



เอกสารอ้างอิง

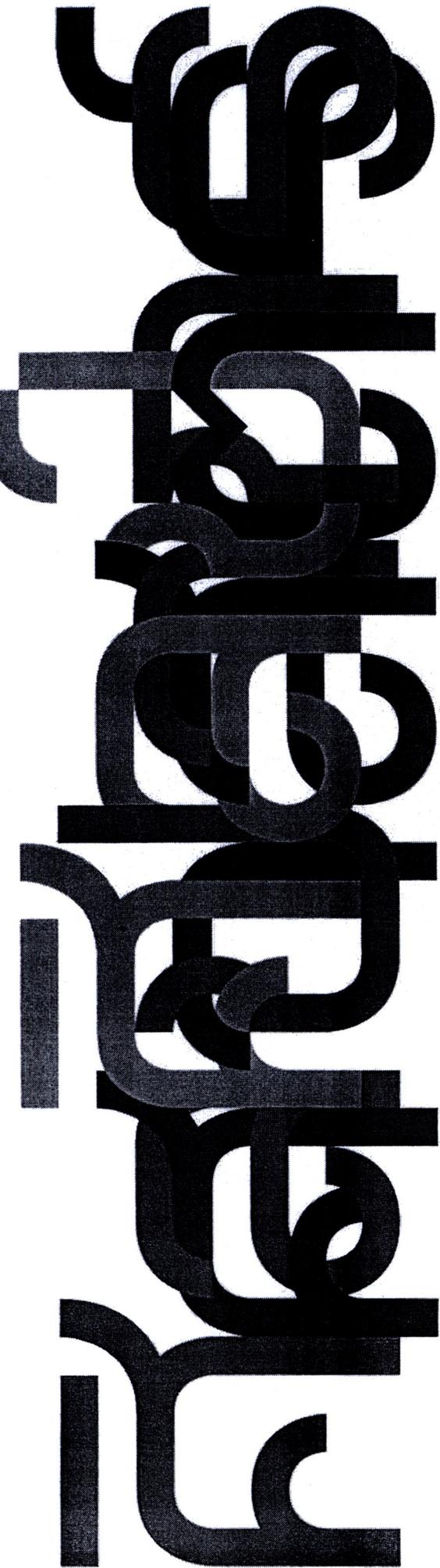
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hewlett, E.L., 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* 266, 433-435.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J., Sebo, P., 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1076-1112.
- Pojanapotha, P., Thamwiriyasati, N., Powthongchin, B., Katzenmeier, G., Angsuthanasombat, C., 2010. *Bordetella pertussis* CyaA-RTX subdomain requires calcium ions for structural stability against proteolytic degradation. *Protein Expr. Purif.* 75, 127-132.
- Powthongchin, B., Angsuthanasombat, C., 2008. High level of soluble expression in *Escherichia coli* and characterisation of the CyaA pore-forming fragment from a *Bordetella pertussis* Thai clinical isolate. *Arch. Microbiol.* 189, 169-174.
- Powthongchin, B., Angsuthanasombat, C., 2009. Effect on haemolytic activity of single proline substitutions in the *Bordetella pertussis* CyaA pore-forming fragment. *Arch. Microbiol.* 191, 1-9.
- Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P., Ladant, D. 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J. Biol. Chem.* 267, 13598-13602.
- Welch, R.A., 1991. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 521-528.

Output

Poster presentations:

บุษบา ฝ่าทองจีน ฉัตรชัย ฝ่าทองจีน. การทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA เฉพาะส่วนที่ทำให้เกิดรูรั่วบนเยื่อหุ้มเซลล์บริสุทธิ์. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/สร้างสรรค์ “ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 4: “บูรณาการศาสตร์และศิลป์ คือ ศิลปากร”. นครปฐม ประเทศไทย. 19-21 มกราคม 2554.

ภาคผนวก



บทคัดย่อผลงานวิจัย และผลงานสร้างสรรค์

Research Abstracts and Creative Works

การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/สร้างสรรค์
ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 4 "บูรณาการศาสตร์และศิลป์ คือ ศิลปากร"
19-21 มกราคม 2554
ณ ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบ พระชนมพรรษา
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
อ.เมืองนครปฐม จ.นครปฐม

บทคัดย่อผลงานวิจัยและผลงานสร้างสรรค์
(Research Abstracts and Creative Works)

การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/สร้างสรรค์
"ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 4 : บูรณาการศาสตร์และศิลป์ คือ ศิลปากร"
(Silpakorn University Research Fair 4)

19-21 มกราคม 2554

ณ ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบพระชนมพรรษา
มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

