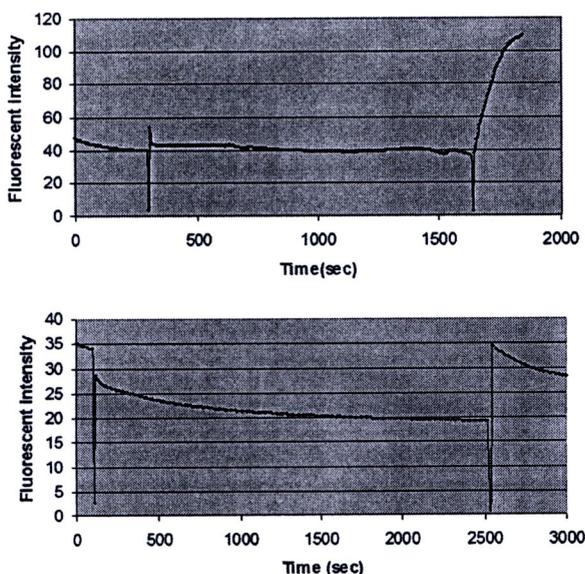




Liposome perturbation assay

ผลการวัดฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษ acylatedCyaA-PF ต่อการรบกวนผนังของลิโปโซม ทำได้โดยใช้ calcein release assay พบว่าเมื่อเติมโปรตีนสารพิษ acylatedCyaA-PF ในรูปบริสุทธิ์ ปริมาณ 2.5 μg ไม่มีการเพิ่มของ fluorescence activity ทั้งในช่วงเวลา 1,500 และ 2,000 วินาที (รูปที่ 11) แสดงว่าโปรตีนสารพิษ acylatedCyaA-PF ในความเข้มข้นนี้ไม่มีผลต่อการรบกวนผนังของลิโปโซม

ทั้งนี้ในขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่ต้องการในการทำการวิเคราะห์และการเก็บโปรตีนไว้เพื่อรอทำ Liposome perturbation ทำให้โปรตีนถูกสลายไป ประกอบกับในการศึกษานี้ได้ขอความอนุเคราะห์ทำการทดลองจากห้องปฏิบัติการของ รศ.ดร.ชนันท์ อังศุรณสมบัติ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล จึงยังไม่ได้ข้อมูลของการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนต่อผลการรบกวนผนังของลิโปโซม จึงยังไม่สามารถเปรียบเทียบฤทธิ์ในการรบกวนผนังลิโปโซมและฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้



รูปที่ 11 การวัด calcein release assay

สรุปผลการศึกษา

ในการศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์โดยใช้กระบวนการทาง chromatography ร่วมกัน 3 ขั้นตอน แต่พบว่ามี การสูญเสียโปรตีนในระหว่างกระบวนการมากทำให้ % recovery ได้เพียง 8% ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างต่ำแม้ว่าจะได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงมากกว่า 90% ก็ตาม ทั้งนี้ได้มีการแก้ไขและปรับปรุงวิธีการแต่ยังไม่สามารถเพิ่ม % yield ในปริมาณที่ต้องการได้ นอกจากนี้พบว่าโปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วยังถูกย่อยสลายให้ชิ้นขนาดเล็กลงได้อีก ทำให้เมื่อเก็บโปรตีนไว้เพื่อรอวิเคราะห์ฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษจึงลดลงไปได้มาก แต่อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ประมาณ 60 % แต่ยังไม่สามารถสรุปผลต่อการออกฤทธิ์ต่อการรบกวนผนังลิโปโซมได้ ทั้งนี้อาจต้องใช้วิธีการอื่นในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ เช่น การเพิ่ม affinity tag (เช่น His-tag) ลงในพลาสมิด pCyaA-PF เพื่อให้สามารถทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ affinity chromatography ขั้นตอนเดียวได้ ซึ่งจะช่วยให้ % yield สูงขึ้น ลดเวลาในการทำงาน ทำให้สามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ของโปรตีนได้ในเวลาที่รวดเร็วและควบคุมได้