การวิเคราะห์โปรตีนจากพิษงูทับสมิงคลา *Bungarus candidus*

นางสาวพัฒนี วุฒิกรชัยสกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4735-7

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANALYSIS OF PROTEINS FROM SNAKE VENOM OF MALAYAN KRAIT *Bungarus candidus*

Miss Pattanee Wutthikornchaisakun

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 974-17-4735-7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	ANALYSIS OF PROTEINS FROM SANKE VENOM OF MALAYAN KRAIT *Bungarus candidus*
By	Ms. Pattanee Wutthikornchaisakun
Field of study	Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Amorn Petsom
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Dr. Polkit Sangvanich

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

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

Thesis Committee

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

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

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

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

Narumon Pakmanee ..... Member
(Narumon Pakmanee)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พัฒนี วุฒิกรชัยสกุล : การวิเคราะห์โปรตีนจากพิษงูทับสมิงคลา *Bungarus candidus* (ANALYSIS OF PROTEINS FROM SNAKE VENOM OF MALAYAN KRAIT *Bungarus candidus*) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร. อมร เพชรสม, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช : 75 หน้า. ISBN 974-17-4735-7

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์โปรตีนจากพิษงูทับสมิงคลา *Bungarus candidus* โดยเริ่มต้นจากการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคการแยก ได้แก่ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส และไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี หลังจากนั้นนำโปรตีนที่แยกได้มาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน โดยอาศัยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี แบบเมทริกซ์แอสซิสเทดเลเซอร์ดีซอร์พชันไอออไนเซชันแมสสเปกโทรเมตรี (MALDI-MS) และอิเลคโทรสเปรย์ไอออไนเซชัน แมสสเปกโทรเมตรี (ESI-MS) โดยผลที่ได้จากการแยกโปรตีนด้วยเจลอิเลกโทรโฟเรซิส พบว่า มีจุดโปรตีน 17 ชนิด ในแผ่นเจลที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ และ 36 ชนิดในแผ่นเจลที่ย้อมด้วยโคมาซีส์บลู จากผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยอาศัยเทคนิคเปปไทด์แมสแมพพ์พบว่าไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ และจากการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโทกราฟฟี พบว่าในส่วนที่6 มีโปรตีน A ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 7453 Da และในส่วนที่ 8 มีโปรตีน B ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 6670 Da จากการหาลำดับของกรดอะมิโนด้านปลายของหมู่อะมิโนกรุ๊ปของโปรตีน A สามารถวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนได้ 11 ลำดับได้แก่ KTKI_PEKD_QKV และลำดับของกรดอะมิโนด้านปลายของอะมิโนกรุ๊ป (N-terminal) ของโปรตีน B คือ NLINFMEMIRYT ส่วนการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยอาศัยเทคนิคเปปไทด์แมสแมพพ์ของโปรตีน A พบว่าโปรตีนที่ได้คือแคนโดซิน (candoxin) ยิ่งไปกว่านั้นส่วนของเปปไทด์ที่ย่อยด้วยทริบซิน (trypsin) และไคโมทริบซิน (chymotrypsin) ของโปรตีน A ซึ่งหาลำดับของกรดอะมิโนด้วย ESI-Q/TOF พบว่าลำดับของกรดอะมิโน ของเปปไทด์ทั้ง 4 ชิ้น คือ VCASGEK, YCFKESWR, EARGTR และ CCTTDDCN ซึ่งเหมือนกันกับในลำดับของกรดอะมิโนที่ 18 ถึง 38 ของแคนโดซิน อย่างไรก็ตาม ผลของการหาลำดับของกรดอะมิโนด้านปลายของอะมิโนกรุ๊ป ไม่ตรงกันกับแคนโดซินโปรตีน A จึงอาจเป็นโปรตีนชนิดใหม่ซึ่งมีส่วนของลำดับของกรดอะมิโนตรงกับแคนโดซิน ดังนั้นการวิเคราะห์เพิ่มเติมของโปรตีนชนิดนี้คือ การหาลำดับของกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีน A ส่วนโปรตีน B นั้นไม่สามารถวิเคราะห์ได้เนื่องจากว่าไม่บริสุทธิ์

ภาควิชา.....เคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....พัฒนี วุฒิกรชัยสกุล.....

