(mutant CyaA-PF proteins) บริสุทธิ์เพื่อนำมาศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ได้ อันจะนำไปสู่การศึกษาเพื่อทราบกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษนี้ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

แบคทีเรีย

- *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS ที่มีพลาสมิดลูกผสม pCyaA-PF และ pCyaAC-PF

สารเคมี

- Ampicillin
- Bovine serum albumin
- Bradford-based protein microassay
- Calcium chloride
- Chloramphenicol
- Glycine
- Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG)
- Luria-Bertani medium
- Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)
- Polyacrylamide
- Sheep blood (defribrinated)
- Sodium chloride
- Sodium dodecyl sulphate (SDS)
- Tris base

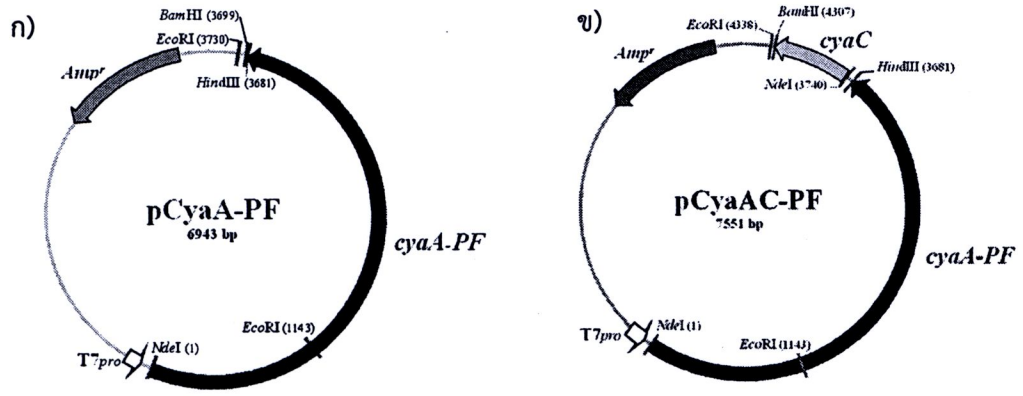
วัสดุ อุปกรณ์

- AKTA Explorer FPLC System (GE)
- Centrifuge
- Chromatographic column : HiTrapQ, HiTrap Phenyl HP, and Superose12 10/300 GL columns (GE)
- Electrophoresis set
- French Press
- Shaking incubator
- Spectrophotometer
- Microplate reader

1. การผลิตโปรตีนสารพิษ CyaA-PF

นำเซลล์ *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS ที่มีพลาสมิดลูกผสม pCyaA-PF และ pCyaAC-PF (รูปที่ 2) ซึ่งมียีน *cyaA*-PF ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน CyaA-PF และยีน *cyaC* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ acyltransferase อยู่ (Powthongchin and Angsuthanasombat, 2008) ที่เลี้ยงข้ามคืน (overnight) มาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB medium) ที่มียา ampicillin 100 µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml ที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่ 200 rpm และ เมื่อวัดความขุ่นของ culture (OD_{600}) ได้ประมาณ 0.5-0.6 เติม 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) แล้วเลี้ยงต่ออีก 6 ชม. หลังจากนั้นจึงทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นให้เซลล์ตก ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน (supernatant) และ resuspend เซลล์ใหม่ด้วย 50 mM Tris-HCl

(pH 8.0) ที่มี 5 mM $CaCl_2$ และ 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) และนำเซลล์มาทำให้แตกด้วย French Pressure Cell ที่ 10,000 psi และนำไปปั่นที่ 12000xg, 4°C นาน 20 นาที นำส่วนใสที่เรียกว่า crude lysate และส่วนที่ตกตะกอน (pellet) ไปตรวจหาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) และหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Bradford-based protein microassay (BioRad, USA) โดยใช้ Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA) เป็นสารมาตรฐาน



รูปที่ 2 พลาสมิดลูกผสม ก) pCyaA-PF ที่มียีน *cyaA*-PF ข) pCyaAC-PF ที่มียีน *cyaA*-PF และยีน *cyaC*

2. การตรวจสอบเอกลักษณ์ของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF

2.1 การตรวจหาขนาดของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE

เตรียม 10% SDS-PAGE gel ตามวิธีมาตรฐาน นำส่วนที่เป็น soluble crude lysate และส่วนที่เป็น pellet มา run โดยเทียบขนาดของโปรตีนจาก Molecular mass standard