จัดโดย

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

โทรศัพท์ 0 3425 5808, 0 3421 9013

โทรสาร 0 3421 9013

E-mail : research_inst@su.ac.th

www.surdi.su.ac.th

และเครือข่ายวิจัยอุดมศึกษาภาคกลางตอนล่าง สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

www.thaiwest.su.ac.th



การทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA เฉพาะส่วนที่ทำให้เกิดรูรั่วนเยื่อหุ้มเซลล์บริสุทธิ์ Purification of the *Bordetella pertussis* CyaA pore-forming fragment

บุษบา เผ่าทองจีน¹ และ ฉัตรชัย เผ่าทองจีน¹

Busaba Powthongchin¹ and Chatchai Powthongchin¹

บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษ Adenylate cyclase-haemolysin (CyaA) จากเชื้อ *Bordetella pertussis* มีโครงสร้างประกอบด้วยส่วนที่เป็นเอนไซม์ adenylate cyclase (AC) และส่วนที่ทำให้เกิดรูรั่วนเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย (PF-domain) ก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้โคลนยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนเฉพาะส่วน CyaA-PF (cyaA-PF) และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ acyltransferase (cyaC) ลงในพลาสมิดเดียวกัน 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 พบว่าโปรตีนสารพิษนี้ทำให้เม็ดเลือดแดงแกะแตกได้สูง แต่การใช้ crude extracts นั้นไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างหน้าที่ หรือใช้ในการตรวจเอกลักษณ์บางอย่างจึงจำเป็นต้องใช้โปรตีนเดี่ยวในรูปบริสุทธิ์ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์ พบว่าการใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟี 3 ขั้นตอนร่วมกันโดยเริ่มจาก anion-exchange, hydrophobic interaction และ size-exclusion chromatography ตามลำดับ ทำให้ได้โปรตีน CyaA-PF ที่บริสุทธิ์ถึง 90% แต่ผลผลิตสุดท้ายที่ได้ค่อนข้างต่ำ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

คำสำคัญ : โปรตีนสารพิษ adenylate cyclase-haemolysin CyaA การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โครมาโทกราฟี

Abstract

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. Previously, we constructed the recombinant pCyaAC-PF plasmid containing the CyaA-PF domain together with CyaC 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. However, the purified protein is still

¹ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000 ประเทศไทย

Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand



required for further functional or structural studies. In this study, we aim to develop efficient procedures for purifying CyaA-PF. By using anion-exchange, hydrophobic interaction and size exclusion chromatography, respectively, the 90% purified CyaA-PF was obtained but relatively low percent yield. Attempt should be made to increase the recovery yield of purified protein for future studies.

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



ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ ดร. บุษบา เผ่าทองจีน (Dr. Busaba Powthongchin)
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาชีวโมเลกุลศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000
โทร 0-3425-5800 โทรสาร 0-3425-5801
E-mail: busaba.p@su.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2531	ตรี	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2536	โท	เภสัชกรรม	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2550	เอก	อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

5. สาขาวิชาการที่ความชำนาญพิเศษ

- Pharmaceutical Sciences
- Structural Biochemistry of Bacterial Protein Toxins

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

1. โครงการ การพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างเกลียวอัลฟาของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF จากเชื้อ *Bordetella pertussis* ส่วนที่คาดว่าแทรกตัวเข้าสู่ผนังหุ้มเซลล์
โดยการสนับสนุนจาก ศูนย์พัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สกว. (2551-2553)

6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ย้อนหลัง 5 ปี)

1. Kurehong, C., Powthongchin, B., Thamwiriyasati, N. & Angsuthanasombat, C. (2011) Functional significance of the highly conserved Glu⁵⁷⁰ in the putative pore-forming helix 3 of the *Bordetella pertussis* haemolysin toxin. *Toxicon* **57**: 897-903.
2. Pojanapotha, P., Thamwiriyasati, N., Powthongchin, B., Katzenmeier, G. & Angsuthanasombat, C. (2011) *Bordetella pertussis* CyaA-RTX subdomain requires calcium ions for structural stability against proteolytic degradation. *Protein Express. Purif.* **75**: 127-132.
3. Thamwiriyasati, N., Powthongchin, B., Kittiworakarn, J., Katzenmeier, G. & Angsuthanasombat, C. (2010) Esterase activity of *Bordetella pertussis* CyaC-acyltransferase against synthetic substrates: Implications for catalytic mechanism *in vivo*. *FEMS Microbiol. Lett.* **340**: 183-190.

4. Powthongchin, B. & Angsuthanasombat, C. (2009) Effects on haemolytic activity of single proline substitutions in the *Bordetella pertussis* CyaA pore-forming fragment. *Arch. Microbiol.* **191**: 1-9.
5. Powthongchin, B. & Angsuthanasombat, C. (2008) High level of soluble expression in *Escherichia coli* and characterisation of the CyaA pore-forming fragment from a *Bordetella pertussis* Thai clinical isolate. *Arch. Microbiol.* **189**: 169-174.

