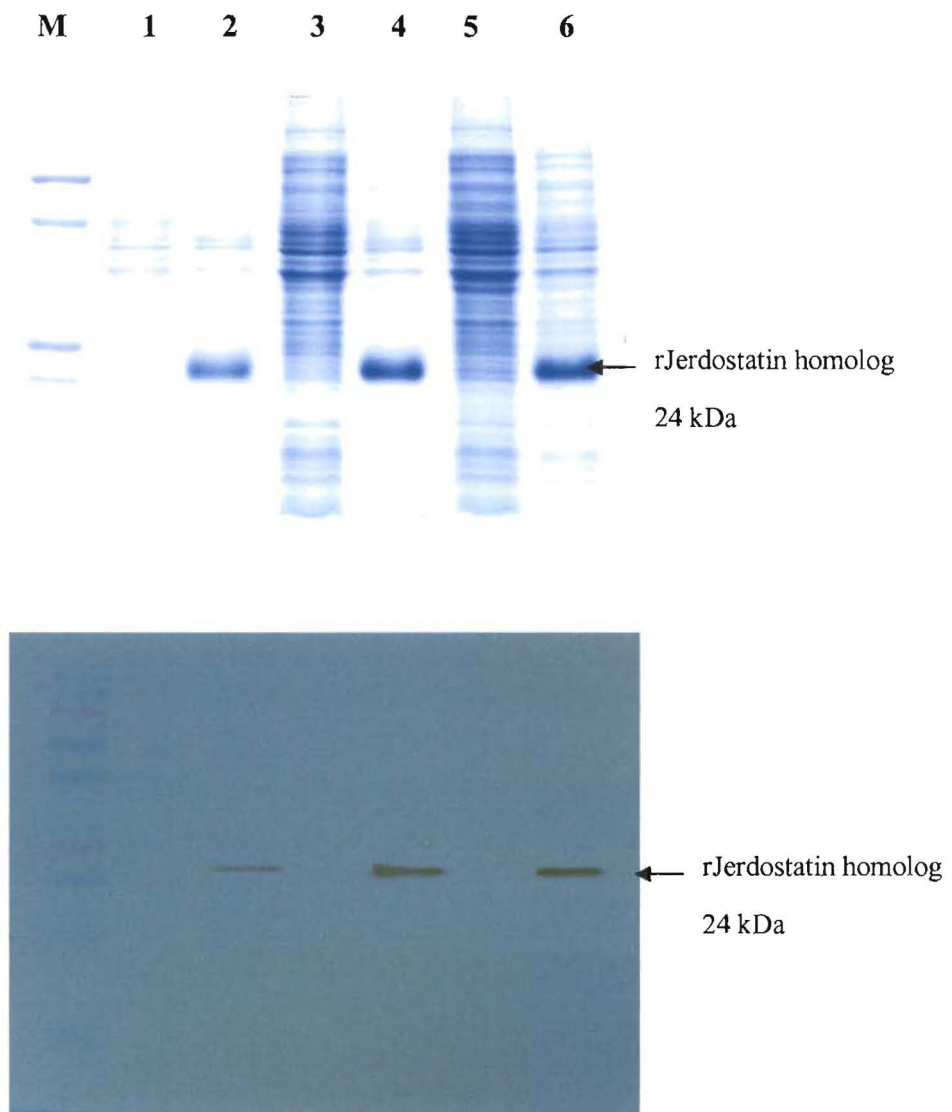
**รูปที่ 9 ผลจากการกระตุ้นการสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin ด้วยเวลาต่างๆ**

(A) แสดงผล SDS- PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis ) และ(B) แสดงผล western blot

หมายเหตุ Lane M= low molecular weight standard marker, lane 1- 8: incubated 0- 6 ชั่วโมง และ overnight (16-20 ชั่วโมง ) ของ cells lysate of recombinant Jerdostatin homolog ตามลำดับ โดยใช้ 0.5 mM IPTG โดยใช้อุณหภูมิที่ 37 °C



พบว่าหลังจากที่กระตุ้นด้วย 0.5 mM IPTG ใน *E.coli* BL21 สามารถสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin ได้ โดยจากการทำ SDS- PAGE และ western blot พบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 24 kDa ปรากฏขึ้นมาและสามารถทำปฏิกิริยากับ anti-Histidine tag ได้ ทั้งนี้ได้เลือกการกระตุ้นโปรตีน โดยใช้อุณหภูมิที่ 30 °C ดังรูปที่ 10



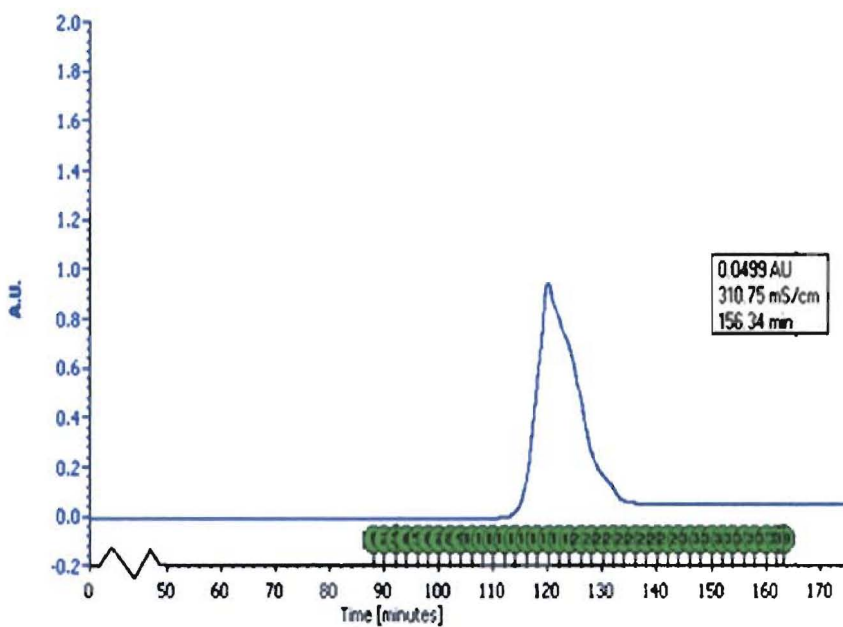
รูปที่ 10 ผลจากการกระตุ้นการสร้าง rJerdostatin homolog disintegrin ด้วยอุณหภูมิต่างๆ

(A) แสดงผล SDS- PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) และ(B) แสดงผล western blot

หมายเหตุ Lane M: low molecular weight standard marker, lane 1, 3, และ 5: incubated 25, 30 และ 37 °C cells lysate of recombinant Jerdostatin homolog โดยปราศจาก 0.5 mM IPTG, Lane 2, 4, และ 6: incubated 25, 30 และ 37 °C cells lysate of recombinant Jerdostatin homolog ในปริมาณ 0.5 mM IPTG

ดังนั้นสรุปได้ว่าการกระตุ้น express recombinant Jerdostatin homolog protein ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือการเลือกใช้ 0.7 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 30°C ในเวลา 5 ชั่วโมง และหลังจากนั้นจึงนำผลที่ได้ไป purified protein โดยวิธี Affinity chromatography ของ TALON<sup>R</sup> Metal Affinity Resin ต่อไป

#### 4 การแยกโปรตีนเพียงชนิด recombinant Jerdostatin homolog protein ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography



รูปที่ 11 แสดงผลการ purified rJerdostatin homolog protein โดยใช้วิธี Affinity chromatography ของ TALON<sup>R</sup> Metal Affinity Resin

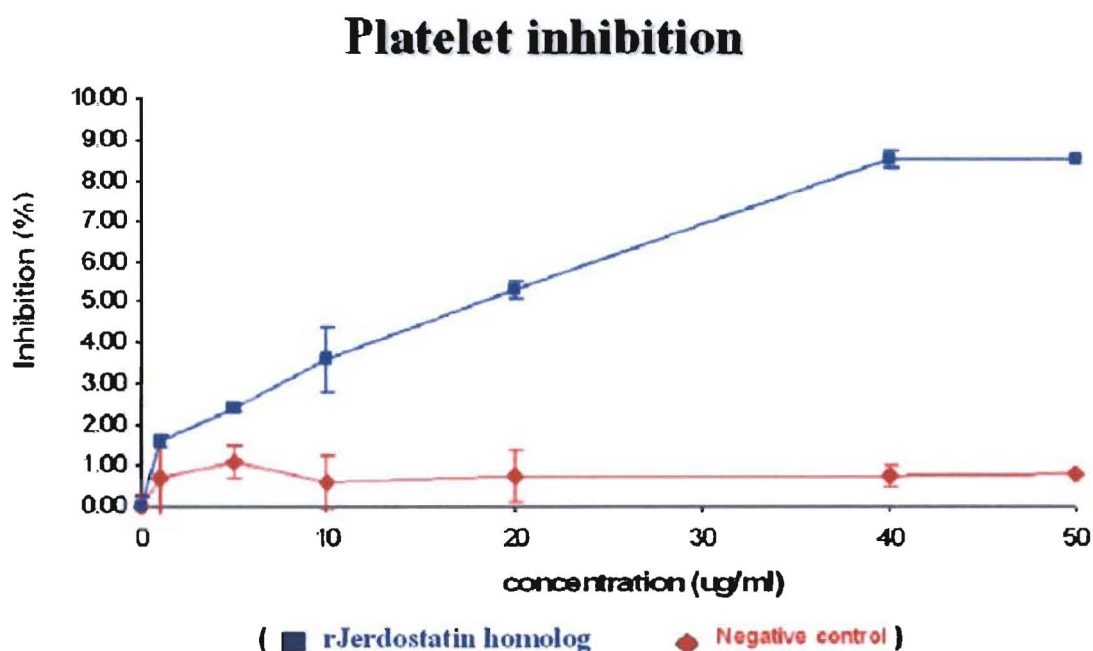
จากรูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่า rJerdostatin homolog protein ที่บริสุทธิ์แล้วจะหลุดออกมาอยู่ใน Fraction ที่ 13-39 โดย Fraction ที่ 17 มีปริมาณมากที่สุด และเมื่อนำ pooled fraction ของ rJerdostatin homolog protein มาทำให้โปรตีนคืนสภาพเดิมในธรรมชาติหรือที่เรียกว่า refold โดยใช้วิธี Dialysis แล้วเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ Amicon<sup>R</sup> Ultra-15 centrifugal Filter Devices และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit ในแต่ละขั้นตอนได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการ dialysis มีการสูญเสีย rJerdostatin homolog protein เพียง 0.56 mg และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ rJerdostatin homolog protein โดยใช้ Amicon<sup>R</sup> Ultra-15 centrifugal Filter Devices พบว่ามีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นถึง 2.13 เท่า ดังนั้นสรุปได้ว่ามี rJerdostatin homolog protein ที่สามารถนำไปใช้ใน

การทำ platelet aggregation ได้ 8.57mg ในการเลี้ยงเซลล์ 1 ลิตร แล้วจึงทดสอบคุณสมบัติของ rJerdostatin homolog protein ต่อไป

| Purified (mg) | Dialysis (mg) | Concentrate (mg) | Wash concentrate (mg) |
|---------------|---------------|------------------|-----------------------|
| 4.52          | 3.96          | 8.43             | 0.14                  |

ตารางที่ 1 แสดงผลการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA<sup>TM</sup> Protein Assay kit

5 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนพืษงูบริสุทธิ์ชนิด recombinant Jerdostatin homolog protein ในการยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยวิธี platelet aggregation assay



รูปที่ 12 แสดงผลของ rJerdostatin homolog protein ต่อการยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด

| Concentration<br>of recombinant<br>Jerdostatin homolog( $\mu\text{g/ml}$ ) | $\bar{X}$<br>( % inhibition ) |      |      | Mean $\pm$ SD<br>( Standard Deviation ) | SE<br>( Standard Error ) |
|--|-------------------------------|------|------|---|--------------------------|
|  | N1                            | N2   | N3   | ( % inhibition )                        |                          |
| 1  | 1.36                          | 1.85 | 1.64 | 1.62 $\pm$ 0.25                         | 0.14                     |
| 5  | 2.46                          | 2.26 | 2.54 | 2.42 $\pm$ 0.14                         | 0.08                     |
| 10   | 3.58                          | 3.70 | 3.56 | 3.61 $\pm$ 0.08                         | 0.05                     |
| 20   | 4.88                          | 4.87 | 6.24 | 5.33 $\pm$ 0.79                         | 0.46                     |
| 40   | 8.46                          | 8.41 | 8.76 | 8.54 $\pm$ 0.19                         | 0.11                     |
| 50   | 8.47                          | 8.43 | 8.78 | 8.56 $\pm$ 0.19                         | 0.11                     |

ตารางที่ 2 แสดงผลการยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดในแต่ละความเข้มข้นของ rJerdostatin homolog protein และแสดงค่าSD , SE โดย N แทนคนปกติที่ทำการทดลอง

| Concentration of<br>BSA<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | X<br>(% inhibition) |      |      | mean $\pm$ SD<br>(Standard Deviation) | SE<br>(Standard Error) |
|---|---------------------|------|------|---------------------------------------|------------------------|
|   | N1                  | N2   | N3   | (% inhibition)                        |                        |
|   |                     |      |      |                                       |                        |
| 1   | 1.05                | 0.47 | 0.58 | 0.70 $\pm$ 0.31                       | 0.18                   |
| 5   | 0.47                | 0.59 | 2.25 | 1.10 $\pm$ 0.99                       | 0.57                   |
| 10  | 0.52                | 1.03 | 0.26 | 0.60 $\pm$ 0.39                       | 0.23                   |
| 20  | 1.14                | 1.14 | 0.00 | 0.76 $\pm$ 0.66                       | 0.38                   |
| 40  | 0.00                | 1.07 | 1.18 | 0.75 $\pm$ 0.65                       | 0.38                   |
| 50  | 1.00                | 0.56 | 0.91 | 0.82 $\pm$ 0.23                       | 0.13                   |

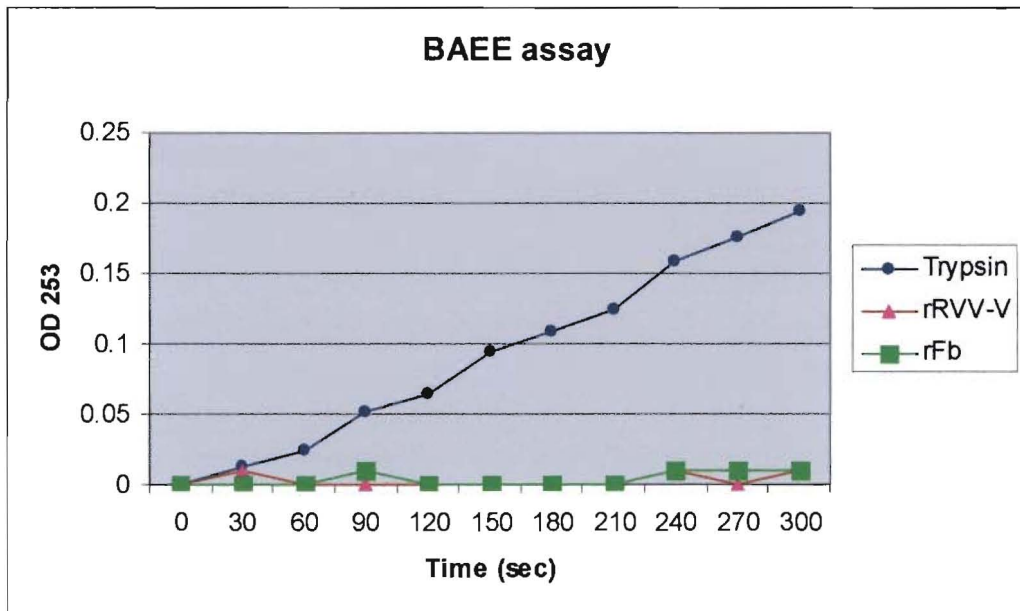
ตารางที่ 3 แสดงผลการยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดในแต่ละความเข้มข้นของ BSA ซึ่งใช้เป็น negative control และแสดงค่า SD , SE โดย N แทนคนปกติที่ทำการทดลอง