สาขาวิชา.....เคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4472347123 : MAJOR CHEMISTRY

KEYWORD : *Bungarus candidus*, Malayan krait, Snake venom, Proteins, Mass spectrometry

PATTANEE WUTTHIKORNCHAISAKUN: ANALYSIS OF PROTEINS FROM SNAKE VENOM OF MALAYAN KRAIT *Bungarus candidus*. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF.AMORN PETSOM, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF POLKIT SANGVANICH, Ph.D. 75 pp. ISBN 974-17-4735-7

This research involves analysis of proteins from *Bungarus candidus* venom. Firstly, the mixture proteins were separated using gel electrophoresis and ion exchange chromatography. After that, the separated proteins were analyzed by mass spectrometry; matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). There are 17 and 36 spots in silver stained gel and coomassie blue stained gel, respectively. From peptide mass mapping, the searching results cannot confirm the identity of proteins. The results from the separation of proteins by using ion exchange chromatography, one protein called "protein A" with molecular weight of 7453 Da was found in fraction No. 6 and one protein called "protein B" which has molecular weight of 6670 Da was found in fraction No. 8. The N-terminal sequencing result of protein A has found 11 residues which is KTKI_PEKD_QKV and the N-terminal sequencing of protein B was NLINFMEMIRYT. From the result of peptide mass mapping shows that protein A is candoxin. Furthermore, the tryptic peptide and chymotrytic peptide fragments of protein A were sequenced by ESI-Q-TOF. The amino acid sequences of four peptides are VCASGEK, YCFKESWR, EARGTR and CCTTDDCN, which are similar to the eighteenth to thirty eighth amino acids residues from N-terminal of candoxin. However, the result of N-terminal sequences and the molecular weight was not matched with candoxin. Consequently, it might be a new protein. Therefore, further analysis of this protein was required. Protein B from fraction No.8 cannot be analyzed according to purity.

Program.....Chemistry..... Student's signature Pattanee Wutthikornchaisakun

Field of study..... ....Chemistry..... Advisor's signature.....

Academic Year.....2003..... Co-advisor's signature Polkit Sangvanich

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my deepest appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Amorn Petsom and co-advisor Assistant Professor Dr. Polkit Sangvanich for their encouraging guidance, supervision and beneficial suggestions throughout the course of this research. I take the opportunity to thank Professor Dr. Sophon Roengsumran for serving as chairman of my thesis committee and for the valuable comments from Dr. Thumnoon Nhujak and Mrs. Narumon Pakmanee.

My sincere gratitude is also extended to the Department of Chemistry, the Faculty of Science and the Graduate School, Chulalongkorn University for the financial support. I also thank the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University for support a MALDI-TOF MS and the Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society for snake venom used in this research. I am also grateful to Dr. Chantakan Phiphobmongkol, Chulabhorn Research Institute for help on the N-terminal protein sequencing.

I would like to express my gratitude to Miss Padmar Sekhar, the University of Manchester Institute of Science and Technology for help on the protein sequencing and my friends who contributed suggestion and support during this research.

