

190908

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



190908

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์เฉพาะส่วนที่ทำให้เกิดรูรั่วบนผิวเซลล์ของ
สารพิษ Adenylate cyclase-haemolysin ของเชื้อ *Bordetella pertussis*
ต่อฤทธิ์การรบกวนผนังของลิโปโซมและการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

(Liposome Perturbation and Haemolytic Activities of the Purified Pore-forming Domain
of the *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase-Haemolysin Toxin)

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษบา เผ่าทองจีน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ฉัตรชัย เผ่าทองจีน

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

600255929

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



190908

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์เฉพาะส่วนที่ทำให้เกิดรูร่วนผิวเซลล์ของ
สารพิษ Adenylate cyclase-haemolysin ของเชื้อ *Bordetella pertussis*
ต่อฤทธิ์การรบกวนผนังของลิโปโซมและการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

(Liposome Perturbation and Haemolytic Activities of the Purified Pore-forming Domain
of the *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase-Haemolysin Toxin)

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษบา เผ่าทองจีน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ฉัตรชัย เผ่าทองจีน



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ : การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์เฉพาะส่วนที่ทำให้เกิดรูรั่วบนผิวเซลล์ของสารพิษ adenylate cyclase-haemolysin ของเชื้อ *Bordetella pertussis* ต่อฤทธิ์การรบกวนผนังของลิโปโซมและการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

Liposome Perturbation and Haemolytic Activities of the Purified Pore-forming Domain of the *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase-Haemolysin Toxin

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษบา เผ่าทองจีน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ฉัตรชัย เผ่าทองจีน
ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทคัดย่อ

190908

โปรตีนสารพิษ Adenylate cyclase-haemolysin (CyaA) จากเชื้อ *Bordetella pertussis* มีโครงสร้างประกอบด้วยส่วนที่เป็นเอนไซม์ adenylate cyclase (AC) และส่วนที่ทำให้เกิดรูรั่วบนเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย (PF-domain) ซึ่งส่วนนี้มีฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ ในการศึกษาที่นักวิจัยได้ใช้พลาสมิด pCyaAC-PF ที่มียีนควบคุมการสร้างโปรตีนเฉพาะส่วน CyaA-PF และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ CyaC-acyltransferase (*cyaC*) ในพลาสมิดเดียวกัน โดยโปรตีน CyaC ทำหน้าที่เติมหมู่ palmitoyl แก่ CyaA-PF เพื่อให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เมื่อทำให้เกิดการสร้างโปรตีนใน *E. coli* พบว่าโปรตีนทั้งสองถูกสร้างในรูปโปรตีนที่ละลายน้ำและยังพบว่า CyaA-PF ถูกเติมหมู่ palmitoyl ที่ Lys⁹⁸³ จริง นอกจากนั้นในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ crude extracts จาก *E. coli* ที่มีการสร้างโปรตีนสารพิษ acylated CyaA-PF พบว่าโปรตีนสารพิษนี้ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้สูง ในการศึกษาที่ได้พัฒนาวิธีการทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์ พบว่าการใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟี 3 ขั้นตอนร่วมกันคือ anion-exchange, hydrophobic interaction และ size-exclusion chromatography ตามลำดับ ทำให้ได้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่บริสุทธิ์ถึงมากกว่า 90% แต่ผลผลิตสุดท้ายที่ได้ค่อนข้างต่ำมาก (8%) และพบว่าโปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์นี้สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ประมาณ 60% แต่ฤทธิ์ในการรบกวนผนังลิโปโซมยังไม่สามารถสรุปได้ในการศึกษา

คำสำคัญ : โปรตีนสารพิษ adenylate cyclase-haemolysin, CyaA, การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์, โครมาโทกราฟี

The *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-haemolysin (CyaA) toxin composes of the adenylate cyclase (AC) and the pore-forming (PF) domains. The truncated PF-domain can cause haemolysis of sheep red blood cells. In this study, the recombinant pCyaAC-PF plasmid containing the *cyaA-PF* gene, coding for the CyaA-PF domain, together with *cyaC* gene, coding for the enzyme acyltransferase, which will transfer the palmitoyl group to CyaA-PF to become an active toxin. The CyaA-PF and CyaC proteins were overexpressed in soluble form and *in vivo* palmitoylation to Lys⁹⁸³ of CyaA-PF was confirmed. *E. coli* crude extracts containing acylated CyaA-PF exhibited high haemolytic activity against sheep erythrocytes. In this study, the efficient procedure for purifying CyaA-PF was developed. By using anion-exchange, hydrophobic interaction and size exclusion chromatography, respectively, more than 90% purified CyaA-PF was obtained but relatively low percent yield (8%). This purified CyaA-PF also showed high haemolytic activity against sheep erythrocytes (60%) but the liposome perturbation activity could not conclude in this study.

Keywords : Adenylate cyclase-haemolysin, CyaA, Protein purification, Chromatography