

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46217

การบดขยี้ของกระดูกสันหลังของเตลารมีโนเจน และกลไกแรงรบกวนใหม่จาก
พิษยูเรียผ่านทางใหม่ของเห็ดง (คลิปป์เทโรโทรปส์ อัลโบราบีต)

นางสาววรรณาภรณ์ แม่นคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

600256067

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46217

การแสดงผลและศึกษาคุณสมบัติของพลาสมาไอออน แอคทีเวเตอร์ชนิดพลาสมา
พืชมุ่งเขียวทางใหม่ท้องถิ่น (คลิปปเทไลทอปส์ อัลโบลาบรีส)



นางสาววรรณภรณ์ แผ่นคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 9 7 4 8 1 5 3 3 0

Expression and characterization of a novel plasminogen activator
from green pit viper (*Cryptelytrops albrolabris*)



Miss Wannaporn Phankham

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

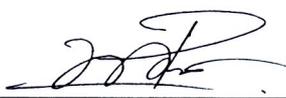
วรรณกรรม แผ่นคำ : การแสดงออกและศึกษาคุณสมบัติของพลาสมิโนเจน แอคทีเวเตอร์ชนิดใหม่จากพิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลือง (คลิปปเทไลทรอปส์ อัลโบลาบรีส).

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL
PLASMINOGEN ACTIVATOR FROM GREEN PIT VIPER
(CRYPTELETROP ALBOLABRIS)

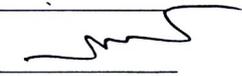
อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : พลภัทร โรจน์นครินทร์, 66 หน้า.

E46217

พิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลือง (คลิปปเทไลทรอปส์ อัลโบลาบรีส) ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ที่มีผลต่อระบบการแข็งตัวของเลือด ซีรีนโปรตีเอสเป็นกลุ่มของโปรตีนที่สำคัญชนิดหนึ่ง ที่พบได้ในพิษงูชนิดนี้ การศึกษานี้เราได้โคลนยีนซีรีนโปรตีเอสตัวใหม่จากห้องสมุดยีนของต่อมพิษงู จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน คาดว่าโปรตีนน่าจะมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นพลาสมิโนเจน จากนั้นยีนได้ถูกโคลนโดยใช้ pPICZαA เป็นพาหะ และ แสดงออกโปรตีนที่ติดฉลากด้วยฮิสทีดีนในยีสต์ *Pichia pastoris* พบว่าการเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนโดยใช้เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรทำให้ยีสต์สามารถสร้างโปรตีนนี้ได้ปริมาณมากกว่าใช้เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และเมื่อใช้แอนติบอดีต่อฮิสทีดีนบน Western blots พบว่าโปรตีนที่แสดงออกมีขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน และการตรวจคุณสมบัติพบว่าโปรตีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นพลาสมิโนเจนเป็นพลาสมินจริง แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเกล็ดเลือด โปรตีนนี้อาจสามารถพัฒนานำมาใช้เป็นยาละลายลิ่มเลือดเพื่อการรักษาโรคในอนาคค

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต 

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก 

4974815330: MAJOR MEDICAL SCIENCE

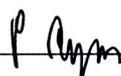
KEYWORDS: Serine Protease / Plasminogen activator / Green Pit Viper / *Pichia pastoris*

Wannaporn Phankham: Expression and characterization of a novel plasminogen activator from green pit viper (*Cryptelytrops albrolabris*). THESIS ADVISOR: Assoc. PROF. PONLAPAT ROJNUCKARIN, MD, PhD., 66 pp.

E46217

Snake venom is a mixture of several proteins affecting hemostatic system. Serine protease is one of the important protein families found in Green pit viper (GPV, *Cryptelytrops allbolabris*) venom. In this study, a novel serine protease gene was cloned from the GPV venom gland cDNA library. Amino acid sequence analysis predicted that it was a plasminogen activator. The serine protease cDNA was cloned in the pPICZQA vector and, then, expressed in the *Pichia pastoris* system. The histidine-tagged recombinant protein production was higher after the induction using 1.0% (v/v), compared with 0.5% of methanol. This system was able to produce the 37 kDa protein on a Western blot probed by anti polyhistidine antibody. *In vitro* activities of the protein was tested and found that it contained a plasminogen activator activity. However, there was no effect on platelet aggregation. This protein has a potential to be a therapeutic thrombolytic agent in the future.

