

การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีนจากพิษงูเขียวหางไหม้ตาโต *Trimeresurus macrops*



นางสาวนฤมล สวัสดิ์พิทยุกษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4589-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 21450342

PROTEIN IDENTIFICATION OF *Trimeresurus macrops* VENOM

Miss Narumon Sawasdipuksa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Chemistry

Department of Chemistry

Faculty of Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2003

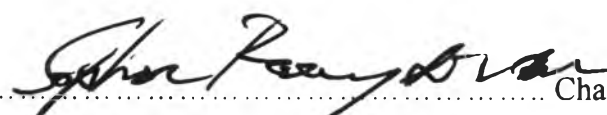
ISBN 974-17-4589-3


Thesis Title PROTEIN IDENTIFICATION OF *Trimeresurus macrops*
VENOM
By Miss Narumon Sawasdipuksa
Field of Study Chemistry
Thesis Advisor Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.
Thesis Co-advisor Assistant Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.

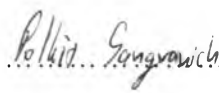
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Master's Degree

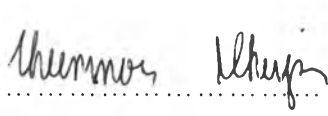

..... Dean of Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)


Thesis Committee:


..... Chairman
(Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)


..... Member
(Thumnoon Nhujak, Ph.D.)


..... Member
(Mrs. Narumol Pakmanee)

นฤมล สวัสดิ์พฤษภา : การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีนจากพิษงูเขียวหางไหม้ตาโต
***Trimeresurus macrops* (PROTEIN IDENTIFICATION OF
Trimeresurus macrops VENOM)**

อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช, 65 หน้า

ISBN 974-17-4589-3

โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบในพิษงูเขียวหางไหม้ตาโต (*Trimeresurus macrops*) แยกโดยอาศัยเทคนิคทางเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส 2 เทคนิค ได้แก่ SDS-PAGE และ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสใน 2 มิติ (2-D) และเทคนิคเจลฟิลเทรชัน โครมาโทกราฟี จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ทั้ง 2 เทคนิคทำให้ทราบถึงรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในพิษงูชนิดนี้ และจากการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟีได้โปรตีนบริสุทธิ์ 3 ชนิด โดยอาศัยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์แบบ Matrix assisted laser desorption ionization/time of flight (MALDI/Tof) สามารถวิเคราะห์หามวลโมเลกุลได้เท่ากับ 13731.02 ดาลตัน, 13254.68 ดาลตัน และ 13340.09 ดาลตัน ลำดับกรดอะมิโนจากปลายด้าน N-terminal วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Edman degradation ของโปรตีนในส่วนแยก X จากเจลฟิลเทรชันที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 13340.09 ดาลตัน คือ HVLQLGLYLIL ศึกษาลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนในส่วนแยก VI ด้วยเทคนิคแทนเดมแมสสเปกโตรเมทรีแบบ Electrospray ionization quadrupole/time of flight จากสเปกตรัมการแตกตัวของ precursor ion ที่ m/z 659.3 และ 844.3 สามารถแปรผลได้เป็นลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์สองเปปไทด์คือ WAVQCSQQPNR และ EAVGEDPWYNHQ(I/L)K นอกจากนั้นโปรตีนในส่วนแยก II และ III แสดง proteolytic activity ให้ค่า specific activity เป็น 0.18 และ 0.15 unit/ml ตามลำดับ และพบ phospholipase A activity ในโปรตีนในส่วนแยก VI

ภาควิชา.....เคมี.....
 สาขาวิชา.....เคมีอินทรีย์.....
 ปีการศึกษา.....2546.....

ลายมือชื่อนิติ..... นฤมล สวัสดิ์พฤษภา.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อมร เพชรสม.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... พลกฤษณ์ แสงวณิช.....

4472296823 : MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD : *Trimeresurus macrops*/ BIG-EYED PIT VIPER/ SNAKE VENOM/
PROTEIN/ IDENTIFICATION

**NARUMON SAWASDIPUKSA : PROTEIN IDENTIFICATION OF
Trimeresurus macrops VENOM**

THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR AMORN PETSOM, Ph.D.