Last but not the least, I wish to express my deepest gratitude to my parents for all things that they have endured and sacrificed for my success.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT IN THAI.....iv

ABSTRACT IN ENGLISH.....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF FIGURES.....x

LIST OF TABLES.....xii

LIST OF SCHEMES.....xiii

LIST OF ABBREVIATIONS.....xiv

CHAPTER

1. INTRODUCTION.....1

2. THEORETICAL AND LITERATURE REVIEWS.....3

2.1 Snake venom 3

2.2 Mechanism of neurotoxin.....4

2.3 *Bungarus candidus*.....6

2.4 Separation Techniques.....7

2.4.1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.....7

2.4.1.1 Components of SDS-PAGE.....8

2.4.1.2 One-dimensional gel electrophoresis.....11

2.4.1.3 Two-dimensional gel electrophoresis.....11

2.4.2 Ion-exchange Chromatography.....12

2.5 Identification technique.....15

2.5.1 Edman degradation.....15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS (Continued)

Page

2.5.1.1 Coupling, cleavage and conversion.....16
2.5.1.2 Identification of the PTH amino acids.....17
2.5.2 Mass spectrometry.....19
2.5.2.1 Historical Perspective.....19
2.5.2.2 Basic concept of mass spectrometry.....19
2.5.2.3 The ion source.....20
2.5.2.4 Mass Analyzer.....26
2.5.2.5 Detector.....30
2.5.3 Tandem mass spectrometry.....30
2.5.3.1 Product ion scan.....31
2.5.3.2 Precursor ion scan.....34
2.5.3.3 Neutral loss scan.....34
2.6 Protein identification by database searching.....35
2.7 Literature Reviews.....36

3. EXPERIMENTAL.....39
3.1 Snake venom.....39
3.2 Chemicals.....39
3.3 Apparatus and Instrument.....40
3.4 Procedures.....41
3.4.1 SDS-PAGE.....41
3.4.2 2-DGel electrophoresis.....41
3.4.3 1-D gel electrophoresis.....42
3.4.4 Staining method.....42
3.4.5 In-gel digestion.....43
3.4.6 Sample preparation for MALDI-TOF.....44
3.4.7 Sample preparation for Edman degradation and MS/MS....44
3.4.8 Protein Identification.....44
4. RESULTS AND DISCUSSIONS.....45
4.1 Characterization proteins by gel electrophoresis for crude *Bungarus candidus* venom.....45

CONTENTS (Continued)

Page

4.2 Characterization proteins by gel electrophoresis, mass spectrometry and sequencing technique for *Bungarus candidus* venom fraction 48
4.2.1 Molecular weight of proteins in each fraction by MALDI-TOF MS.....49
4.2.2 1-D gel electrophoresis of fraction 6 and 8.....49
4.2.3 N-terminal sequencing by Edman degradation.....50
4.2.4 Peptide mass mapped and partial sequencing by ESI-Q-TOF MS of *Bungarus candidus* venom fraction 6...51
5. CONCLUSION.....56
REFERENCES.....57
APPENDIX.....60
VITA.....75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

2.1 Pre-synaptic block.....5
2.2 Post-synaptic block.....6
2.3 Malayan krait (*Bungarus candidus*).....7
2.4 The action of dodecyl sulfate in denaturing proteins.....10
2.5 Migration of proteins to their pI in the pH gradient of an isoelectric focusing gel 12
2.6 The action of ion in anion exchanger.....14
2.7 Basic component of a mass spectrometer.....20
2.8 Diagram of the MALDI process.....22
2.9 A pictorial depiction of the concept of electrospray ionization.....25
2.10 Mechanism of evaporation and exploration of droplets.....26
2.11 Principle of the mass separation by TOF.....27
2.12 A quadrupole mass analyzer 28
2.13 Main processes in tandem mass spectrometry (MS/MS).....31
2.14 The nomenclature of the common peptide fragment ions.....32
2.15 Schematic diagram of quadrupole/time of flight hybrid tandem mass spectrometer 34
3.1 Scheme representations to apply the sample into IPG strips.....41
4.1 2-D SDS-PAGE gel was stained by silver.....45
4.2 2-D gel image of pH 4-7 was stained by coomassie brilliant blue G.....46
4.3 ion exchange chromatogram of *Bungarus candidus* venom.....48
4.4 One-dimensional coomassie-stained gel of IEX No. 6 and 8.....49
4.5 The MALDI-TOF mass spectrum of tryptic digests of snake venom fraction 6.....52
4.6 The ESI-Q-TOF mass spectrum of partial amino acid sequence of precursor ion of m/z of 347.16.....53
4.7 The ESI-Q-TOF mass spectrum of partial amino acid sequence of precursor ion of m/z of 559.75.....53
4.8 The ESI-Q-TOF mass spectrum of partial amino acid sequence of precursor ion of m/z of 345.18.....54