2.2 Western blot analysis

ใช้แอนติบอดี 9D4-anti-RTX monoclonal antibody (Listlabs, USA, 1:2,000 dilution) ที่สามารถจับกับส่วน nonapeptide repeats ของโปรตีนสารพิษ CyaA และตรวจสอบการจับกันระหว่าง antigen และ antibody โดยใช้ alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Pierce, USA), 1:20,000 dilution)

2.3 LC/MS/MS analysis

ตัดแถบโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่อยู่บนแผ่น SDS-PAGE gel แล้วนำไป elute เพื่อให้โปรตีนหลุดออกมา แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin ตามวิธีมาตรฐาน ชิ้นเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยจะถูกนำไปแยกโดยใช้ HPLC ด้วยคอลัมน์ 0.18 x 100 มม. (Thermo Electron, USA) และวิเคราะห์โดยใช้ Finnigan LTQ linear ion trap mass spectrometer (Thermo Electron)

3. การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ใช้หลักการ Chromatography โดยใช้เครื่อง AKTA Explorer FPLC System ทำ 3 ขั้นตอน คือ

3.1 Anion-exchange chromatography

โดยการนำโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วน supernatant ของ *E. coli* lysate มาฉีดเข้าสู่ HiTrapQ column ซึ่งเป็น anion-exchanger ที่ถูกทำให้อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ A (20mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM $CaCl_2$)

แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ A จำนวน 2 column volume (CV) โปรตีนที่จับอยู่กับ column จะถูก elute ออกมาด้วย step-wise gradients ของ 0-1 M NaCl จำนวน 11 CV

3.2 Hydrophobic chromatography

นำโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 1 มารวมกัน ปรับให้มีความเข้มข้นของเกลือเท่ากับบัฟเฟอร์ แล้วนำไปผ่าน HiTrap Phenyl HP column ซึ่งเป็น hydrophobic column ที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ (20mM Tris-HCl pH 7.4, 4 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$) จากนั้นทำการ elute โปรตีน CyaA-PF ที่จับอยู่กับคอลัมน์ออกมาด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 4-0 M แบบ linear gradient จำนวน 10 CV

3.3 Size exclusion chromatography

นำโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้นจากการผ่าน anion และ hydrophobic chromatography มาแล้ว มาทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วฉีดเข้าสู่ Superose12 10/300 GL column ซึ่งเป็น size exclusion colum ที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ A โปรตีนสารพิษ CyaA-PF จะถูกแยกและ elute ออกมาด้วยอัตราการไหลของ mobile phase ที่ 0.5 มล./นาที จำนวน 1 CV

Elution fractions ต่างๆที่มีโปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นจากแต่ละขั้นตอนจะถูกวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ protein microassay reagent (Bradford, BioRad) และใช้ bovine serum albumin (Sigma) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ส่วนความบริสุทธิ์ของโปรตีนสามารถตรวจสอบด้วย SDS-PAGE

4. Intrinsic fluorescence spectroscopy

ในการศึกษานี้มีการใช้ intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่ถูกและไม่ถูกเติมหมู่ palmitoyl การวัด fluorescence spectrum โดยใช้เครื่อง Shimadzu RF 5001PC โดยการทำ emission scanning ของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF เข้มข้นประมาณ 20 μg/ml โดยใช้ quartz cell ที่มีความยาว path length 0.5 ซ.ม. การทดลองนี้ทำที่อุณหภูมิห้อง และใช้ excitation wavelength ที่ 280 nm ส่วน emission spectra ทำการบันทึกตั้งแต่ 300-450 nm โดยมีการหักลบ background spectrum ออกจาก spectrum ของโปรตีน