ผลที่ได้จากตาราง 2 แสดงให้เห็นว่า rJerdostatin homolog protein เมื่อถูกกระตุ้นด้วย collagen 2  $\mu\text{g/ml}$  จะมีผลต่อการยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุดด้วยปริมาณ 50  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (ตาราง 3) อย่างมีนัยสำคัญ และสามารถสรุปผลเปรียบเทียบการยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดระหว่าง rJerdostatin homolog protein กับ negative control ซึ่งแสดงได้ในรูปที่ 12

ดังนั้นสรุปได้ว่า rJerdostatin homolog protein ซึ่งยังไม่เคยพบมาก่อนใน *Daboia russellii siamensis* เป็นโปรตีนที่มี active site เป็น RTS จัดอยู่ในกลุ่มของ short disintegrin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กมากประกอบด้วย amino acid จำนวน 43 ตัว มี 8 cysteine residues และ 4 disulfide bond ซึ่งการมี cysteine ในจำนวนน้อยเช่นนี้ส่งผลให้โปรตีนสามารถคืนสภาพดั้งเดิมในธรรมชาติได้ง่ายเมื่อทำ dialysis ถึงแม้ว่าการเลี้ยงเซลล์ใน *E.coli* จะไม่มี post-translation แต่เมื่อพิจารณา amino acid sequence พบว่าไม่มี amino acid ที่เป็น Asn-X-Thr แสดงว่าโปรตีนนี้ไม่มี N- glycosylation ซึ่งอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้โปรตีนนี้มี activity ต่อการ inhibition Platelet aggregation

## 6 การทดสอบการทำงานของ recombinant RVV-V และ recombinant Serine $\beta$ -fibrinogenase

พบว่าทั้ง recombinant RVV-V และ recombinant Serine  $\beta$ -fibrinogenase ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ BAEE ได้ ซึ่งแตกต่างจาก trypsin ซึ่งเป็น control นั้นสามารถทำปฏิกิริยาได้ (รูปที่ 13 ) นั้นอาจหมายถึงการ refold ที่ไม่ถูกต้องของ recombinant protein ทั้ง 2 ตัว ซึ่งทางผู้วิจัยจำเป็นต้องหาวิธีอื่นที่จะให้ได้มาซึ่ง active recombinant protein ต่อไป



รูปที่ 13 การทดสอบการทำงานของ recombinant RVV-V และ recombinant Serine  $\beta$ -fibrinogenase ด้วย BAEE assay โดยใช้ trypsin เป็น control

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของโปรตีนพิษงูบรูซิทริกชนิด RVV-X ในการกระตุ้นพลาสมาชนิดต่างๆ ให้แข็งตัวด้วยวิธี APTT พบว่าโปรตีนพิษงูบรูซิทริกชนิด RVV-X ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.60 ถึง 83.33 ng/ml สามารถกระตุ้นให้พลาสมาปกติแข็งตัวเร็วกว่าในหลอดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยถ้าความเข้มข้นของโปรตีนพิษงูบรูซิทริกชนิด RVV-X สูงจะใช้เวลาในการกระตุ้นให้พลาสมาปกติแข็งตัวเร็วกว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่า โดยเฉพาะพลาสมาของผู้ป่วยโรค hemophilia ชนิด A (ขาด factor VIII) ซึ่งปกติพลาสมาของผู้ป่วยโรคนี้จะใช้เวลานานประมาณ 5 ชั่วโมงในการทำให้พลาสมาแข็งตัว แต่เมื่อนำมาทดสอบกับโปรตีนพิษงูบรูซิทริกชนิด RVV-X ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าใช้เวลาในการทำให้พลาสมาแข็งตัวภายในเวลาใกล้เคียงกับที่ทดสอบในพลาสมาของคนปกติ ดังนั้นโปรตีนพิษงูชนิดนี้จึงน่าสนใจที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับโรคเลือดแข็งตัวช้า

เนื่องจาก coagulation factor X เป็น substrate ของ RVV-X ดังนั้นถ้านำพลาสมาที่ขาด coagulation factor ชนิดนี้ (factor X deficiency plasma) มาทดสอบกับ RVV-X ก็ไม่ควรจะเกิดการแข็งตัวของพลาสมาขึ้นได้ อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบพบว่าโปรตีนพิษงูบรูซิทริกชนิด RVV-X ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 83.33 ถึง 666.67 ng/ml สามารถกระตุ้นให้พลาสมาที่ขาด coagulation factor X แข็งตัวได้ และใช้เวลาในการทำให้พลาสมาแข็งตัวได้เร็วกว่าในหลอดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการแยก coagulation factor X ออกให้หมดจากพลาสมาอาจเป็นไปได้ยาก ดังนั้นเพียงแค่มีย coagulation factor X ปนมาเพียงเล็กน้อยก็อาจสามารถทำให้ RVV-X สามารถกระตุ้นให้พลาสมาแข็งตัวได้ หรืออาจเป็นไปได้ที่ RVV-X อาจสามารถกระตุ้นสารอื่นที่อยู่ในพลาสมา นอกเหนือจาก coagulation factor X ซึ่งอาจนำไปสู่การทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัวได้เช่นกัน ซึ่งน่าจะมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

ส่วน recombinant protein ไม่สามารถกระตุ้นทำงานได้ อาจเกิดจากการที่ RVV-X และ RVV-V เป็น glycosylated molecular ทั้ง heavy และ light chain และการผลิต recombinant proteins ดังกล่าวผลิตขึ้นในแบคทีเรีย *E.coli* ซึ่งไม่มี glycosylation ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน ดังนั้นการผลิต recombinant glycosylated protein อาจต้องผลิตใน Eukaryotic system นอกจากนี้ อาจเกิดจากในขั้นตอน refolding ของ recombinant proteins อาจไม่เหมือน native RVV-X จึงไม่สามารถทำงานได้ อย่างไรก็ตาม recombinant proteins ที่ผลิตได้ น่าสนใจที่จะนำมาผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไป

จากคุณสมบัติของโปรตีนพิษงูบรูซิทริกชนิด RVV-X ที่มีความสามารถในการกระตุ้นพลาสมาชนิดต่างๆ ให้แข็งตัวได้ด้วยวิธี APTT ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนชนิดนี้ในการกระตุ้นให้เลือดแข็งตัวด้วยวิธี VCT พบว่า RVV-X ที่ความเข้มข้น 0.2 µg/ml สามารถกระตุ้นให้เลือด

ของทั้งคนปกติและของผู้ป่วยโรค hemophilia ชนิด A ที่มี FVIII inhibitor แข็งตัวได้ภายในเวลา 2 นาที ซึ่งเลือดของคนปกติใช้เวลาแข็งตัวประมาณ 20 นาที ส่วนเลือดของผู้ป่วยโรค hemophilia ชนิด A จะใช้เวลานานถึง 260 นาที ในการแข็งตัว ซึ่งอาจเสี่ยงต่อภาวะการเสียเลือดมาก ดังนั้นโปรตีนพิษชนิดนี้จึงน่าสนใจที่จะนำมาใช้ประโยชน์เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยโรค hemophilia

rJerdostatin homolog protein ซึ่งยังไม่เคยพบมาก่อนใน *Daboia russellii siamensis* เป็นโปรตีนที่มี active site เป็น RTS จัดอยู่ในกลุ่มของ short disintegrin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กมาก ประกอบด้วย amino acid จำนวน 43 ตัว มี 8 cysteine residues และ 4 disulfide bond ซึ่งการมี cysteine ในจำนวนน้อยเช่นนี้ส่งผลให้โปรตีนสามารถคืนสภาพดั้งเดิมในธรรมชาติได้ง่ายเมื่อทำ dialysis ถึงแม้ว่าการเลี้ยงเซลล์ใน *E.coli* จะไม่มี post-translation แต่เมื่อพิจารณา amino acid sequence พบว่าไม่มี amino acid ที่เป็น Asn-X-Thr แสดงว่าโปรตีนนี้ไม่มี N-glycosylation ซึ่งอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้โปรตีนนี้มี activity ต่อการ inhibition Platelet aggregation



## บรรณานุกรม

1. กระทรวงสาธารณสุข รายงานเฝ้าระวังโรค ปี 2546
2. Nuchprayoon I, Sai-Ngam A, Suntrarachun S, Noiphrom J, Pakmanee N, Chanhomel, Nuchprayoon S, Sitprija V. (2001) Molecular cloning of phospholipase A2 from a Thai Russell's viper venom gland cDNA library. J Med Assoc Thai.;84 Suppl 1:S99-105.
3. Funk C, Gmur J, Herold R, Straub PW. (1971) Reptilase-R: a new reagent in blood coagulation. British Journal of Haematology. 21: 43-52.
4. Matsuda M, Saeki E, Kasamatsu A, Nakamikawa C, Manabe S, Samejima Y. (1985) Fibrinogen characterized by defective release of fibrinopeptide A. Thrombosis Research. 37: 379-390.
5. Sharp AA, Esnouf Mp. (1968) A new approach to anticoagulant therapy? Lancet. 1: 859.
6. Stocker K, Fischer H, Meier J, Brogli M, Svendsen L. (1987) Characterization of the protein C activator Protac from the venom of the southern copperhead (*Agkistrodon contortrix*) snake. Toxicon. 25: 239-252.
7. Brettler DB. (1995) Inhibitors of factor VII and IX. Haemophilia. 1: 35-9.
8. Hutton RA, Warrell DA. (1993) Action of snake venom components on the haemostatic system. Blood Reviews. 7:176-89.
9. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. (1986) The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood. 68: 869-74.
10. Quick AJ. (1971) Thromboplastin generation: effect of the Bell-Alton reagent and Russell viper venom on prothrombin consumption. American Journal of Clinical Pathology. 55: 555-60.
11. Mammen EF. (1983) Seminars in Thrombosis and Hemostasis. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 9:1-72.
12. Tans G and Rosing J. (2001) Snake venom activators of factor X: an overview. Haemostasis; 31(3-6):225-33.

## ประวัตินักวิจัยและคณะ

## ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

- ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย) รศ.นพ.ดร. อิศรางค์ นุชประยูร  
(ภาษาอังกฤษ) Issarang Nuchprayoon M.D., Ph.D., FAAP.
- หมายเลขประจำตัวประชาชน  
3 1009 00931 69 1
- ตำแหน่งปัจจุบัน  
รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail  
หน่วยปฏิบัติการวิจัยพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
โทรศัพท์ 0-2256-4949 โทรสาร 02-256-4949  
E-mail: [fmedinp@md2.md.chula.ac.th](mailto:fmedinp@md2.md.chula.ac.th)
- ประวัติการศึกษา

| มหาวิทยาลัย                             | ปริญญา  | สาขาวิชา                             | ปีที่ได้รับ<br>พ.ศ. |
|---|---|--------------------------------------|---------------------|
| จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                   | แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)                    |                                      | 2531                |
| Children's Hospital of Michigan, USA    | Diplomate of the American Board of Pediatrics               | General Pediatrics                   | 2534                |
| Johns Hopkins University Hospital, USA  | Diplomate of the American Board of Pediatrics               | Pediatric Hematology-Oncology        | 2539                |
| Johns Hopkins University, USA           | Doctor of Philosophy (Ph.D.)                                | Human Genetics and Molecular Biology | 2540                |
| แพทยสภา                                 | หนังสืออนุมัติแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม | สาขากุมารเวชศาสตร์                   | 2540                |
| แพทยสภา                                 | หนังสืออนุมัติแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม | สาขากุมารเวชศาสตร์โรคเลือด           | 2541                |
| University of Adelaide, South Australia | Certificate, Short course in Clinical Toxinology            | Toxinology                           | 2544                |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

6.2.1 “Molecular cloning and characterization of medically useful proteins from Russell's viper venom gland cDNA library” ได้รับทุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ (พ.ศ. 2544-2546)

6.2.2 “Mutations and haplotype analysis of the *G6PD* locus in the Southeast Asia population” ได้รับทุนจากทบวงมหาวิทยาลัย (2545)

6.2.3 “TEL-AML1 Translocation in Pediatric acute lymphoblastic leukemia: A study of target gene activation” ได้รับทุนจากทบวงมหาวิทยาลัย (2546)

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- **Nuchprayoon I**, Suktavee B, Nuchprayoon T. Red cell indices and therapeutic trial of iron in diagnostic work-up for anemia Thai females. J Med Assoc Thai. 2003; 86 suppl 2: S160-169.
- Panchareon C, Mekmullica J, Buranachonapa J, Trongjit D, **Nuchprayoon I**, Vanichsetakul P, Seksarn P, Thisyakorn U. “Efficacy and Safety of Meropenem as an Empirical Treatment for Febrile Neutropenia in Children with Cancer”. J Med Assoc Thai. 86 suppl 2: S174-178.
- Wananukul S, **Nuchprayoon I**, Seksarn P. Treatment of Kasabach-Merritt syndrome - a stepwise regimen of prednisolone dipyridamole and interferon. Int J Dermatol. 2003, In press.
- **Nuchprayoon I**, Jantaradsamee P, Tangkijvanich P, Suwanagool P, Kullavanijaya P, Janchai A, Hirsch P, Poovorawan Y. HBV DNA in serum and PBMC of patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis. Hepato-gastroenterology. 2003. (submitted)

- **Nuchprayoon I**, Sahasittiwat S, Kittikalayawong A, Chantanakafung, A. Lyophilized cryoprecipitate for bleeding children with hemophilia A. *J Med Assoc Thai.* 2002; 85 suppl 1: S5-8.
- **Nuchprayoon I**, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. *Hum Mutat.* 2002; 19(2): 185.
- Bhokaisawan N, Paritpokee N, Wiwanitkit V, Boonchlermvichian C, **Nuchprayoon I**. Serum concentrations of transferrin receptor among paediatric patients with transfusion-dependent beta-thalassaemia/haemoglobin E. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002; 96(4): 427-9.
- Nuchprayoon S, Siriyasatien P, Kraivichian K, Porksakorn C, **Nuchprayoon I**. Prevalence of parasitic infections among Thai patients at the King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2002; 85 suppl 1: S415-423.
- Boonchlermvichian C, Paritpokee N, Bhokaisawan N, **Nuchprayoon I**, Wiwanitkit V. Marked increase in serum transferrin receptor Thai children with Hb-E- beta-thalassaemia. *J Paediatr child Health.* 2002; 38(6): 601-3.
- **Nuchprayoon I**, Wongyala W, Apawongse T, Ungbumnet W, Vacharasikorn A. Response to iron therapy in children with microcytic erythrocytes. *Thai J Hematol Transfusion Med.* 2002; 12(1): 2-10.
- Sosothikul D, Shotelersuk V, Chongsrissawat V, **Nuchprayoon I**, Seksarn P. Food cobalamin malabsorption presenting with microcytic anemia – a case report. *Thai J Hematol Transfusion Med.* 2002; 12(3): 227-33.
- **Nuchprayoon I**. Population genetics of blood group (editorial). *Thai J Hematol Transfusion Med.* 2002; 12(4): 275-6.
- Fongsaran J, **Nuchprayoon I**, Yod-in S, Kupatawintu P, Kidprasirt C. Blood group in Thai blood donors. *Thai J Hematol Transfusion Med.* 2002; 12(4): 277-86.
- Sosothikul D, **Nuchprayoon I**, Mahayosnond A, Wannakrairot P, Seksarn P. Massive thymic hyperplasia mimicking lymphoma - a case report and review of literature. *Thai J Hematol Transfusion Med.* 2002; 12(4): 301-7.

- Lekagul K, **Nuchprayoon I**. Role of prophylactic antibiotics and steroid in the management of green pit viper bites in children. *Toxicon*. 2001; 39: 143.
- **Nuchprayoon I**, Sai-ngam A, Suntarachun S, Promnoi J, Pakmanee N, Chanhome L, Tritteraprapab S, Sitprija V. Molecular cloning of phospholipase A2 from a Russell's viper venom gland cDNA library. *J Med Assoc Thai*. 2001; 84 suppl 1: S99-S104.
- Sanpavat S, **Nuchprayoon I**, Kittikalayawong A, Ungbumnet W. The value of methemoglobin reduction test as a screening test for cord blood glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Med Assoc Thai*. 2001; 84 suppl 1: S91-S98.
- **Nuchprayoon I**, Seksarn P, Vanichsetakul P, O-chargeon R. Low dose intravenous immunoglobulin for acute idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *Asian Pacific J Allerg Immunol*. 2001; 19(1): 11-16.
- Lertchawanakul A, Baimai C, Siwanuwatn R, **Nuchprayoon I**, Phudhichareonrat S. Optic glioma in infancy: a case report of the youngest patient in Thailand. *J Med Assoc Thai*. 2001; 84 suppl 1: S137-S140.
- Tritteraprapab S, **Nuchprayoon I**, Porksakorn C, Poovorawan Y, Scott AL. High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001; 95(5): 535-8.
- Wiangnon S, Chen AR, Dome J, **Nuchprayoon I**, Schmeckpeper B, Bias WB, Civin CI. Treatment of advanced retinoblastoma with syngeneic bone marrow transplantation. *Thai J Hematol Transfusion Med*. 2001; 11(1): 47-60.
- Tritteraprapab S, Thammpanyawat B, **Nuchprayoon I**, Tanamun B. Eosinophilia with low prevalence of parasitism in a rural area of Maha Sarakham province after annual mass treatment with mebendazole and albendazole. *Chula Med J*. 2000; 44 (6): 423-32.
- Hirunwitakul P, Tulvatana W, Kasetsuwan N, **Nuchprayoon I**. Eosinophilic granuloma presenting as periorbital cellulitis. *Chula. Med J*. 2000; 44(8): 607-13.

#### 6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- 6.4.1 “Cloning and purification of medically useful protein from Russell's viper venom proteins usefulness” ได้รับทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2550-2551 ทำงานวิจัยเสร็จแล้ว ร้อยละ 50

- 6.4.2 “Origins of Southeast Asian *G6PD* mutations” ได้รับทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ปี 2550 ทำงานวิจัยเสร็จแล้วร้อยละ 50
- 6.4.3 “Interaction between *GSTMI*, *GSTT1*, *CYP1A1* and *NQO1* genetic polymorphisms and pesticides exposure as risk factors for acute lymphoblastic leukemia in Thai children” ได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 2 ปี 2550 ทำงานวิจัยเสร็จแล้ว
- 6.4.4 “Molecular cloning and expression of Daboistatin a Novel RTS-disintegrin from Russell’s viper venom (*Daboia russellii siamensis*)” ได้รับทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 3 ปี 2550 ทำงานวิจัยเสร็จแล้วร้อยละ 60

## ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อผู้วิจัย (ภาษาไทย) นางสาวมณฑน์มาศ สุนทรวัฒน์  
(ภาษาอังกฤษ) Montamas Suntravat, B.Sc.

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567

โทรสาร -

E-mail: montamas@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา

| ปริญญา                | สาขาวิชา                             | มหาวิทยาลัย           | ปี พ.ศ. ที่ได้รับ |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| วิทยาศาสตร์บัณฑิต     | เทคนิคการแพทย์                       | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | 2544              |
| วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต | สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทาง<br>การแพทย์ | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | 2544-ปัจจุบัน     |

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

6. ประสบการณ์วิจัย

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Nuchprayoon S, Sanprasert V, Suntravat M, Kraivichian K, Saksirisampant W, Nuchprayoon I. 2003 Study of specific IgG subclass antibodies for diagnosis of *Gnathostoma spinigerum*. Parasitology Research. 91: 137–143.

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- “การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Cloning and purification of medically useful protein from Russell’s viper venom proteins usefulness)” เป็นผู้วิจัยร่วม



## ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อผู้วิจัย (ภาษาไทย) นายพัทธคนย์ สุขพันธุ์  
(ภาษาอังกฤษ) Pattadon Sukkapun, B.Sc.

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567

โทรสาร -

E-mail: pattadons@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา

| ปริญญา                | สาขาวิชา       | มหาวิทยาลัย           | ปี พ.ศ. ที่ได้รับ |
|-----------------------|----------------|-----------------------|-------------------|
| วิทยาศาสตรบัณฑิต      | เทคนิคการแพทย์ | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | 2546              |
| วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต | ชีวเวชศาสตร์   | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | 2544-ปัจจุบัน     |

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

6. ประสบการณ์วิจัย

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- “การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Cloning and purification of medically useful protein from Russell’s viper venom proteins usefulness)” เป็นผู้วิจัยร่วม

### ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 3

1. ชื่อผู้วิจัย (ภาษาไทย) นางสาวธัญฉิชา อ่อนดี  
(ภาษาอังกฤษ) Thunnicha Ondee, M.Sc.

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

หน่วยปฏิบัติการวิจัยด้านพิษงูและงูพิษกัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567

โทรสาร -

E-mail: kun9soon@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา

| ปริญญา              | สาขาวิชา                  | มหาวิทยาลัย                                | ปี พ.ศ. ที่ได้รับ |
|---------------------|---------------------------|--|-------------------|
| วิทยาศาสตร์บัณฑิต   | ชีววิทยา                  | มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรจน์<br>ประสานมิตร | 2543-2547         |
| วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต | อณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                      | 2548-2551         |

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

6. ประสบการณ์วิจัย

- 6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

- 6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

- 6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- 6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- “การศึกษาโปรตีนที่สำคัญในพิษงูแมวเซาเพื่อนำมาดัดแปลงใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Cloning and purification of medically useful protein from Russell’s viper venom proteins usefulness)” เป็นผู้วิจัยร่วม

# ภาคผนวก

## ผลการวิจัยในปีงบประมาณ 2550

- การแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาให้บริสุทธิ์

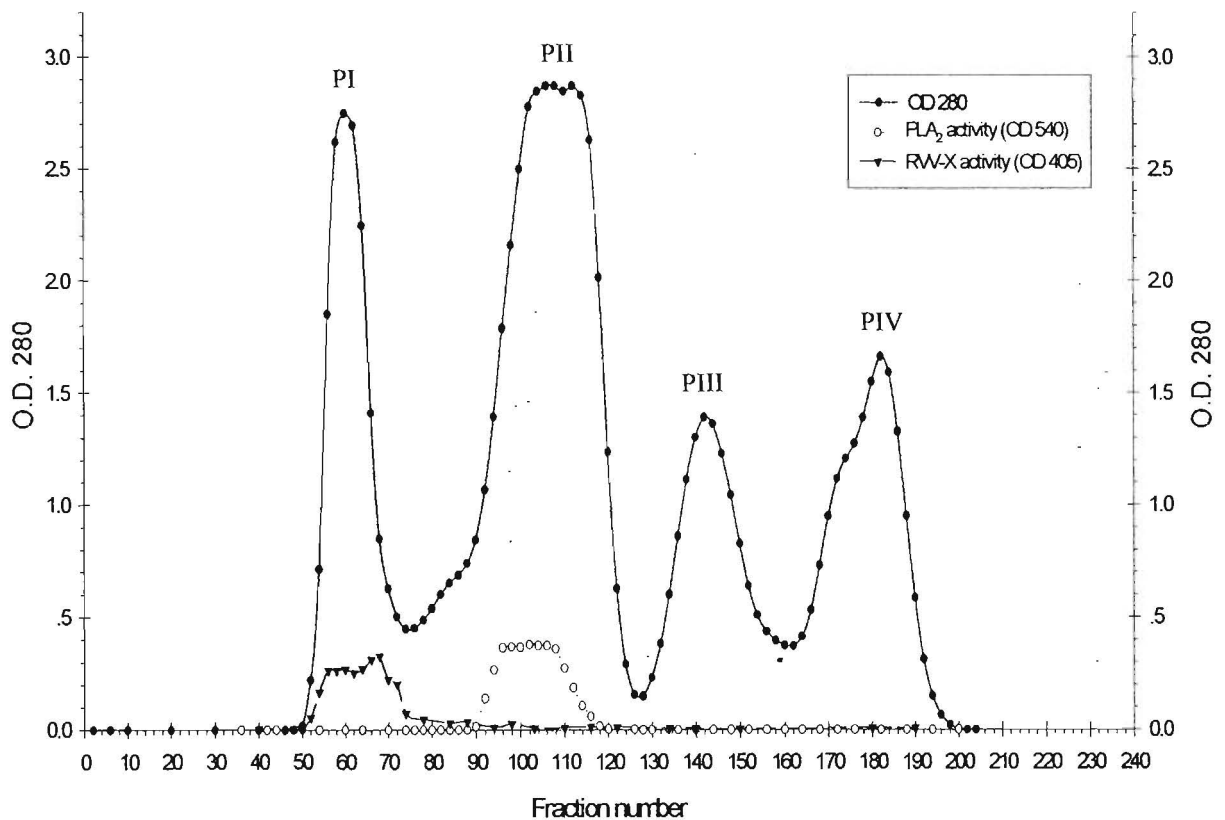
ได้ทำการแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาจากพิษงูแมวเซาแห่งที่ได้จากสถานเสาวภา โดยใช้วิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-100 พบว่าสามารถแยกโปรตีนพิษงูออกเป็น 4 กลุ่ม fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีของ RVV-X อยู่ในกลุ่มแรก (PI) ส่วน  $PLA_2$  อยู่ในกลุ่มที่ 2 (PII) (ดังรูปที่ 1)

Crude venom (400 mg protein) in 4.0 ml of 0.05M Tris-phosphate buffer containing 1mM benzamidine-HCl, pH 7.5

Flow rate = 10 ml/hr

fractions collected = 2 ml

Absorbance at 280 nm (—); RVV-X activity (—▼—);  $PLA_2$  activity (·····)



รูปที่ 1 แสดงผล Gel filtration chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาหลังจากผ่าน Sephadex G-100 chromatography column (2.6 × 70 cm)

## การแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X

หลังจากรวบรวม fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีของ RVV-X และทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Q-sepharose anion exchange column chromatography พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X ออกมาได้ โดยโปรตีนที่แยกได้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของ RVV-X (ดังรูปที่ 2)

Sephadex G-100 PI (80 mg protein) in 0.05M Tris-phosphate buffer containing 1mM benzamidine-HCl, pH 7.5

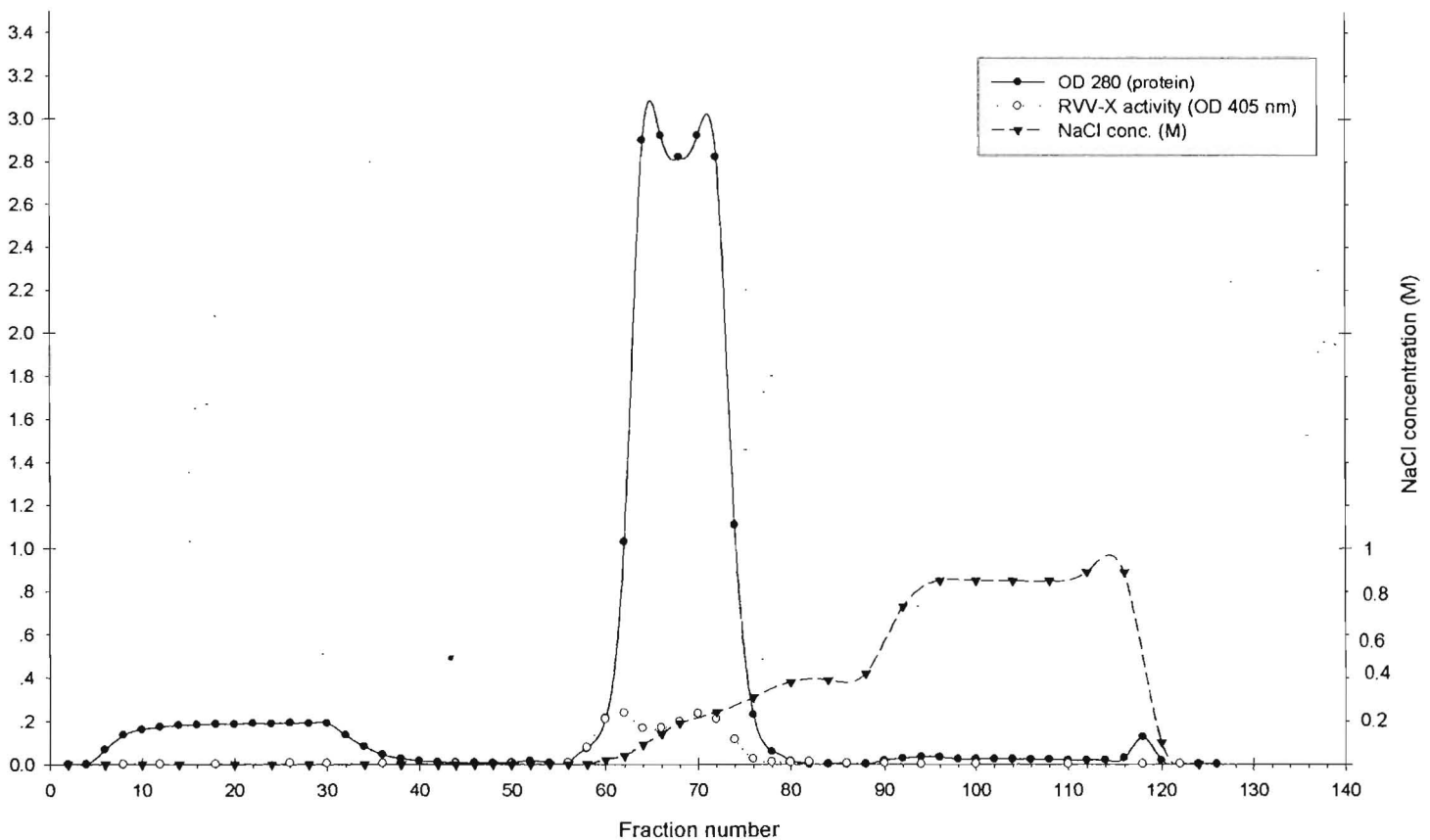
Flow rate = 1 ml/min

fractions collected = 2 ml

Elution buffer: 30 ml of 0.05 M Tris-phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mM benzamidine and 30 ml of 0.05