Poster Presentation :

1. บุชบา เผ่าทองจีน อัครชัย เผ่าทองจีน. การทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA เฉพาะส่วนที่ทำให้เกิดรูรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์บริสุทธิ์. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/สร้างสรรค์ “ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 4: “บูรณาการศาสตร์และศิลป์ คือ ศิลปากร”. นครปฐม ประเทศไทย. 19-21 มกราคม 2554.
2. Powthongchin, B., Kurehong, C., Thamwiryasati, N., Angsuthanasombat, C. Functional Importance of Glu⁵⁷⁰ and Glu⁵⁸¹ in α 3 of *Bordetella pertussis* CyaA Pore-forming Fragment: Homology Modelling and Site-directed Mutagenesis. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 10. Petchaburi, Thailand. Oct.14-16, 2010.
3. Powthongchin, B., Kurehong, C., Angsuthanasombat C. Glu⁵⁷⁰ and Glu⁵⁸¹ of the putative transmembrane helix 3 play a crucial role in haemolytic activity of the *Bordetella pertussis* CyaA-PF toxin. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9. Petchaburi, Thailand. Oct.15-17, 2009.
4. Thamwiryasati, N., Powthongchin, B., Kittiworakarn, J., Katzenmeier, G., Angsuthanasombat, C. Hydrolysis of synthetic substrate *in vitro* by purified CyaC-acyltransferase cloned from *Bordetella pertussis*: Implication for catalytic mechanism. *Biophysical Society: 54th Annual Meeting*. San Francisco, USA. Feb. 20-24, 2010.
5. Pojanapotha, P., Powthongchin, B., Angsuthanasombat, C. *Bordetella pertussis* CyaA-RTX subdomain requires calcium for structural stabilisation. *The American Society for Cell Biology, 48th Annual Meeting*, San Francisco, USA, Dec. 13-17 2008.
6. Thamwiryasati, N., Powthongchin, B., Angsuthanasombat, C. Purified CyaC-acyltransferase cloned from *Bordetella pertussis* catalyzes the hydrolysis of synthetic substrates *in vitro*. *The American Society for Cell Biology, 48th Annual Meeting*, San Francisco, USA, Dec. 13-17, 2008.
7. Pojanapotha, P., Nukoolkarn, S., Powthongchin, B. and Angsuthanasombat, C. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-haemolysin toxin: Calcium-binding studies in the RTX subdomain. *The 11th Biological Sciences Graduate Congress: Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable Development, and Secured Future*, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, Dec. 15-17, 2006.
8. Thamwiryasati, N., Powthongchin, B., Katzenmeier, G., Angsuthanasombat, C. Purification and Characterization of the *Bordetella pertussis* Acyltransferase, CyaC. *The 11th Biological Sciences Graduate Congress: Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable Development, and Secured Future*, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Dec. 15-17, 2006.



ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ ฉัตรชัย เผ่าทองจีน (Chatchai Powthongchin)
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อกับพร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000
โทร 0-3425-5800 โทรสาร 0-3425-5801
E-mail: chatchai@su.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2528	ตรี	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2537	โท	เภสัชศาสตร์ (สรีรวิทยา)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

5. สาขาวิชาการที่ความชำนาญพิเศษ

- Pharmaceutical Sciences
- Physiology (Brain function)
- Bioinformatics

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

1. โครงการ การศึกษาลักษณะองค์ประกอบด้านโมเลกุลของยา Erythropoietin (Epoetin alpha) ที่ขึ้นทะเบียนและจำหน่ายในประเทศไทย ระยะที่ 1
โดยการสนับสนุนจาก กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (งบประมาณปี พ.ศ. 2555)

6.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. โครงการ การวิจัยเพื่อพัฒนาฐานข้อมูลการประเมินเทคโนโลยีด้านสุขภาพในประเทศไทย
โดยการสนับสนุนจาก สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.)
2. โครงการ การพัฒนาฐานข้อมูลการประเมินเทคโนโลยีและนโยบายด้านสุขภาพระยะที่ 2 (พ.ศ. 2553-2555)
โดยการสนับสนุนจาก โครงการประเมินเทคโนโลยีและนโยบายด้านสุขภาพ (HITAP)

Poster Presentation :

1. บุชบา เผ่าทองจีน ฉัตรชัย เผ่าทองจีน. การทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA เฉพาะส่วนที่ทำให้เกิดรูรั่วนบนเยื่อหุ้มเซลล์บริสุทธิ์. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/สร้างสรรค์ “ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 4: “บูรณาการศาสตร์และศิลป์ คือ ศิลปากร”. นครปฐม ประเทศไทย. 19-21 มกราคม 2554.
2. Kapol N, Chalongsuk R, Lochid-amnuay L, Sribundit N, Amrumpai Y, Maitreemit P, Powthongchin C. Economic evaluation database: Main features and accessibility. 68th International Congress of FIP, Basel, Switzerland, 29 August-4 September 2008.