Field of study : Medical Science Student's Signature 

Academic Year : 2010 Advisor's Signature 

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Thai Research Fund and The Commission on Higher Education. Thus, I would like to express my gratitude to those who allowed me to succeed in this project. First of all, I am deeply grateful to my advisor, Associate Professor Ponlapat Rojnuckarin, M.D., Ph.D., for his kindness, care, support, guidance and encouragement during the time I worked on this thesis. My advisor has been very devoted and supportive from the initial to the final stage of this thesis which enabled me to obtain the insight of the issue. Besides from my advisor, I am also greatly appreciated other committee members; Prof. Apiwat Mutirangura, Asst.Prof. Tewin Tencomnao, and Asst. Prof. Yuttana Mundee for their comments and guidance during the work on this thesis.

I also feel that I am blessed to have my parents and my family who have always been there for me. I am thankful for the love, care, understanding and encouragement.

Lastly, I would like to offer my gratitude and blessing to all people at Hematology in Chulalongkorn hospital and all my beloved friends in the laboratory who supported me in any aspect during the completion of this project.

CONTENTS

| | Page |
|----------------------------------------------------------------|-------------|
| ABSTRACT (THAI) | iv |
| ABSTRACT (ENGLISH) | v |
| ACKNOWLEDGEMENTS | vi |
| CONTENTS | vii |
| LIST OF TABLES | x |
| LIST OF FIGURES | xi |
| LIST OF ABBREVIATIONS | xiii |
| | |
| CHAPTER I INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Background and Rationale | 1 |
| 1.2 Research Questions | 6 |
| 1.3 Hypothesis | 6 |
| 1.4 Objectives | 6 |
| 1.5 key Words | 6 |
| 1.6 Conceptual Framework | 7 |
| 1.7 Benefits and Applications | 8 |
| | |
| CHAPTER II LITERATURE REVIEW | 9 |
| 2.1 Snake Venom Serine Protease (SVSPS) | 9 |
| 2.2 The Expression System | 12 |
| 2.3 Plasminogen Activator System and Thrombolytic Agents | 13 |

| | Page |
|---------------------------------------------------------------------|-------------|
| CHAPTER III MATERIALS AND METHODS | 16 |
| 3.1 Materials | 16 |
| 3.1.1 Cloning of snake venom serine proteinase | 16 |
| 3.1.2 Expression of serine protease in <i>Pichia pastoris</i> | 18 |
| 3.1.3 Activity Assay | 20 |
| 3.2 Methods | 20 |
| 3.2.1 Expression of GPV-PA in <i>Pichia pastoris</i> | 20 |
| 3.2.2 Purification of Recombinant Proteins | 26 |
| 3.2.3 Protein Detection | 26 |
| 3.2.4 Quantitative Assay for Recombinant Proteins | 28 |
| 3.2.5 Plasminogen Activator Activity Assay | 28 |
| 3.2.6 Platelet Aggregation Assay | 29 |
| CHAPTER IV RESULTS | 30 |
| 4.1 Expression of A Novel Snake Venom | |
| Serine Proteinase (SVSP) in <i>Pichia pastoris</i> | 30 |
| 4.1.1 Amplification of GPV-PA using | |
| Polymerase Chain Reaction (PCR) | 30 |
| 4.1.2 Ligation of GPV-PA into pGEM [®] T-vector | |
| and Transformation of <i>E. coli</i> , JM 109 | 31 |
| 4.1.3 Ligation of GPV-PA into pPICZ α A | |
| and Transformation of <i>E. coli</i> , JM 109 | 32 |
| 4.1.4 Sequence Alignment and Computational | |
| Searching Analysis | 33 |

| | Page |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| 4.1.5 Transformation of Recombinant pPICZαA | |
| Into <i>Pichia pastoris</i> , X-33 | 39 |
| 4.1.6 Recombinant GPV-PA from <i>Pichia pastoris</i> | 40 |
| 4.2 Characteristics and Functional of Recombinant Protein | 41 |
| 4.2.1 Characteristics and Functional of | |
| Recombinant Protein | 41 |
| 4.2.2 Plasminogen Activity Assay | 42 |
| 4.2.3 Platelet Aggregation Assay | 43 |
| CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSION | 44 |
| REFERENCES | 48 |
| APPENDIX | 55 |
| BIOGRAPHY | 66 |

LIST OF TABLES

| | Page |
|-------------------------------------------------------------|-------------|
| Table 1 Oligonucleotides and their descriptions..... | 15 |