THESIS CO-ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR POLKIT

SANGVANICH, Ph.D., 65 pp. ISBN 974-17-4589-3

The protein components from the venom of *Trimeresurus macrops* have been separated by sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE), two-dimensional electrophoresis (2-D electrophoresis), and gel filtration chromatography (GF). The protein profiles SDS-PAGE and 2-D electrophoresis of *Trimeresurus macrops* venom were obtained. The three molecular masses proteins, which were purified from GF, were determined using matrix assisted laser desorption ionization/time of flight (MALDI/Tof) mass spectrometer; 13732.02 m/z , 13255.68 m/z , and 13341.09 m/z , $[M+H]^+$. The ten amino acids from N-terminal of fraction X protein (13340.09 Da), which was analyzed using Edman degradation, is HVLQLGLYLIL. The partial sequence of fraction VI protein was determined using electrospray ionization quadrupole/time of flight (ESI-Q/Tof) tandem mass spectrometer. The two product ion spectra of precursor at m/z of 659.3 and 844.3 could be manually interpreted. The first peptide sequence is WAVQCSQQPNR. The second peptide sequence is EAVGEDPWYNHQ(I/L)K. The protein fraction of II and III showed proteolytic activity with specific activity 0.18 and 0.15 unit/ml, respectively. Moreover, the phospholipase A activity was found in the fraction VI protein.

Department.....Chemistry.....	Student's signature..... <i>Narumon Sawasdipuksa</i>
Field of study....Organic Chemistry...	Advisor's signature..... <i>Amorn Petsom</i>
Academic year....2003.....	Co-advisor's signature..... <i>Polkit Sangvanich</i>

ACKNOWLEDGEMENT

I am especially grateful to my advisor, Associate Professor Dr. Amorn Petsom and my co-advisor, Assistant Professor Dr. Polkit Sangvanich for their valuable guidance and assistance throughout my studies and research at Chulalongkorn University. I also deeply appreciate to my graduate committee members, Professor Dr. Sophon Roengsumran, Dr. Thumnoon Nhujak and Mrs. Narumol Pakmanee for their advices and comments.

I would like to acknowledge Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand for the supply of *Trimeresurus macrops* venom. I also deeply appreciate to Miss Orawan Know (Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society) for teaching me on the method of protease and phospholipase A activities. I am grateful to Dr. Chantragan Phiphobmongkol (Chulabhorn Research Institute) for operating N-terminal sequencing. I wish to thank UMIST Manchester, UK for Tandem mass spectrometry analysis. I would like to thank the Faculty of Science, Graduate School, Chulalongkorn University for financial support. Moreover, I also thank Research Center for Bioorganic Chemistry Unit, Department of Chemistry, Chulalongkorn University for the laboratory facilities. I thank all of my friends for their friendship and helps during my graduate studies. Finally, I would like to appreciate my parents for their great support and encouragement throughout my education.

CONTENTS

	<u>Page</u>
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Snakes.....	2
1.2 Snake Venoms.....	4
1.2.1 Nonprotein Components of Snake Venoms.....	4
1.2.2 Protein Components of Snake Venoms.....	5
1.2.3 Biological Effect of Snake Venom Toxins.....	7
1.3 Separation of Proteins.....	8
1.3.1 Gel Filtration Chromatography.....	9
1.3.2 Gel Electrophoresis.....	12
1.4 Mass Spectrometry.....	15
1.4.1 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/ Time of flight Mass Spectrometry (MALDI/Tof MS).....	15
1.4.2 Electrospray Ionization Mass Spectrometry.....	19
1.5 Tandem Mass Spectrometry.....	23
1.5.1 Collisionally Activated Dissociation (CAD).....	25
1.5.2 Tandem Mass Spectrometry for Peptide Sequencing.....	25
1.6 Identification of Proteins.....	28
1.6.1 Edman Degradation.....	28
1.6.2 Mass Spectrometry.....	29
1.7 Literature Reviews.....	34

CONTENTS (Continued)

	<u>Page</u>
2. EXPERIMENTAL	36
2.1 Material.....	36
2.1.1 Snake Venom.....	36
2.1.2 Chemicals and Apparatus.....	36
2.2 Purification Methods.....	37
2.2.1 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Snake Venom.....	37
2.2.2 Two-Dimensional Electrophoresis of Snake Venom.....	38
2.2.3 Gel Filtration Chromatography of Snake Venom.....	41
2.3 Assays.....	41
2.2.4 Proteolytic Activity.....	41
2.2.5 Phospholipase A Activity.....	42
2.4 Protein Identification Methods.....	42
2.4.1 MALDI-MS.....	42
2.4.2 N-Terminal Sequence Determination.....	43
2.4.3 Tandem MS.....	43
3. RESULTS AND DISCUSSION	44
3.1 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Snake Venom.....	44
3.2 Two-Dimensional Electrophoresis of Snake Venom.....	45
3.3 Gel Filtration Chromatography of Snake Venom.....	51
3.4 Proteolytic and Phospholipase A Activities.....	51
3.5 N-Terminal Sequence Determination.....	55
3.6 Tandem MS.....	55
4. CONCLUSION	60
REFERENCES.....	61
VITA.....	65