5. Haemolytic activity assay

นำ defribrinated sheep blood มาปั่นที่ 1,200xg นาน 5 นาที เก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อยู่ด้านล่างหลอด แล้วล้างด้วย Tris-buffered saline solution (145 mM NaCl, 5 mM glucose, 2 mM $CaCl_2$, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) แล้วนำมา resuspend ให้ได้จำนวนเซลล์ $5x10^8$ เซลล์/มล. ในการทดสอบฤทธิ์การทำให้เม็ดเลือดแดงแกะแตก ให้นำ soluble *E. coli* lysate มาจำนวน 200 μl (~10 μg) เติมลงไปในหลอดที่มีสารแขวนตะกอนของเม็ดเลือดแดงอยู่ 800 μl แล้วบ่มที่ 37°C นาน 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นที่ 1,200xg นาน 2 นาที นำเอาส่วนสารละลายใสสีแดงด้านบนที่มี haemoglobin อยู่นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{540} ทั้งนี้มีการใช้โปรตีนในส่วน soluble lysate ที่ได้จากการแสดงออกของเซลล์ *E. coli* ที่มี pET17b vector ในปริมาณที่เท่ากันเป็น negative control และใช้เม็ดเลือดแดงในปริมาณที่เท่ากันและทำให้แตกด้วย Triton-X 100 เป็นการแตกของเม็ดเลือดแดง 100% และใช้ค่าการดูดกลืนแสงของ haemoglobin นี้เป็นค่าของ 100% haemolysis คำนวณเปอร์เซ็นต์การแตกของเม็ดเลือดแดงแกะโดยใช้ [OD_{540} ตัวอย่าง - OD_{540} negative control] / [OD_{540} ของ 100% haemolysis - OD_{540} negative control]

6. Liposome perturbation assay

6.1 การเตรียม calcein-entrapped large unilamellar vesicles (LUVs)

การศึกษาฤทธิ์ในการรบกวนผนังเมมเบรน (membrane perturbation) ของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ทำโดยการเตรียม calcein-entrapped large unilamellar vesicles (LUVs) ซึ่งเตรียมจากไขมันผสมของ Phosphatidylcholine (PC)/Phosphatidyl-ethanolamine (PE)/Cholesterol (Ch) (Avanti Polar Lipid,

USA) ในอัตราส่วน 10:10:1 w/w ความเข้มข้น 10 มก./มล. ละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform) จากนั้นทำให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้งภายใต้บรรยากาศของกาซไนโตรเจน จนกระทั่งได้แผ่นฟิล์มของไขมัน นำมาผสมกับ 60 mM calcein จำนวน 200 µl (โดยทำให้ละลายก่อนใน 100 mM Na_2CO_3, pH9.0) และ freeze-thaw จำนวน 5 รอบ แล้วจึงใช้ syringe extruder บีบ (squeeze) lipid suspension ผ่าน polycarbonate membrane ที่มีขนาดของรู (pore size) 0.1 µm หลังจากนั้นจึงล้าง unentrapped calcein ออกจาก LUV suspension โดยวิธี gel filtration โดยใช้ HiTrap desalting column ที่ทำให้อิ่มตัวด้วย 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0. คำนวณหาความเข้มข้นโดยประมาณของลิโปโซมจากการวัดปริมาณ lipid phosphorus content โดยใช้ 1mM Na_2HPO_4 0, 10, 20, 30 and 40 µl เป็นสารมาตรฐาน และใช้ความเข้มข้นของ LUV ที่ 1.25 µM ในการทำ calcein-release assay

6.2 Calcein release assay

ใช้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์จำนวน 2.5 µg เติมลงในสารแขวนตะกอนของ LUV จำนวน 400 µl ใน 1-cm light-path polymethyl methcrylate cuvette เป็นเวลา 1,500 and 2,000 seconds หากมีการรบกวนผนังของเมมเบรนจะมีการปล่อย calcein ที่ถูกกักไว้ภายในลิโปโซมออกมาและสามารถวัดค่า fluorescence intensity ที่เพิ่มขึ้นได้ โดยการวัด Fluorescence ใช้เครื่อง spectrofluorometer ที่ λ485 nm ในการ excitation และ λ520 nm ในการ emission โดยใช้ slit width 5 nm. ทั้งนี้ maximum fluorescence release วัดได้หลังจากการเติม 0.1% (v/v) Triton X-100 ลงในสารแขวนตะกอนของลิโปโซมเพื่อทำให้ลิโปโซมแตกทั้งหมด

Percentage ของ total fluorescence (F_t) หาได้จาก

$$F_t = (I_t - I_0 / I_f - I_0) \times 100$$

เมื่อ I_0 = initial fluorescence

I_f= total fluorescence ที่วัดได้หลังจากการเติม Triton X-100

I_t = fluorescence ที่วัดได้หลังจากการเติมตัวอย่างโปรตีน