M Tris-phosphate buffer (pH 7.5) containing 0.5 M NaCl and 1 mM benzamidine

Absorbance at 280 nm (—); RVV-X activity (· · · · ·); NaCl conc. ( - ▼ )



รูปที่ 2 แสดงผล Anion exchange column chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Gel filtration chromatography (PI) และนำมาแยกด้วยวิธี Anion exchange column chromatography ผ่าน Q-Sephrose column

### การแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA<sub>2</sub>

หลังจากรวบรวม fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีของ PLA<sub>2</sub> ซึ่งพบว่าอยู่ในกลุ่มที่ 2 (PII) (ดังรูปที่ 1) และทำการแยกโปรตีนพิษงูให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-50 column พบว่าสามารถแยกโปรตีนพิษงูชนิด PLA<sub>2</sub> ออกมาได้ อย่างไรก็ตามยังพบโปรตีนพิษงูอื่นปนมาด้วย (ดังรูปที่ 3) จึงทำการรวบรวมแต่ละ fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของโปรตีนชนิด PLA<sub>2</sub> และทำการแยกโปรตีนพิษงูชนิด PLA<sub>2</sub> ให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Sephadex G-50 column chromatography อีกครั้ง (ดังรูปที่ 4) พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษงูชนิด PLA<sub>2</sub> ออกมาได้ โดยโปรตีนที่แยกได้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของ PLA<sub>2</sub>

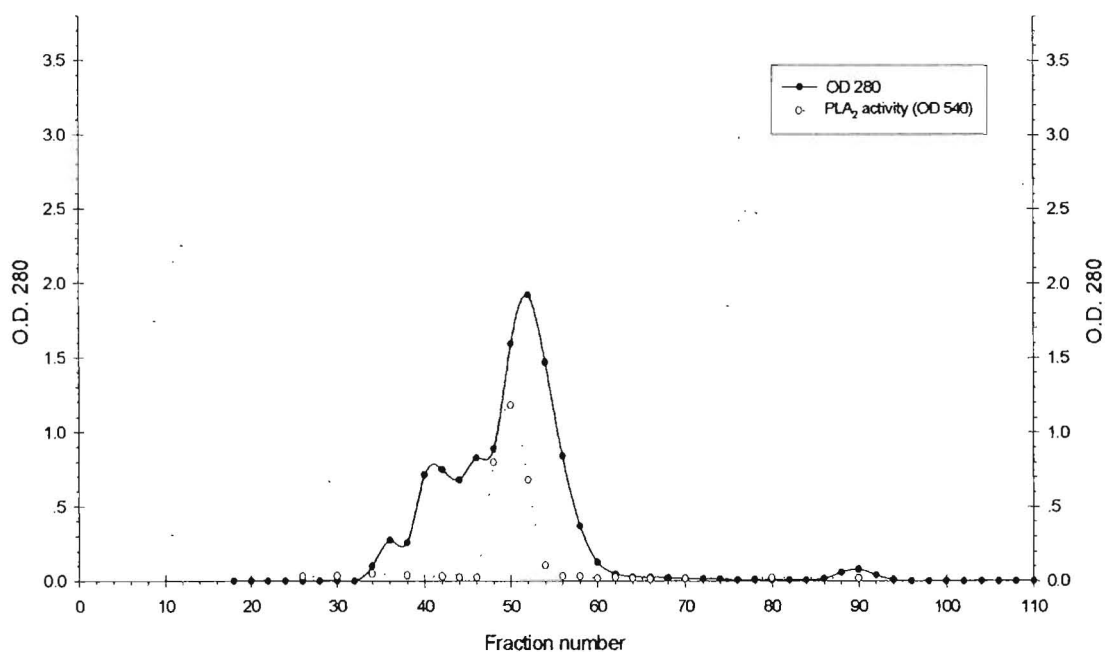
Column size :  $22/7 \times (0.8)^2 \times 100 = 200 \text{ ml}$

Flow rate = 4 ml/hr

Fractions collected = 2 ml/tube

Running buffer : 0.1M Ammonium acetate, pH 7.0

Absorbance at 280 nm (—); PLA<sub>2</sub> activity (· · · · ·)



รูปที่ 3 แสดงผล Gel filtration column chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA<sub>2</sub> ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Gel filtration chromatography (PII) และนำมาแยกต่อด้วยวิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-50 column

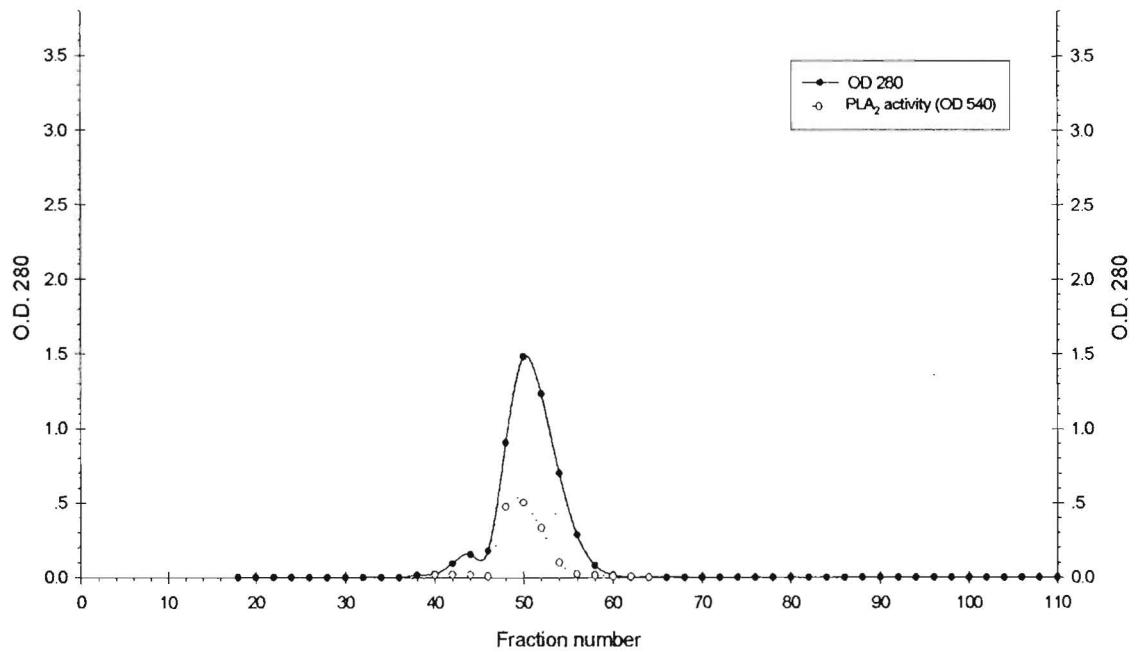
Column size :  $22/7 \times (0.8)^2 \times 100 = 200$  ml

Flow rate = 4 ml/hr

Fractions collected = 2 ml/tube

Running buffer : 0.1M Ammonium acetate, pH 7.0

Absorbance at 280 nm (—); PLA<sub>2</sub> activity (·····)

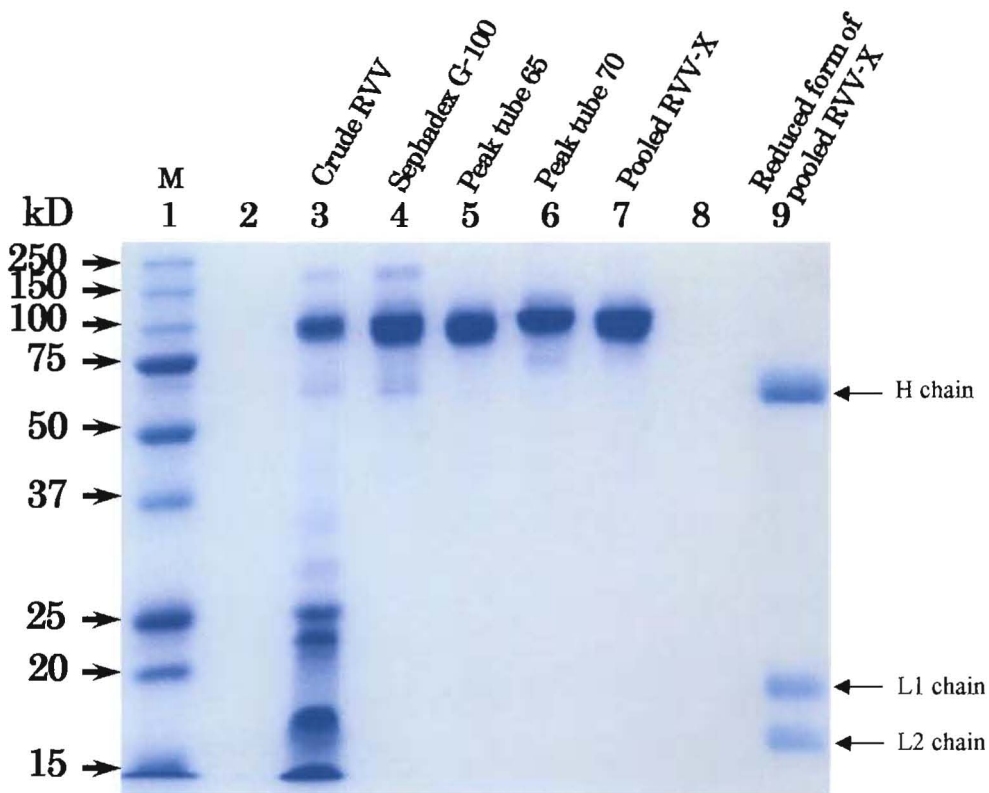


รูปที่ 4 แสดงผล Gel filtration column chromatography ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA<sub>2</sub> ผ่าน Sephadex G-50 column อีกครั้ง หลังจากผ่านการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Gel filtration chromatography ผ่าน Sephadex G-50 column

- ทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนพิษงูแต่ละชนิด

โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X

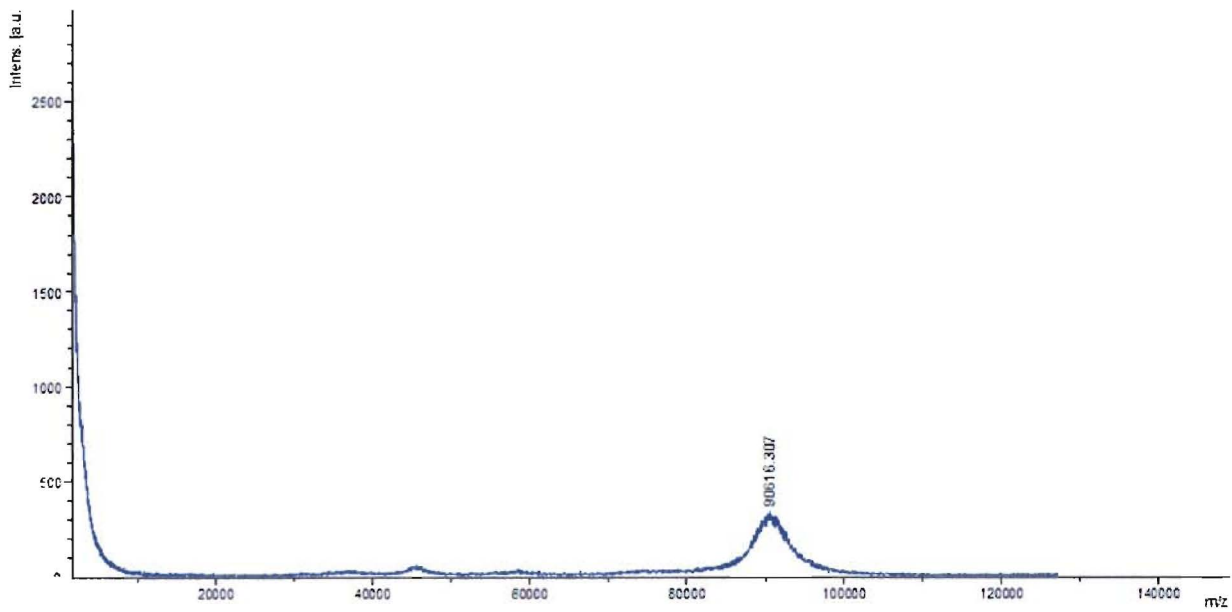
หลังจากรวบรวมแต่ละ fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของ โปรตีนชนิด RVV-X และทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ใน 12% เจล จากนั้นย้อมด้วย Coomassie brilliant blue พบว่าโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X มีความบริสุทธิ์สูง และมีขนาดโปรตีนประมาณ 90 kDa ใน non-reducing condition เมื่อนำมา run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ใน reducing condition พบว่าสามารถตัดโปรตีนออกเป็น heavy chain 1 สาย และ light chain 2 สาย ซึ่งผลเป็นไปดังที่คาดไว้ (ดังรูปที่ 5)



รูปที่ 5 แสดงผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 12% เจล ของ โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X : M = protein marker, lane 3 = crude RVV, lane 4 = fraction ที่รวบรวมจาก Sephadex G-100 (PI), lane 5-7 = purified RVV-X, lane 3-7 = non-reducing condition, lane 8 = reducing condition



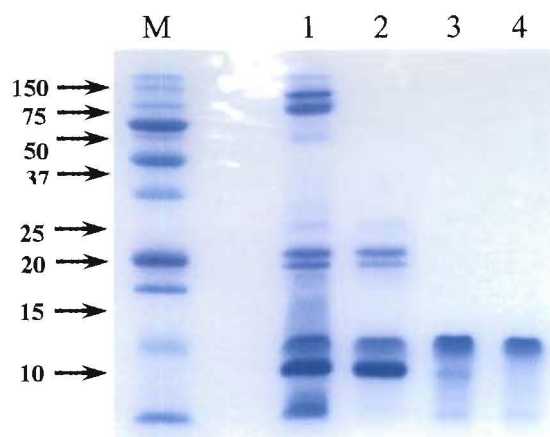
จากการยืนยันผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษชนิด RVV-X และขนาดของโปรตีนพิษ  
โดยใช้วิธี MALDI-TOF mass spectrometry (ดังรูปที่ 6) พบว่า โปรตีนพิษชนิด RVV-X มีความบริสุทธิ์  
สูง และมีขนาดโปรตีน 90 kDa



รูปที่ 6 แสดงผล MALDI-TOF mass spectrum ของ โปรตีนพิษแมวเขานิด RVV-X

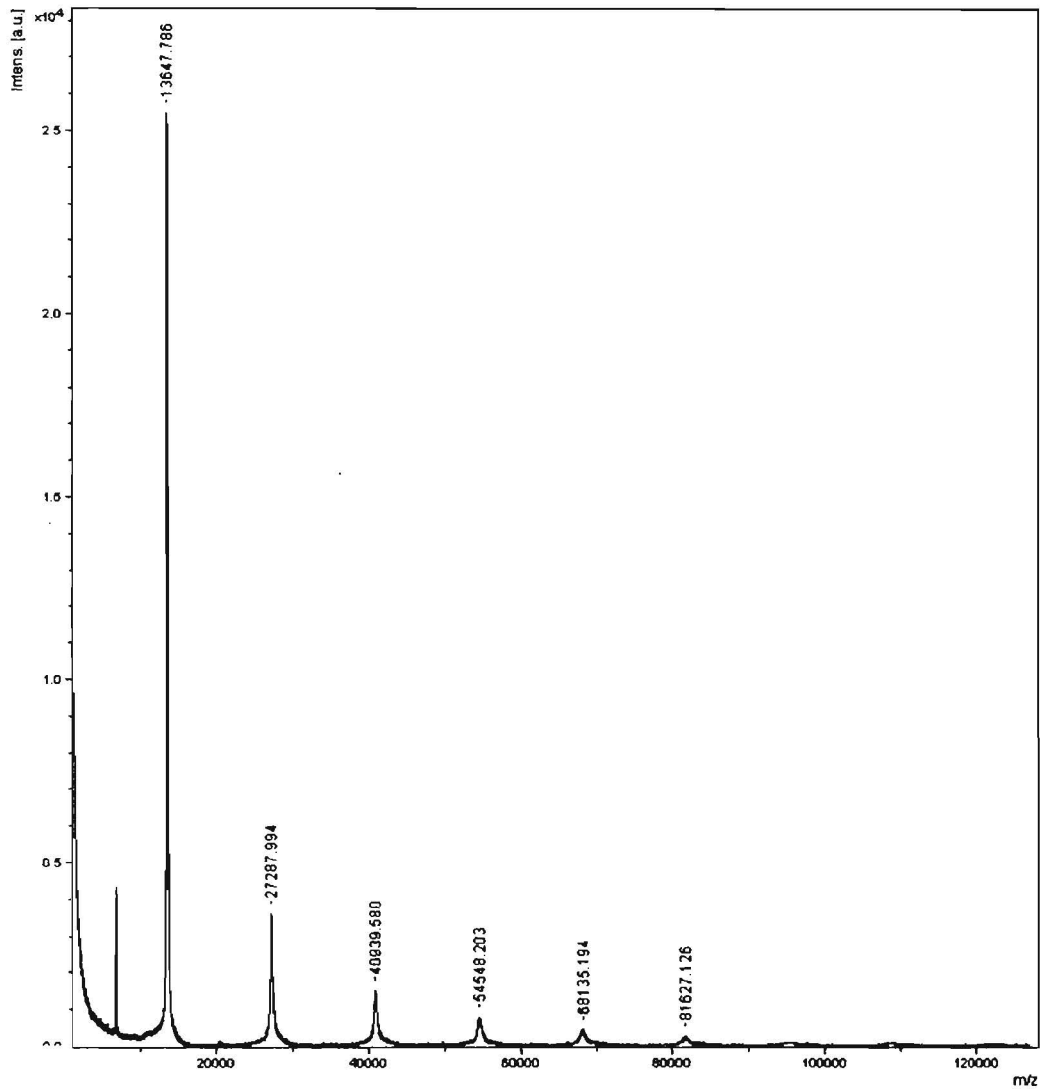
### โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA<sub>2</sub>

จากนั้นจึงทำการรวบรวมแต่ละ fraction ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะของโปรตีนชนิด PLA<sub>2</sub> และทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ใน 15% เจล ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue เพื่อทดสอบดูความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ได้อย่างคร่าวๆ (ดังรูปที่ 7) พบว่าโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA<sub>2</sub> มีความบริสุทธิ์สูง และมีขนาดโปรตีนประมาณ 14 kDa ใน non-reducing condition



**รูปที่ 7** แสดงผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 15% เจล (non-reducing condition) ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA<sub>2</sub> : M = protein marker, lane 1 = crude RVV, lane 2 = fraction ที่รวบรวมจาก Sephadex G-100 (PII), lane 3 = fraction ที่รวบรวมจาก Sephadex G-50 ครั้งที่ 1, lane 4 = purified PLA<sub>2</sub>

จากการยืนยันผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนพิษชนิด PLA<sub>2</sub> และขนาดของโปรตีนพิษงู โดยใช้วิธี MALDI-TOF mass spectrometry (ดังรูปที่ 8) พบว่า โปรตีนพิษงูชนิด RVV-X มีความบริสุทธิ์ และมีขนาดโปรตีน 14 kDa



รูปที่ 8 แสดงผล MALDI-TOF mass spectrum ของโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA<sub>2</sub>

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองในปีงบประมาณ 2550

คณะผู้วิจัยสามารถแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X และ PLA<sub>2</sub> ในพิษงูแมวเซาของไทยให้มีความบริสุทธิ์สูงได้ โดยทำการแยก โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X ด้วยวิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-100 column และแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Anion exchange column chromatography โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด RVV-X ที่แยกได้มีขนาดประมาณ 90 kDa และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สามารถกระตุ้น coagulation factor X ได้ ตรงตามดั่งที่คาดไว้

สำหรับการแยกโปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA<sub>2</sub> ใช้วิธี Gel filtration column chromatography ผ่าน Sephadex G-100 column ในครั้งแรก และแยกบริสุทธิ์ต่อผ่าน Sephadex G-50 column จำนวน 2 ครั้ง โปรตีนพิษงูแมวเซาชนิด PLA<sub>2</sub> ที่แยกได้มีขนาดประมาณ 14 kDa และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่มีความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงเกาะทางอ้อมได้ ตรงตามดั่งที่คาดไว้

โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้ จะนำไปศึกษาจะทำการหาลำดับ amino acid sequence และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล เมื่อทราบชนิดและลำดับ amino acid จะทำการเปรียบเทียบกับ clone ที่มีใน cDNA library หรือทำการ screen clone ใหม่โดยการทำ plaque lift hybridization หรือใช้ degenerate primers เพื่อนำไปสร้าง recombinant protein ที่สามารถทำงานได้เหมือนกับ โปรตีนพิษงูตามธรรมชาติต่อไป

## ผลการวิจัยในปีงบประมาณ 2551

การโคลน cDNA ของ PLA<sub>2</sub>, RVV-X, RVV-V, serine  $\beta$ -fibrinogenase และ disintegrin

- Factor X activator (RVV-X)

RVV-X heavy chain ที่โคลนได้ พบว่ามีลำดับเบส 2027 เบส สำหรับลำดับเบสด้าน 5'-end อาจยังไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม สามารถหาลำดับเบสที่ครอบคลุมการสร้าง mature peptides ของ RVV-X heavy chain ได้ แสดงดังรูปที่ 1

```
1  tcagaagattacagcgagactcattattaccagatggcagagaaattacaacaaacct
S E D Y S E T H Y Y P D G R E I T T N P
61  ccggttgaggatcactgctattatcatggacgcatccagaatgatgctcactcatctgca
P V B D H C Y Y H G R I Q N D A H S S A
121 agcatcagtgcatgcaatgggttgaaaggacatttcaagcttcgagggggagatgtacttt
S I S A C N G L K G H F K L R G E M Y F
181 attgaacccttgaagctttccaacagtggaagcccatgcagtctacaaatgatgaaacata
I E P L K L S N S E A H A V Y K Y E N I
241 gaaaaagaggatgagatccccaaaatgtgtgggtaaccagactaattgggaatcagat
E K B D E I P K M C G V T Q T N W E S D
301 aagcccatcaaaaaggcctctcagttagtttctacttctgcacaattcaacaaaatttc
K P I K K A S Q L V S T S A Q F N K I F
361 attgagcttgtcataattgtggaccacagcatggccaagaaatgcaattcaactgctaca
I R L V I I V D H S M A K K C N S T A T
421 aatacaaaaatataatgaaattgtcaacagtgcaaatgagatttttaactcttgaatatt
N T K I Y E I V N S A N E I F N P L N I
481 catgtaacattgatgtgtgtagaattttgggtgagacagagatttgattaaactgacatca
H V T L I G V E F W C D R D L I N V T S
541 tcagcagatgaaactttgaactcatttgggagaatggagagcgtcagatttgatgactcgg
S A D E T L N S F G E W R A S D L H T R
601 aaaagccatgataaatgctctgttttcaacggacatgagattcgatttaaacacttggga
K S H D N A L L F T D M R P D L N T L G
661 atcactttcttagctggcattgtgcccaggcatatcgttctgttagaaattgttcaggaaaca
I T P L A G M C Q A Y R S V E I V Q E Q
721 gggaaacagaaattttaagactgcagttataatggcccattgagctgagtcataatctgggc
G N R N P K T A V I M A H E L S H N L G
781 atgntatcatgacggaaaaactgtatttgaatgattcctcatggttattgtctcctgtg
M Y H D G K N C I C N D S S C V M S P V
841 ctaagcgatcaacctccaallfttcagcaattgtagtattcaogattatcagaggtat
L S D Q P S K L F T S N C S I H D Y Q R Y
901 cttactagatataaaccaaaatgcattttcaatccaccttgagaaaagatattgtttca
L T R Y K P K C I P N P P L R K D I V S
961 cctccccgttggcgaatgaaatttgggaggaggagaaagaatgtgactgtgctctcct
P P V C G N E I W E E G E E C D C G S P
1021 gcaaatgccaaaaccctgctgtgtgatgctgcaacatgtaaaactgaagcagggggcagag
A N C Q N P C C D A A T C K L K P G A E
1081 tgtggaaatggactgtgtgtgttaccatgcaaaatgaagacagcaggaacagtatgcccg
C G N G L C C Y Q C K I K T A G T V C R
1141 agagcaagggatgagtgacgtccctgaacactgcaactggccaatctgctgagtgccc
R A R D E C D V P E H C T G Q S A E C P
1201 agagatcagttgcaacagaatggaaaaccatgcaaaaacaacagaggttattgctacaat
R D Q L Q Q N K P C Q N N R G Y C Y N
1261 ggggattgccccatcatgagaaaccaatgtatttctctcttgggtcacgtgcaaatgtg
G D C P I M R N Q C I S L P G S R A N V
1321 gctaaagattcatgtttcaggaqaacactgaagggcagttattatggctactgcagaaaag
A K D S C F Q E N L K G S Y Y G Y C R K
1381 gaaaatggtagaaagattccatgtgcaccacaagatgtaaaatgtggcaggttatctgc
E N G R K I P C A P Q D V K C G R L P C
1441 ttaataattcacctagaaacaagaatccttgcaacatgcactatagctgcatggatcaa
L N N S P R N K N P C N H H Y S C H D Q
1501 cataagggatggttgaccctggacaacaaaatgtgaagatggaaaggtctgcaacaacaaa
H K G M V D P G T K C E D G K V C H N K
1561 aggcagtggttgatgtaatacagcctaccaatcaaccactggcttctctcagatttga
R Q C V D V N T A Y Q S T T G F S I *
1621 ttttggagatcttcttccagaaggttcagcttgectcaagtccaagagatccatttgc
1681 cttcactcactaataaatcaaccttagcttccagatggcatctaaattctgcaatattt
1741 cttcaactatatttaatttggtttacattttgcgtgtaatcaaacctttttcccgccataaag
1801 ctccaagggatgtacaacaccagagacttatttgcgtgtaagaaaaaaaatggccatt
1861 ttatcatttgcataattgcaagcatatttaatgcaacaagttctgccttggagctgatg
1921 tattcgaagtaaatgcttctcttccaaaatatacactggctttccaagctgtagctgc
1981 ttccatcaataaacaactattctcattctgaaaaaaa 2027
```

รูปที่ 1 (หน้าที่แล้ว) แสดงลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของ RVV-X heavy chain. 3' UTR แสดงโดยการขีดเส้นใต้, ลำดับกรดอะมิโนแสดงโดยตัว capital letter, mature peptides แสดงโดยตัวอักษรสีแดง

RVV-X light chain ที่โคลนได้มีลำดับเบส 753 เบส แสดงดังรูปที่ 2 และมีการกำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 147 กรดอะมิโน โดยมีส่วน signal peptide และคาดว่าจะสร้าง mature peptides ขนาด 123 กรดอะมิโน แสดงดังรูปที่ 3

ENTRY Sequence of light chain include upstream seq.  
 TITLE Sequence of light chain, 753 bases, 3E8C9D70 checksum.  
 SEQUENCE

```

      5      10      15      20      25      30
1   c c t t g g a a a g c c t g g a g t t g c c t c t g a g c a
31  g a g t t g c t a c c t g t g g a g g c c g a g g g a c a g
61  g t g a g t g c a g c t c t g c c a c c t g t g a g c a c c
91  t g a c a g t t c t c t c t g c a g g g a a g g a a g g a a
121 g a c c A T G G G G C G A T T C A T C T C C G T C A G C T T
151 C G G C T G T C T G G T C G T G T T T C T C T C C C T G A G
181 T G G A A C T G A A G C T G T T T T G G A C T G T C C T G C
211 T G G T T G G C T C T C T A T G A A C A A C A T T G C T A
241 C A A G G G C T T C A A T G A C C T G A A A A A T T G G A C
271 T G A T G C A G A G A A A T T C T G C A C A G A A C A G A A
301 G A A A G G C A G C C A T C T G G T C T C C T T G C A C A G
331 C A G A G A A G A A G A A G A G T T T G T G G T C A A C C T
361 G A T C T C C G A A A A T T T G G A A T A C C C T G C T A C
391 C T G G A T T G G A C T G G G C A A T A T G T G G A A G G A
421 T T G C A G G A T G G A G T G G A G C G A T C G T G G C A A
451 T G T C A A A T A C A A A G C C T T G G C T G A A G A A T C
481 T T A T T G T C T C A T A A T G A T T A C A C A T G A A A A
511 A G A A T G G A A G A G T A T G A C C T G C A A T T T C A T
541 A G C A C C T G T C G T G T G C A A G T T C T A G G C T G C
571 C T G A A G A T C C A G C T G T G T G A A C T C C T G G A G A
601 A G C A A A G A A G C C C C C A C C C A C C C C C A C C T
631 G C C G C C T T C T C T G C T C T G C C C C C T T C G C T C
661 A A T G G A T G C T C T C T G T A G C C G G G A T C C G G T
691 T T T G C C G C T C C T G A T G G G T C A G G A G G T C C A
721 A T A A A T T C T G C C T A G C A A A A A A A A A A A A
751 A A A
  
```

รูปที่ 2 ลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้าง โมเลกุล RVV-X light chain

ENTRY Protein sequence of light chain  
 TITLE Protein sequence of light chain, 210 bases, 66919B56 checksum.

```

      5      10      15      20      25      30
1   M G R F I S V S F G C L V V F L S L S G T E A V L D C P S G
31  W L S Y E Q H C Y K G F N D L K N W T D A E K F C T E Q K K
61  G S H L V S L H S R E E E E F V V N L I S E N L E Y P A T W
91  I G L G N M W K D C R M E W S D R G N V K Y K A L A E E S Y
121 C L I M I T H E K E W K S M T C N F I A P V V C K F * A A *
151 R S S C V N S G E A K K P P T H P H L P P S L L C P L R S M
181 D A L C S R D P V L P L L M G Q E V Q * I L P S K K K K K X
  
```

รูปที่ 3 ลำดับกรดอะมิโน (deduced amino acid) ของโมเลกุล RVV-X light chain

- **Factor V activator (RVV-V)**

จากผลการทำ 5'-RACE ทำให้ทราบลำดับเบสทั้งหมดของ RVV-V cDNA มีทั้งหมด 1,581 เบส ซึ่งพบลักษณะของ start codon, stop codon และ poly A signal แสดงดังรูปที่ 4

```
TGACAGTTCTGGACGTGACTCTGTCAGTGTCCAGATTGTTGGCCACCCAGCTGCTT
AATTTGATCAAATAAAGTGCTGCTTGATCAAGAAGTCTCCGCTTGGGTATCTGATT
AGATTGATACGGTATCTCAAGTTAAGTTGGGACTGGAATCTTACAGACGAACATC
TTGCCGTGCAGAGTTGAAGCTATGGTGCTGATCAAAGTGCTAGCAAACCTTCTGGTA
CTACAGCTTTCTTACGCACAAAAGTCTTCTGAACTGGTCGTTGGAGGTGATGAATGT
AACATAAATGAACATCCTTTCTTGTAGCCTTGATACCTCTGCCTCTAGCACGATT
CACTGTGCTGGTGCTTTGATCAACAGGGAAATGGGTGCTCACCCTGCACACTGTGAC
AGGAGAAATATCCGGATAAAGCTTGGTATGCATAGCAAAAATATACGAAATGAGGAT
GAGCAGATAAGAGTCCCAAGGGCAAGTACTTTTGTCTTAATACCAAATCCCCAAC
GGATTAGATAAGGACATCATGTTGATCAGGCTGAGAAGACCTGTTACCTACAGTACA
CACATCGCGCCTGTCAGCTTGCCTTCCCGTTCTCGCGGTGTGGGCTCACGTTGCCGT
ATTATGGGATGGGGCAAATCTCAACTACTGAAGATACTTATCCTGATGTCCCTCAT
TGTACTAACATCTTCATAGTCAAGCATAAGTGGTGTGAACCACTTATCCATGGGTG
CCTGCTGATAGCAGAACATTGTGTGCTGGTATCCTAAAAGGAGGCAGAGATACATGT
AAGGGTGACTCTGGGGACCGCTCATCTGTAATGGAGAAATGCACGGCATTGTAGCT
GGGGGGTCTGAACCTTGTGGCCAACATCTTAAACCTGCTGTTTACACCAAGGTCTTC
GATTATAATAACTGGATCCAGAGCATTATTGCAGGAAATAGAACTGTGACTTGCCCC
CCGTGAAAACTTTTGAAAAGTTAAGAGGAGGAAATGTAGCATATTAGGACATCTCT
TCTATATCCTAATCATATTCAACTGCATTTGGAATATATTCCCAGGCAATAAGATTTT
TTAGACTCAAATAGGACTGCTGCTCAAAATAGTCTGCAGGAATCATGTCCCATTTA
ATTTTCAGTATAAAAACAATCTCAGTAAAATGGAGGCCTGTTTTAGGGTGAGGTGCAA
ATTTTCTGACTCTAAAATGGACCATTCCAAATATTTTAACTCTGAATATCTTCTA
TTTCTGTCCACTTCTGGAACAGTGGGGTCTTGATGCTCTCTGAGCTTGTCTTGCAG
ACGTTTCGTTACCCAGCTAGGTAAACATCATCAGTCTAGAATATTCTCTTCTATTGG
TACTTCTGTGCCATTTACAATACGCTCATATGGAGTCATGCAGTCACCCACATATCC
ATATACCCGAGTCCCCTGTTGCTTAAAGAGGCTCCCAGATTAAACCCCACTTCCCA
ATCACTAAATGGAATCTTTTGAAGTACATACTTTAATGTAAATCTCAGGTATCCAC
AGCAATAAAATCATATAAATGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

รูปที่ 4 ลำดับเบสทั้งหมดของ RVV-V cDNA

เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูลพบว่าใกล้เคียงกับลำดับ amino acid ของ RVV-V โดย ลำดับเบสที่ encode ส่วน mature protein ได้ถูกนำมาเพิ่มปริมาณ โดยการทำ RT-PCR ต่อไป แสดงดังรูป ที่ 5

193 atgggtgctgatcaaagtgctagcaaaccttctgggtactacagctt  
M V L I K V L A N L L V L Q L  
238 tcttacgcacaaaagtcttctgaactggtcggttgagggtgatgaa  
S Y A Q K S S E L V V G G D E  
283 tgtaacataaatgaacatecctttccttgtagccttgtatacctct  
C N I N E H P F L V A L Y T S  
328 gcctctagcagcattcactgtgctgggtgctttgatcaacagggaa  
A S S T I H C A G A L I N R E  
373 tgggtgctcaccgctgcacactgtgacaggagaaatccggata  
W V L T A A H C D R R N I R I  
418 aagcttggatgcatagcaaaaatatacgaatgaggatgagcag  
K L G M H S K N I R N E D E Q  
463 ataagagtcceaaggggcaagtacttttgtcttaatacceaattc  
I R V P R G K Y F C L N T K F  
508 cccaacggattagataaggacatcatgttgatcaggctgagaaga  
P N G L D K D I M L I R L R R  
553 cctgttacctacagtacacacatcgcgctgtcagcttgccttcc  
P V T Y S T H I A P V S L P S  
598 cgttctcgggtgtgggctcacgttgccgtattatgggatggggc  
R S R G V G S R C R I M G W G  
643 aaaatctcaactactgaagatacttatectgatgtccctcattgt  
K I S T T E D T Y P D V P H C  
688 actaacatcttcatagtcaagcataagtgggtgtgaaccactttat  
T N I F I V K H K W C E P L Y  
733 ccatgggtgcctgctgatagcagaacattgtgtgctgggtatccta  
P W V P A D S R T L C A G I L  
778 aaaggaggcagagatacatgtaagggtgactctgggggaccgctc  
K G G R D T C K G D S G G P L  
823 atctgtaatggagaaatgcacggcattgttagctggggggctgaa  
I C N G E M H G I V A G G S E  
868 ccttgtggccaacatcttaaacctgctgtttacaccaaggtcttc  
P C G Q H L K P A V Y T K V F  
913 gattataataactggatccagagcattattgcaggaaatagaact  
D Y N N W I Q S I I A G N R T  
958 gtgacttgccccctga 975  
V T C P P \*

รูปที่ 5 ลำดับเบสของ RVV-V cDNA ที่ encode mature protein และ deduced amino acid



- Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>)

PLA<sub>2</sub> ที่โคลนได้มีลำดับเบส 596 เบส และมีการกำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 122 กรดอะมิโน แสดงดังรูปที่ 6

```

1  ggtgcttctgaaaccccttcaactctgagaaaaaggctgccaaactgtctggattcaggaagc
61  ATGAGGACTCTCTGGATAGTGGCCGTGTGCCGTGATAGGCCGTTGAAGGGAACCTTTCCAG
    M R T L W I V A V C L I G V E G N L F Q
121  TTTGGGGAGATGATCTTGAAAAGACGGGGAAAAGAAGTTGTTCATTCCTACGCCATTTAC
    F G E M I L E K T G K E V V H S Y A I Y
181  GGATGCTACTGCCGGCTGGGGAGSCCAAGGCAGGGCACAGGACGCCACCGACCGCTGCTGC
    G C Y C G W G G Q G R A Q D A T D R C C
241  TTTGTGCACGACTGCTGTTACGGGACAGTGAATGACTGCCAACCCCAAAACGGCCACCTAT
    F V H D C C Y G T V N D C N P K T A T Y
301  TCCTACAGCTTTGAGAACGGGGATATCGTCTGCCGAGACAACGACCTGTGCCGTGAGGACT
    S Y S F E N G D I V C G D N D L C L R T
361  GTTTGTGAGTGTGACAGGGCCGGGCAATCTGCCCTGGACAGAATGTGAATACATACGAC
    V C E C D R A A A I C L G Q N V N T Y D
421  AAAA ACTATGAGTACTACTCAATCTCTCATTTGCACGGAGGAGTCAGAGCAATGCTAAgctc
    K N Y E Y Y S I S H C T E E S E Q C *
481  tctgcaggacgggaaaaagccctccaattacacaattgtgggtgtgctactctattattc
541  tgaatgcaatactgagcaataaacaggtgccaggtctgcactaatcgaaaaaaaaaaaaaa
601  aaaaaaaaaa

```

รูปที่ 6 ลำดับเบสของ PLA<sub>2</sub> cDNA ที่ encode mature protein และ deduced amino acid

- Serine  $\beta$ -fibrinogenase

พบว่า Serine  $\beta$ -fibrinogenase สามารถถูก translate ออกมาได้ทั้งหมด 234 amino acids มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 25,529.87 และมีความคล้ายคลึงกับ Serine  $\beta$ -fibrinogenase gene ที่พบในชนิดอื่น โดยมีลำดับเบส แสดงดังรูปที่ 7

```

1 atggtcggttgagggtggtgcatgtaacataaatgaacatcgttcc
  M V V G G G A C N I N E H R S
46 cttgtattcttgtataacgatagcaactttcaatgcggtgggact
  L V F L Y N D S N F Q C G G T
91 ttgctcaaccaggaatgggtgctcagtgctgcacactgcgacatg
  L L N Q E W V L S A A H C D M
136 gaaaatatggagatataccttgggtgtgcataacttaaacttacca
  E N M E I Y L G V H N L N L P
181 aataacgatcagaagacaagagacccaaaggagaagttcttttgt
  N N D Q K T R D P K E K F F C
226 ctcagtagcaaaagctacaccaaatgggacaaggacatcatggtg
  L S S K S Y T K W D K D I M L
271 atcaagctgaacagacctgttacctacagtacacacatcgcgct
  I K L N R P V T Y S T H I A P
316 ctcagcttgccctccagccctcccagtggtgggttcagtttgccgt
  L S L P S S P P S V G S V C R
361 attatgggatggggcgcaatcacatctcctaataagagacttatccc
  I M G W G A I T S P N E T Y P
406 gatgtccctcatttgtgcaacattaacataactcaattatacggtg
  D V P H C A N I N I L N Y T V
451 tgtcgagcagctagcccattgttaccagcacaagcagaacactg
  C R A A S P L L P A Q S R T L
496 tgtgcaggtatcctgcaaggaggcatagatacatgtaaggctgac
  C A G I L Q G G I D T C K A D
541 tctgggggaccctcatctgtaatggacaaatccagggtattgca
  S G G P L I C N G Q I Q G I A
586 tcttgggggcactatccttgtgccaaccgcttaagcctggccac
  S W G H Y P C A Q P L K P G H
631 tacaccaaggtctttgattatactgattggatccagagcattatt
  Y T K V F D Y T D W I Q S I I
676 gcaggaaatacaaatgtgacttgtccccgtga 708
  A G N T N V T C P P *

```

รูปที่ 7 ลำดับเบสของ mature protein encoding sequence ของ Serine  $\beta$ -fibrinogenase homolog cDNA และ deduced amino acid

- **rJerdostatin homolog (Daboistatin disintegrin)**

rJerdostatin homolog ที่โคลนได้ มีมีลำดับเบส 129 เบส และคาดว่าน่าจะสร้าง mature peptides ขนาด 43 กรดอะมิโน แสดงดังรูปที่ 8