LIST OF FIGURES

<u>Figure</u>	<u>Page</u>
1.1 <i>Trimeresurus macrops</i> (Big-eyed Pit Viper).....	3
1.2 The polymerization reaction of acrylamide and methylenebisacrylamide.....	12
1.3 Matrix Assisted Laser Desordtion/Ionisation (MALDI) Source.....	16
1.4 MALDI Ion Formation.....	16
1.5 Linear Time of Flight Mass Spectrometer.....	18
1.6 Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometer.....	18
1.7 The Electrospray Ionization Source.....	19
1.8 The Electrospray Ionization Formation.....	20
1.9 The Quadrupole Instrument.....	21
1.10 The Stability Region for Ion Trajectories in The Quadrupole Mass Filter.....	22
1.11 A Schematic Representation of The Tandem Mass Spectrometry Scan Modes.....	24
1.12 The Peptide Fragmentation.....	26
1.13 Imonium Ion and Internal Fragment.....	27
1.14 The Edman Reaction.....	29
1.15 Strategy for The Identification of Proteins Based on Mass Spectrometry.....	30
3.1 SDS-PAGE <i>T. macrops</i> Venom.....	44
3.2 2-D Gel Images of <i>T. macrops</i> Venom.....	46
3.3 Tryptic Fragments Mass Spectra from 7 Protein Spots.....	47-49
3.4 Gel Filtration Chromatogram of <i>T. macrops</i> Venom on Sephacryl S-100HR Column.....	51
3.5 MALDI/Tof Mass Spectrum of Crude <i>T. macrops</i> Venom.....	53
3.6 MALDI/Tof Mass Spectrum of Fractions VI Protein from Gel Filtration.....	53
3.7 MALDI/Tof Mass Spectrum of Fractions IX Protein from Gel Filtration.....	54
3.8 MALDI/Tof Mass Spectrum of Fractions X Protein from Gel Filtration.....	54
3.9 The conventional mass spectrum obtains from ESI-Q/To.....	56
3.10 The product ion mass spectrum of precursor ion at m/z of 659.3 obtains from ESI-Q/Tof m/z	57
3.11 The product ion mass spectrum of precursor ion at m/z of 844.3 obtains from ESI-Q/Tof m/z	57

LIST OF FIGURES (Continued)

<u>Figure</u>	<u>Page</u>
3.12 The product ion mass spectrum of precursor ion at m/z of 984.0 obtains from ESI-Q/Tof m/z	58
3.13 The product ion mass spectrum of precursor ion at m/z of 1224.0.0 obtains from ESI-Q/Tof m/z	58

LIST OF TABLES

<u>Table</u>	<u>Page</u>
1.1 Enzymes Found in Various Snake Venoms.....	6
1.2 Protein properties used during chromatographic purification.....	9
1.3 Supports for Gel Filtration Chromatography.....	11
1.4 Protein Fractionation Range of Some Gels.....	11
1.5 Common MALDI matrices used in biological applications.....	17
1.6 The Masses of Common 20 Amino Acids.....	27
1.7 Specific Chemical and Enzymatic Cleavage of Protein.....	31
1.8 Examples of the databases search programs and their Internet addresses that can be used for protein identification.....	33
3.1 Measured Tryptic Fragments Masses from Figure 3.3 A-G.....	50
3.2 Summary of Fractionation of <i>T. macrops</i> Venom.....	52

LIST OF ABBREVIATIONS

1-D electrophoresis	One-dimensional electrophoresis
2-D electrophoresis	Two-dimensional electrophoresis
µg	microgram
µl	microliter
ACN	Acetonitrile
APS	Ammonium persulfate
Bis	<i>N,N'</i> -methylenebisacrylamide
°C	degree Celsius
C	Crosslinking factor [%]
CAD	Collision activated dissociation
CCA	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propane sulfonate
CID	Collision induced dissociation
Da	Dalton
DC	Direct current
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electrospray ionization
ESI-Q/Tof	Electrospray ionization Quadrupole time-of-flight
fmol	femtomole
g	gram
GF	Gel filtration chromatography
IEF	Isoelectric focusing
IPG	Immobilized pH gradients
kDa	Kilodalton
kVh	kilovolt-hour
LMW	Low molecular weight
nM	Nanomolar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

MALDI/Tof	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of flight
mg	Milligram
mg/ml	Milligram per milliliter
ml	Milliliter
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem Mass spectrometry
<i>m/z</i>	Mass per charge
PAGE	polyacrylamide-gel electrophoresis
pI	Isoelectric point
PMM	Peptide mass mapping
pmol	picomole
ppm	parts per million
PSD	Post source decay
Q/Tof	Quadrupole Time of flight
RF	Radiofrequency
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodium-dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis
T	Total acrylamide concentration [%]
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic acid
Tof	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethane
UV	Ultraviolet spectroscopy
V	Volt
W	Watt