LIST OF FIGURES

| | Page |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figure 1 Overview of the fibrinolytic system. <i>t-PA</i> , Tissue Plasminogen Activator <i>u-PA</i> , Urokinase Plasminogen Activator..... | 5 |
| Figure 2 The GPV-PA coding sequence PCR product of approximately 705 bp in length electrophoresis on a 1.5% agarose gel..... | 29 |
| Figure 3 The restriction enzyme digested product of plasmid pGEMT [®] T-vector containing the construct..... | 30 |
| Figure 4 The restriction digested transformed pPICZαA vector The picture shows inserts in pPICAαA vector..... | 31 |
| Figure 5 The redundant amino acid sequence of GPV-PA..... | 32 |
| Figure 6 The homology search for cDNA sequence of GPV-PA..... | 33 |
| Figure 7 The protein sequence alignment of GPV-PA | 34 |
| Figure 8 The protein sequence alignment of GPV-PA and <i>Viridovipera stejnegeri</i> (TSV-PA)..... | 35 |
| Figure 9 The phylogenetic tree prediction of GPV-PA..... | 35 |
| Figure 10 The conserved cysteine residues of GPV-PA with aligned proteins..... | 36 |
| Figure 11 The signal peptide prediction of GPV-PA..... | 37 |
| Figure 12 The <i>SacI</i> restriction product of recombinant plasmid..... | 38 |
| Figure 13 The transformant colony into <i>Pichia pastoris</i> | 39 |
| Figure 14 The western blot analysis of GPV-PA..... | 40 |

| | Page |
|------------------------------------------------------------------|-------------|
| Figure 15 The plasminogen activation assay of GPV-PA..... | 41 |
| Figure 16 The platelet aggregation assay of GPV-PA..... | 42 |

LIST OF ABBREVIATIONS

| | |
|----------------|------------------------------------------------------------------|
| ABUS-PA | <i>Agkistrodon blomhoffii Ussurensis</i> – plasminogen activator |
| ADAMs | a disintegrin and metalloproteinase |
| ATP | adenosine triphosphate |
| APSAC | acylated plasminogen-streptokinase activator complex |
| Arg | arginine |
| bp | base pair |
| BCA | bicinchoninic acid |
| BGM | bio geno med |
| BJ-48 | <i>Bothrops jararacussu</i> -48 |
| °C | degree Celsius |
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid |
| CRD | calcium regulation domain |
| Cys | cysteine |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| DSPA | <i>Desmodus rotundus</i> plasminogen activator |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | ethylenediaminetetra acetic acid |
| FDP | fibrin-fibrinogen degradation product |
| g | gram |
| GPV-PA | green pit viper plasminogen activator |
| GSPs | gene specific primers |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| HD | histidine-aspartate |
| HK | histidine-lysine |

| | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|
| IC ₅₀ | concentration of inhibitor required to inhibit 50 % aggregation |
| IPTG | isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside |
| kDa | kiloDalton |
| L | Liter |
| LAAO | L-amino acid oxidase |
| LB | Luria-Bertani media |
| LV-Ka | <i>Lachesis muta muta</i> venom kallikrein-like |
| mg | milligram |
| ml | milliliter |
| mM | millimolar |
| M | molar |
| nM | nanomolar |
| N | normal |
| OD | optical density |
| PAI-1 | plasminogen activator inhibitor-1 |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PLA ₂ | phospholipase A ₂ |
| PPP | platelet poor plasma |
| pro-UK | prourokinase |
| PVDF | polyvinylidene difluoride |
| RACE | rapid amplification of cDNA end |
| RGD | Arg-Gly-Asp |
| rt-PA | recombinant tissue type plasminogen activator |
| SAK | Staphylokinase |
| scu-PA | single chain urokinase-type plasminogen activator |
| SDS | sodiumdodesylsulphate |

| | |
|---------------|------------------------------------------------------------------|
| SDS-PAGE | sodiumdodesylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SK | streptokinase |
| SVTLEs | snake venom thrombin-like enzyme |
| SVMPs | snake venom metalloproteinases |
| SVSPs | snake venom serine proteinases |
| tcu-PA | two-chain derivative urokinase-type plasminogen activator |
| t-PA | tissue-type plasminogen activator |
| Tris-HCl | tris-(hydroxymethyl)-aminoethane |
| TSV-PA | <i>Trimeresurus stejnegeri</i> snake venom plasminogen activator |
| u-PA | urokinase-type plasminogen activator |
| Val | valine |
| YPDS | yeast extract peptone dextrose medium |
| v/v | volume/volume |
| w/v | weight/volume |
| α 2-AP | α 2 antiplasmin |
| μ g | microgram |
| μ l | microliter |
| μ m | micrometer |