```

1 tgtacaactggaccatggttgcgtcagtgcaaattgaagccggca
  C T T G P C C R Q C K L K P A
46 ggaacaacatgctggagaaccagtgatatcaagtcattactgcact
   G T T C W R T S V S S H Y C T
91 ggcagatcttgtgaatgtcccagttatcccgggaatggctaa
   G R S C E C P S Y P G N G *
  
```

รูปที่ 8 ลำดับเบสของ mature protein encoding sequence ของ rJerdostatin homolog cDNA และ deduced amino acid

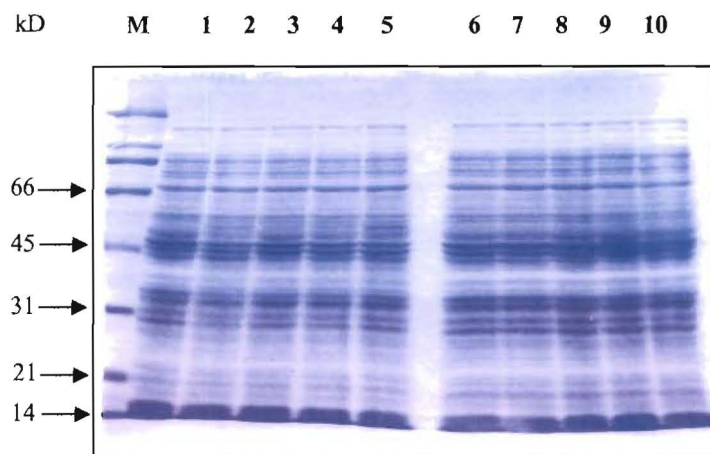
การผลิต recombinant protein ของ PLA<sub>2</sub>, RVV-X, RVV-V, serine  $\beta$ -fibrinogenase และ rJerdostatin homolog (Daboistatin disintegrin)

### 1 Factor X activator (RVV-X)

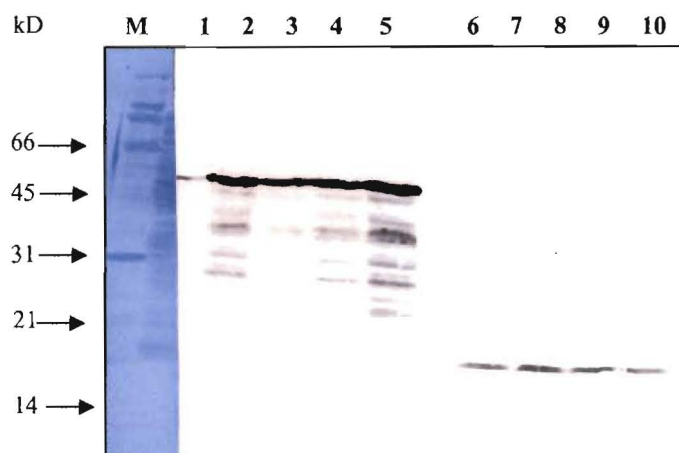
- ผลการศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IPTG และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้หมัเซลล์แบคทีเรียหลังจากเติม IPTG

จากการวิเคราะห์เลือกโคลนที่วิเคราะห์และยืนยันแล้วว่ามียีน RVV-XH และ RVV-XL มาทำการทดสอบการผลิตโปรตีนดังกล่าว และทำการวิเคราะห์ด้วย SDS polyacrylamide gel electrophoresis โดยการย้อมเจลด้วย Coomassie blue staining พบว่าทั้งโคลนที่มี RVV-XH และ RVV-XL ผลิตโปรตีนออกมามากมาย ไม่ต่างกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot หลังจากกระตุ้นด้วย IPTG พบว่าสามารถผลิต recombinant RVV-XH ที่มีขนาดโปรตีนประมาณ 59 kD และ RVV-XL มีขนาดประมาณ 18 kD ได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ไม่พบโปรตีนที่จำเพาะต่อ anti-histidine แสดงดังรูปที่ 9

A



B



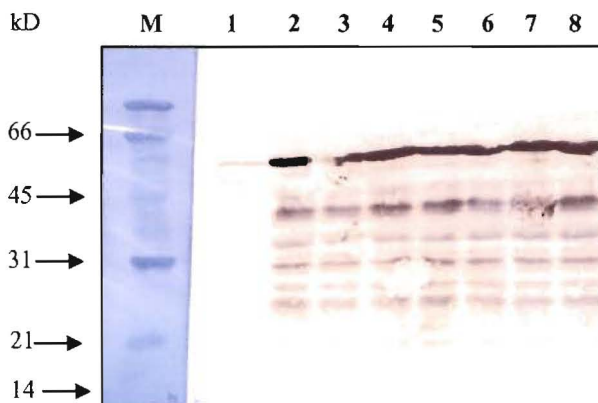
รูปที่ 9 (หน้าที่แล้ว) แสดงผลการผลิตโปรตีน RVV-XH และ RVV-XL ในเซลล์แบคทีเรียหลังจากกระตุ้นด้วย 0.5 mM IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

(A) ผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 12% เจล (reducing condition)

(B) ผล Western blot

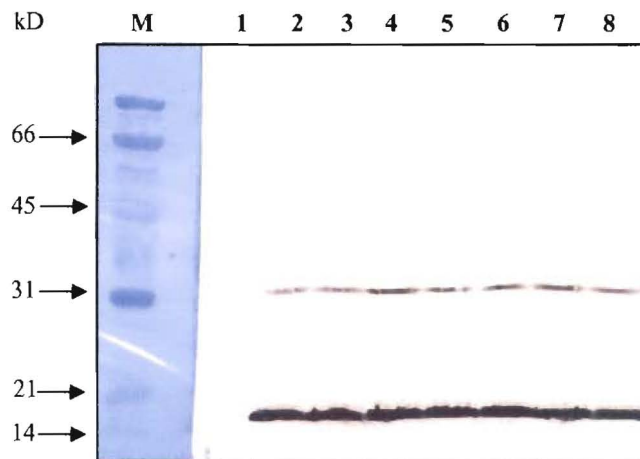
M = protein marker, lane 1 = RVV-XH clone1 without IPTG, lane 2-5 = RVV-XH clone1-4, lane 6 = RVV-XL clone2 without IPTG, lane 7-10 = RVV-XL clone1-4

ในการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IPTG โดยทดสอบความเข้มข้นในช่วง 0.1-1.5 mM จากการวิเคราะห์ผลด้วย Western blot พบว่าเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน การผลิตโปรตีนทั้ง recombinant RVV-XH และ RVV-XL ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงดังรูปที่ 10 และ 11 จึงใช้ความเข้มข้นของ IPTG เท่ากับ 0.5 mM ในการทดลองต่อไป จากนั้นทำการศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้บ่มเซลล์แบคทีเรียหลังจากเติม IPTG โดยใช้ช่วงเวลาตั้งแต่ 1 ชั่วโมง ถึงบ่มข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) จากการวิเคราะห์ผลด้วย Western blot พบว่าที่เวลา 5 ชั่วโมง สามารถผลิตโปรตีน recombinant RVV-XH ได้ดีที่สุด แสดงดังรูปที่ 12 ส่วน recombinant RVV-XL สามารถผลิตได้ดีที่สุดเมื่อบ่มข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) แสดงดังรูปที่ 13



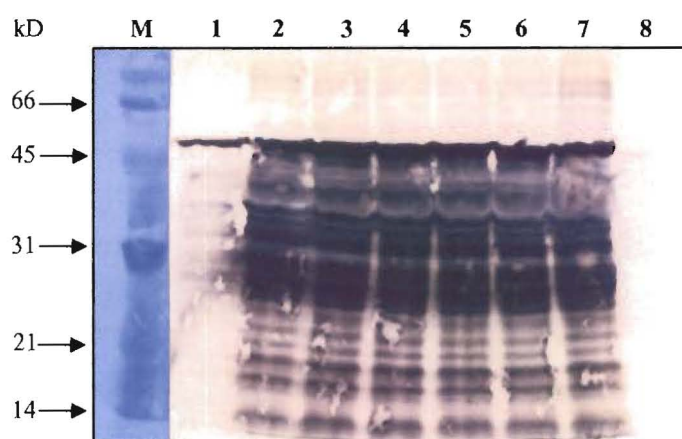
รูปที่ 10 แสดงผล Western blot ของโปรตีน RVV-XH ที่ผลิตขึ้นในเซลล์แบคทีเรียหลังจากกระตุ้นด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

M = protein marker, lane 1 = without IPTG, lane 2 = 0.1 mM IPTG, lane 3 = 0.3 mM IPTG, lane 4 = 0.5 mM IPTG, lane 5 = 0.7 mM IPTG, lane 6 = 1.0 mM IPTG, lane 7 = 1.2 mM IPTG, lane 8 = 1.5 mM IPTG



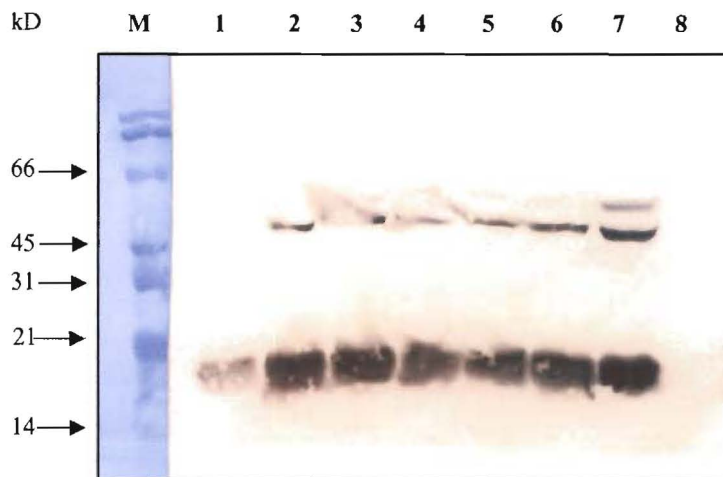
รูปที่ 11 แสดงผล Western blot ของโปรตีน RVV-XL ที่ผลิตขึ้นในเซลล์แบคทีเรียหลังจากกระตุ้นด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

M = protein marker, lane 1 = without IPTG, lane 2 = 0.1 mM IPTG, lane 3 = 0.3 mM IPTG, lane 4 = 0.5 mM IPTG, lane 5 = 0.7 mM IPTG, lane 6 = 1.0 mM IPTG, lane 7 = 1.2 mM IPTG, lane 8 = 1.5 mM IPTG



รูปที่ 12 แสดงผล Western blot ของโปรตีน RVV-XH ที่ผลิตขึ้นในเซลล์แบคทีเรียที่ใช้เวลาบ่มต่างๆ กัน หลังจากกระตุ้นด้วย 0.5mM IPTG

M = protein marker, lane 1 = ใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง, lane 2 = ใช้เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง, lane 3 = ใช้เวลาบ่ม 5 ชั่วโมง, lane 4 = ใช้เวลาบ่ม 7 ชั่วโมง, lane 5 = ใช้เวลาบ่ม 9 ชั่วโมง, lane 6 = ใช้เวลาบ่ม 11 ชั่วโมง, lane 7 = ใช้เวลาบ่มข้ามคืน, lane 8 = บ่มข้ามคืน โดยเซลล์แบคทีเรียไม่กระตุ้นด้วย IPTG

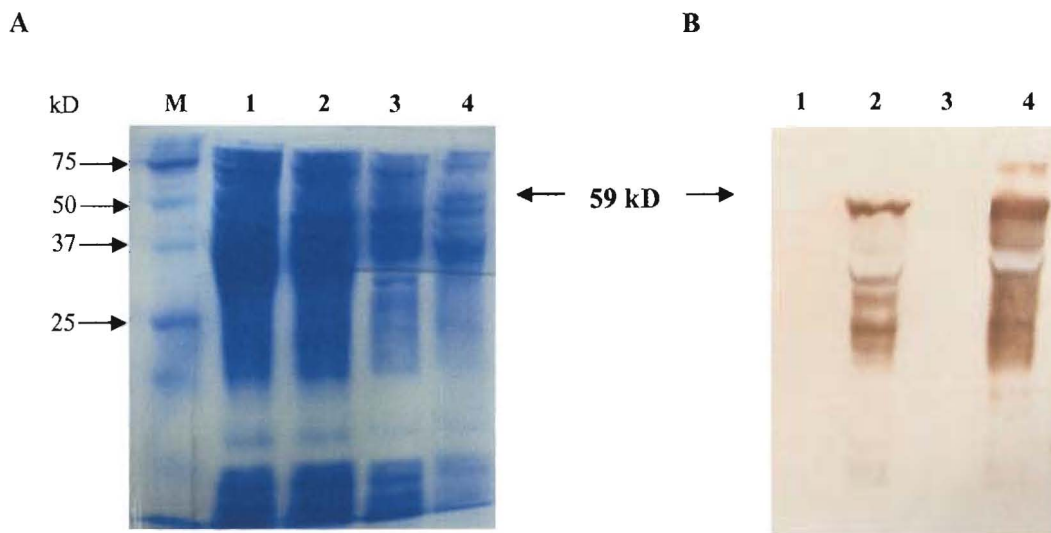


รูปที่ 13 แสดงผล Western blot ของโปรตีน RVV-XL ที่ผลิตขึ้นในเซลล์แบคทีเรียที่ใช้เวลาบ่มต่างๆ กัน หลังจากกระตุ้นด้วย 0.5mM IPTG

M = protein marker, lane 1 = ใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง, lane 2 = ใช้เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง, lane 3 = ใช้เวลาบ่ม 5 ชั่วโมง, lane 4 = ใช้เวลาบ่ม 7 ชั่วโมง, lane 5 = ใช้เวลาบ่ม 9 ชั่วโมง, lane 6 = ใช้เวลาบ่ม 11 ชั่วโมง, lane 7 = ใช้เวลาบ่มข้ามคืน, lane 8 = บ่มข้ามคืน โดยเซลล์แบคทีเรียไม่กระตุ้นด้วย IPTG

● ผลการผลิตโปรตีน recombinant RVV-XH และ RVV-XL

นำความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IPTG และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้บ่มเซลล์แบคทีเรีย หลังจากเติม IPTG มาใช้ในการผลิตโปรตีน recombinant RVV-XH และ RVV-XL จากนั้นทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยเครื่อง sonicator เพื่อทดสอบว่าโปรตีนเราอยู่ใน pellet หรือ supernatant พบว่าทั้ง recombinant RVV-XH และ RVV-XL อยู่ใน pellet ดังรูปที่ 14 และ 15

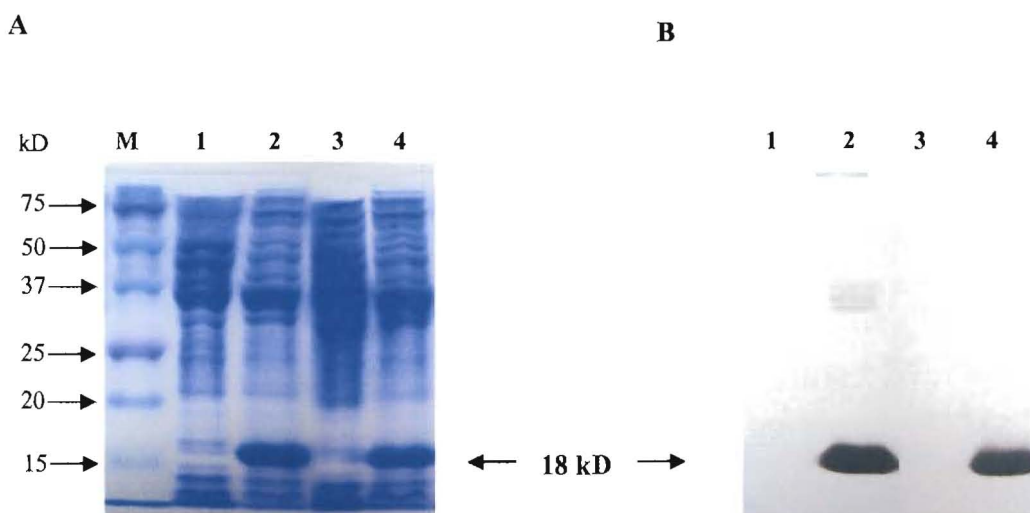


รูปที่ 14 แสดงผลโปรตีน RVV-XH หลังจาก sonication

(A) ผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 12% เจล (reducing condition)

(B) ผล Western blot

M = protein marker, lane 1 = RVV-XH without IPTG, lane 2 = RVV-XH with IPTG before sonication, lane 3 = RVV-XH supernatant, lane 4 = RVV-XH pellet





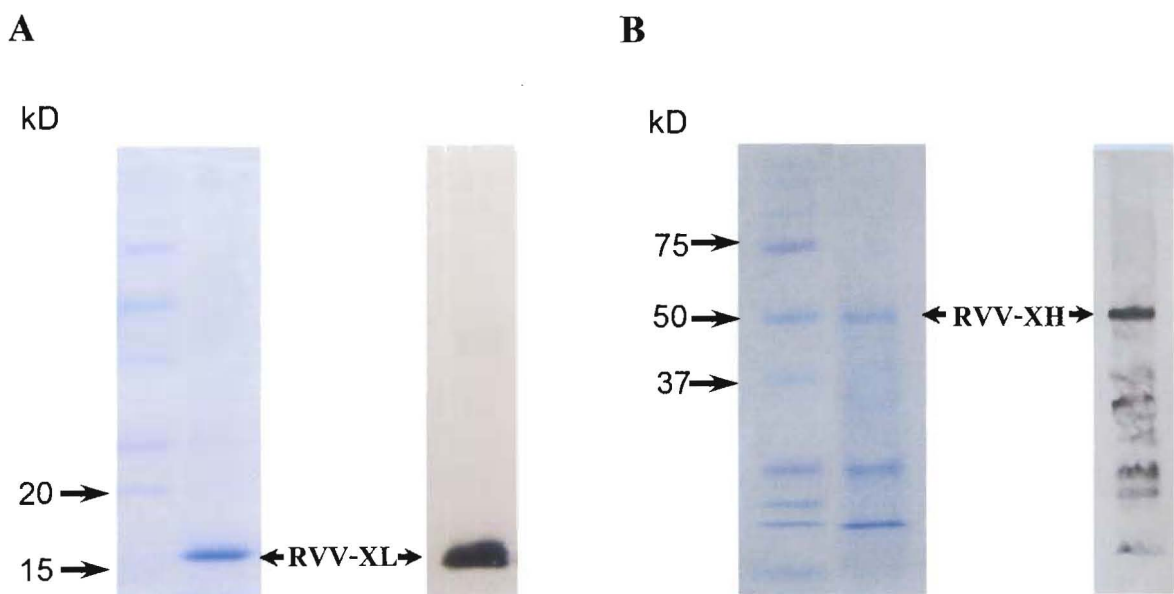
**รูปที่ 15** (หน้าที่แล้ว) แสดงผลโปรตีน RVV-XL หลังจาก sonication

(A) ผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 12% เจล (reducing condition)

(B) ผล Western blot

M = protein marker, lane 1 = RVV-XL without IPTG, lane 2 = RVV-XL with IPTG before sonication, lane 3 = RVV-XL supernatant, lane 4 = RVV-XL pellet

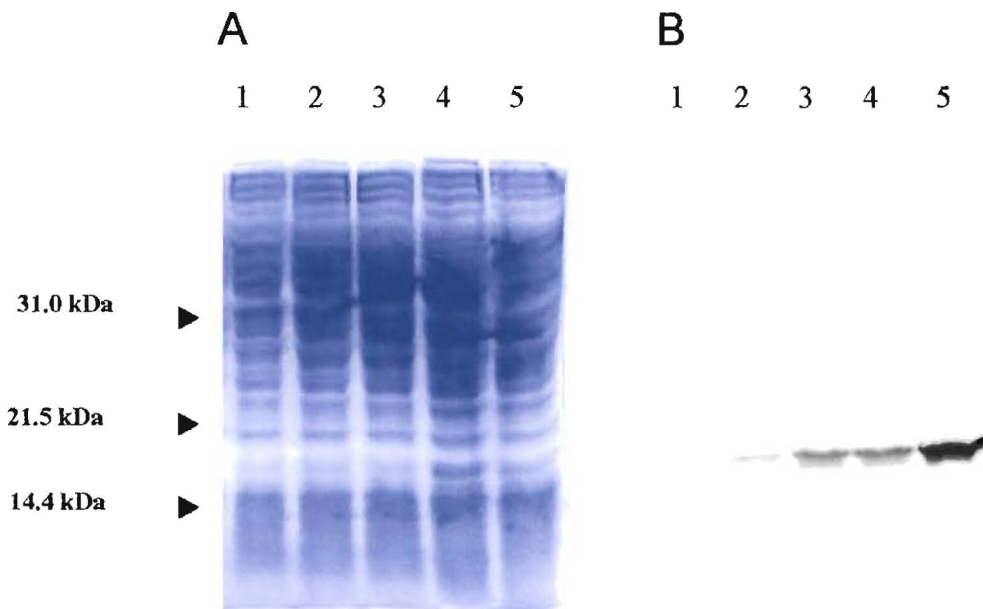
จากการศึกษาผลการผลิตโปรตีนพิชญชนิด RVV-XH และ RVV-XL โดยใช้วิธีทาง recombinant technology พบว่าได้โปรตีน RVV-XH และ RVV-XL เท่ากับ 300  $\mu\text{g}$  ต่อ 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ 250  $\mu\text{g}$  ต่อ 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ และทำการวิเคราะห์โปรตีนโดย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Western blot analysis พบว่าโปรตีน recombinant RVV-XH และ RVV-XL มีขนาดประมาณ 59 kD และ 18 kD ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 16



**รูปที่ 16** แสดงผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (ซ้าย) และ Western blot (ขวา) ของ recombinant RVV-XL (A) และ RVV-XH (B)

## 2 Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>)

พบว่าสามารถผลิต recombinant PLA<sub>2</sub> (rPLA<sub>2</sub>) ได้หลังจากการกระตุ้นด้วย IPTG และ สามารถทำปฏิกิริยากับ anti His ได้ พบว่าในระยะเวลาในการกระตุ้นข้ามคืนให้ระดับ rPLA<sub>2</sub> มากที่สุดดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 ผลการกระตุ้นการสร้าง rPLA<sub>2</sub> ด้วย IPTG ที่เวลาต่างๆ

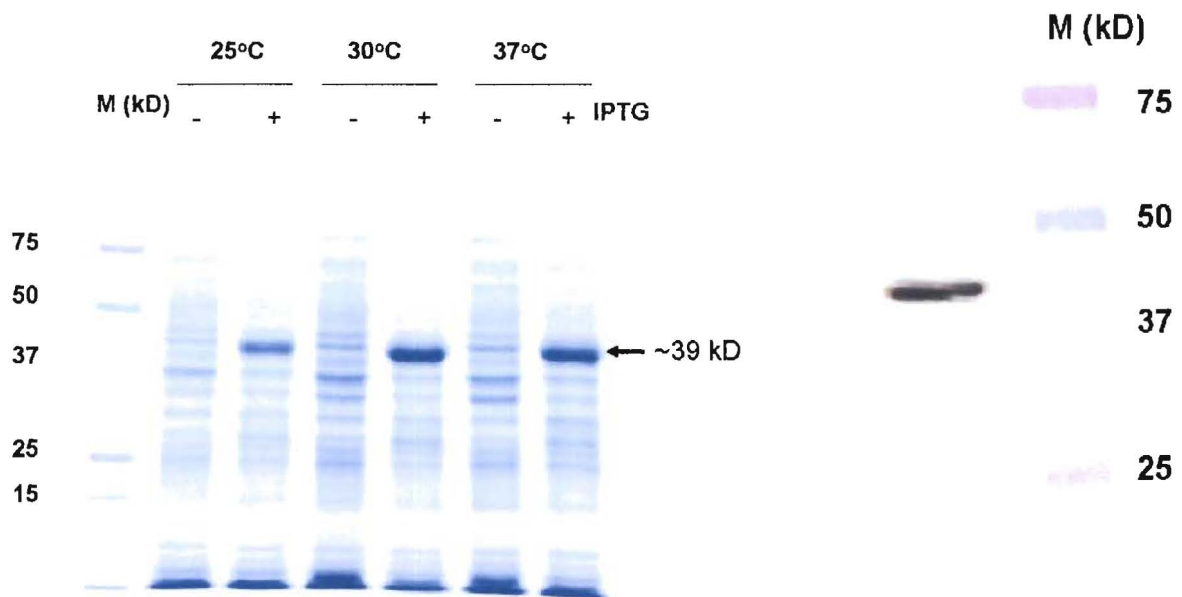
(A) ผลการ run SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Coomassie brilliant blue staining ใน 12% เจล (reducing condition)

(B) ผล Western blot

**lane 1**; incubated overnight cells lysate without IPTG, **lane 2**; incubated 1 hour cells lysate, **lane 3** incubated 3 hours cells lysate, **lane 4**; incubated 5 hours cells lysate, **lane 5**; incubated overnight cells lysate.

### 3 Factor V activator (RVV-V)

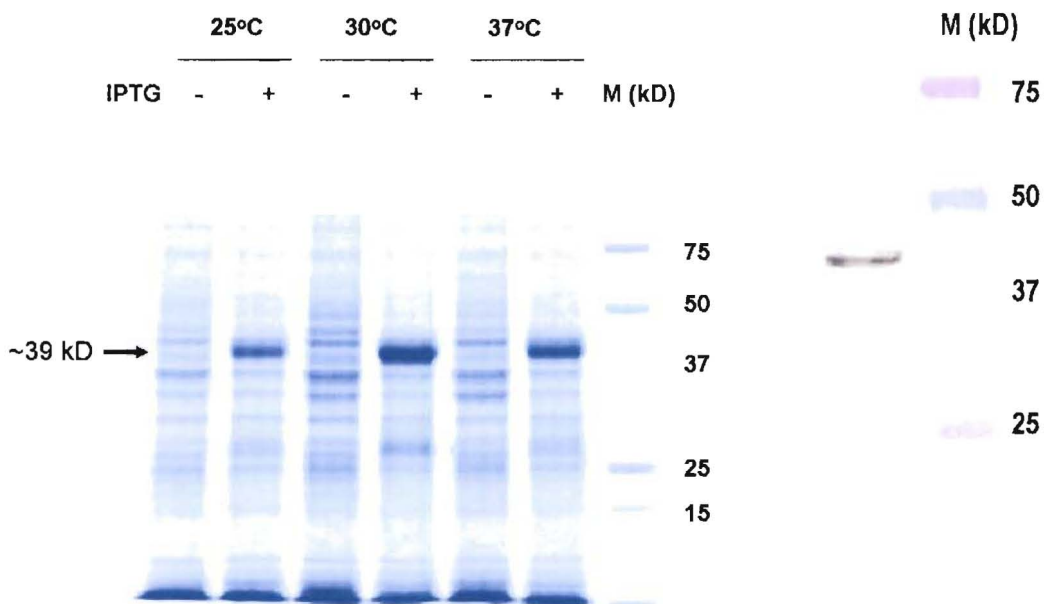
พบว่าหลังจากที่กระตุ้นด้วย 1 mM IPTG สามารถกระตุ้นให้ *E. coli* BL21 สามารถสร้าง recombinant RVV-V ได้ โดยจากการทำ SDS-PAGE และ western blotting จะพบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 39 kDa ปรากฏขึ้นมาและสามารถทำปฏิกิริยากับ anti-histidine tag ได้ ทั้งนี้ จะพบว่าที่อุณหภูมิ 30°C โปรตีนที่ผลิตได้จะมีปริมาณมากที่สุด (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 (ซ้าย) SDS-PAGE แสดงผลการกระตุ้นให้สร้าง recombinant RVV-V ด้วย IPTG ที่อุณหภูมิต่างๆ ลูกศรแสดงตำแหน่งของ recombinant protein; (ขวา) ผลการทำ western blotting พบว่า anti-histidine tag สามารถจับกับ recombinant RVV-V ได้

#### 4 Serine $\beta$ -fibrinogenase

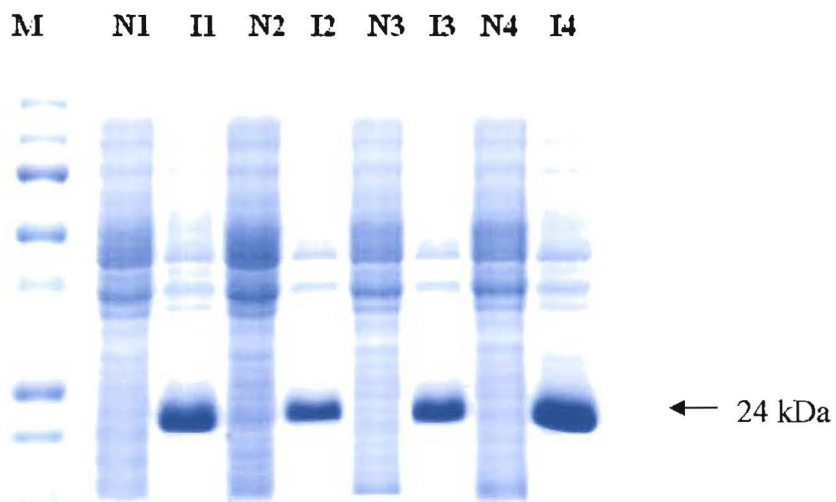
พบว่าสามารถกระตุ้นให้ *E. coli* BL21 สามารถสร้าง recombinant Serine  $\beta$ -fibrinogenase like protein ได้หลังจากที่กระตุ้นด้วย 1 mM IPTG โดยจากการทำ SDS-PAGE และ western blotting จะพบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 39 kDa ปรากฏขึ้นมาและสามารถทำปฏิกิริยากับ anti-histidine tag ได้ ทั้งนี้ จะพบว่าที่อุณหภูมิ 30°C โปรตีนที่ผลิตได้จะมีปริมาณมากที่สุด ดังรูปที่ 19



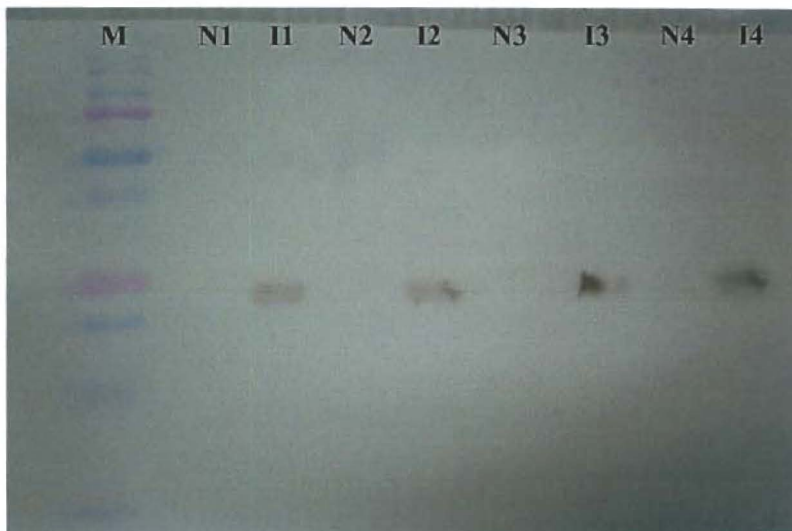
รูปที่ 19 (ซ้าย) SDS-PAGE แสดงผลการกระตุ้นให้สร้าง recombinant Serine  $\beta$ -fibrinogenase like protein ด้วย IPTG ลูกศรแสดงตำแหน่งของ recombinant protein; (ขวา) ผลการทำ western blotting พบว่า anti-histidine tag สามารถจับกับ recombinant Serine  $\beta$ -fibrinogenase like protein ได้

### 5 rJerdostatin homolog (Daboistatin disintegrin)

หลังจากที่โคลน rJerdostatin homolog cDNA เข้า pET 32a plasmid และ transform เข้า *E.coli* BL21 พบว่าสามารถกระตุ้นให้ *E. coli* BL21 สามารถสร้าง rJerdostatin homolog protein ได้หลังจากที่กระตุ้นด้วย 1 mM IPTG โดยจากการทำ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) จะพบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 24 kDa ปรากฏขึ้นมา ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 20 และ recombinant protein ที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับ anti-histidine tag ซึ่งจะพบได้ใน pET-32a ได้โดยเห็นได้จากการทำ western blotting ดังรูปที่ 21



รูปที่ 20 แสดงผล SDS- PAGE ( Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ของ rDaboistatin 4 โคลน



รูปที่ 21 แสดงผล western blot ของ rJerdostatin homolog 4 โคลน

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองในปีงบประมาณ 2551

### ผลการผลิตโปรตีนพิษงู โดยใช้วิธีทาง recombinant technology

จากการศึกษาผลการผลิตโปรตีนพิษงูชนิด RVV-XH และ RVV-XL โดยใช้วิธีทาง recombinant technology เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนโดย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Western blot analysis พบว่าโปรตีน recombinant RVV-XH และ RVV-XL มีขนาดประมาณ 59 kD และ 18 kD ตามลำดับ ตรงตามที่คาดไว้ และสามารถผลิตโปรตีน RVV-XH และ RVV-XL เท่ากับ 300 และ 250  $\mu$ g ต่อ 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยยังสามารถผลิต recombinant protein อื่นๆอีก 4 ชนิดคือ PLA<sub>2</sub>, RVV-V, serine  $\beta$ -fibrinogenase และ rJerdostatin homolog (Daboistatin disintegrin)ซึ่งจะนำโปรตีนทั้งหมดที่ผลิตได้ดังกล่าวไปทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนพิษงูต่อไป