LIST OF FIGURES (Continued)

Figure **Page**

4.9 The ESI-Q-TOF mass spectrum of partial amino acid sequence of precursor ion of m/z of 437.61.....54
1A MALDI-MS spectrum of trytic fragment of spot number 1of 2-D gel.....61
2A MALDI-MS spectrum of trytic fragment of spot number 3 of 2-D gel....62
3A MALDI-MS spectrum of trytic fragment of spot number 4 of 2-D gel....63
4A MALDI-MS spectrum of trytic fragment of spot number 8 of 2-D gel....64
5A MALDI-MS spectrum of trytic fragment of spot number 9 of 2-D gel....65
6A MALDI-MS spectrum of *Bungarus candidus* ion exchange fraction 2....66
7A MALDI-MS spectrum of *Bungarus candidus* ion exchange fraction 6....67
8A MALDI-MS spectrum of *Bungarus candidus* ion exchange fraction 7....68
9A MALDI-MS spectrum of *Bungarus candidus* ion exchange fraction 8....69
10A MALDI-MS spectrum of band of 1-D gel of IEX fraction 6.....70
11A MALDI-MS spectrum of band of 1-D gel of IEX fraction 8.....71
12A MALDI-MS spectrum of *Bungarus candidus* ion exchange fraction 6...72
13A MALDI-MS spectrum of *Bungarus candidus* ion exchange fraction 8...73
14A MALDI-MS spectrum of *Bungarus candidus* ion exchange fraction 6...74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table **Page**

2.1 Media used in ion exchange chromatography.....15

2.2 Common MALDI matrices used in biological applications.....23

2.3 The residue masses of the 20 genetically encoded amino acids and selected modified amino acids 33

4.1 Molecular weight range of spot proteins of silver-stained gel.....46

4.2 Molecular weight range of spot proteins of coomassie blue G stained gel.....47

4.3 Mass per charge of in-gel tryptic peptide of each spot 47

4.4 The concentration of proteins of each fraction 48

4.5 Mass per charge of each ion exchange fraction 2, 6, 7, 8.....49

4.6 Mass per charge of in-gel tryptic fragment of each band 50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF SCHEMES

Scheme **Page**

2.1 The formation of a polyacrylamide gel from acrylamide and bis-acrylamide...8
2.2 The coupling reaction.....16
2.3 Formation of the by-product DPTU during Edman degradation.....16
2.4 The cleavage reaction.....17
2.5 The conversion step 18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ACN	acetonitrile
°C	degree Celsius
2-D	two-dimensional
DTT	dithiothreitol
ESI MS	Electrospray Ionization Mass Spectromatry
ESI Q-TOF	Electrospray Ionization Quadrupole Time of Flight
g	gram
HPLC	High performance liquid chromatography
IEF	Isoelectric focusing
IEX	Ion exchange chromatography
IPG	Immobilized pH gradient
M	molar
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
MALDI-TOF MS	matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
MeOH	methanol
mg	milligram
$[M+H]^+$	molecular ion
min	minute
mL	milliliter
mm	millimeter
mM	millimolar
MS	Mass spectrometry
M.W.	Molecular weight
m/z	mass to charge ratio
PCR	polymerase chain reaction
PMF	Peptide mass fingerprint
ppm	part per million
Q	quadrupole
RP	reverse phase
rt	room temperature

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	Tetramethylene diamine
TFA	trifluoro acetic acid
Tof	time of flight
µL	micro liter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย