ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46217

การแสดงออกและศึกษาคุณสมบัติของเซลล์มีโนเจน แอคทิเวเตอร์ชนิดใหม่จาก พิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลือง (คริปโทโลหรอปส์ อัลโบลาบริส)

นางสาววรรณภรณ์ แย้มคล้ำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00256067

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46217

การแสดงออกและศึกษาคุณสมบัติของพลาสมิโนเจน แอคทิเวเตอร์ชนิดเนื้อเยื่อ พิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลือง (คลิปเทไลทรอปส์ อัลโบลาบริส)

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

นางสาววรรณภรณ์ แผ่นคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4974815330

Expression and characterization of a novel plaminogen 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

Thesis Title	EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL PLASMONOGEN ACTIVATOR FROM GREEN PIT VIPER (CRYPTELYTROP ALBOLABRIS)
BY	Miss Wannaporn Phankham
Field of study	Medical Science
Thesis advisor	Associated Professor Ponlapat Rojnuckarin, M.D., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Adisorn Pattradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

.....Thesis advisor

(Associate Professor Ponlapat Rojnuckarin, M.D., Ph.D.)

..... Examiner

(Assistant Professor Tewin Tencomnao., Ph.D.)

..... External Examiner

(Assistant Professor Yuttana Mundee, Ph.D.)

วรรณภรณ์ แผ่นคำ : การแสดงออกและศึกษาคุณสมบัติของพลาสมิโนเจนแอคทิเวเตอร์ชนิดใหม่จากพิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลือง (คลิปเทไลทรอปส์ อัลโบลาบรีส).

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

อ. ที่ปรึกษาวิทยาพนธ์หลัก : พลภัทร โรจน์นครินทร์, 66 หน้า.

E46217

พิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลือง (คลิปเทไลทรอปส์ อัลโบลาบรีส) ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ที่มีผลต่อระบบการแข็งตัวของเลือด ซีรีนโปรตีเอสเป็นกลุ่มของโปรตีนที่สำคัญชนิดหนึ่ง ที่พบได้ในพิษงูชนิดนี้ การศึกษานี้เราได้โคลนยีนซีรีนโปรตีเอสตัวใหม่จากห้องสมุดยีนของต่อมพิษงู จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอมิโน จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอมิโน คาดว่าโปรตีนน่าจะมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นพลาสมิโนเจน จากนั้นยีนได้ถูกโคลนโดยใช้ pPICZαA เป็นพาหะ และ แสดงออกโปรตีนที่ติดฉลากด้วยฮิสทิดีนในยีสต์ Pichia pastoris พบว่าการเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนโดยใช้เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรทำให้ยีสต์สามารถสร้างโปรตีนนี้ได้ปริมาณมากกว่าใช้เมธานอลความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และเมื่อใช้แอนติบอดีต่อฮิสทิดีนบน Western blots พบว่าโปรตีนที่แสดงออกมีขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน และการตรวจคุณสมบัติพบว่าโปรตีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นพลาสมิโนเจนเป็นพลาสมินจริง แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเกล็ดเลือด โปรตีนนี้อาจสามารถพัฒนานำมาใช้เป็นยาละลายลิ่มเลือดเพื่อการรักษาโรคในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต _____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก _____

4974815330: MAJOR MEDICAL SCIENCE

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

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

E46217

Snake venome is a mixture of several proteins affecting hematostatic 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 pPICZαA 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 aggregarion. 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. Asides 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 *Pichia pastoris* 18

3.1.3 Activity Assay 20

3.2 Methods 20

3.2.1 Expression of GPV-PA in *Pichia pastoris* 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 *Pichia pastoris* 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 *E. coli* , JM 109 31

4.1.3 Ligation of GPV-PA into pPICZαA

and Transformation of *E. coli* , JM 109 32

4.1.4 Sequence Alignment and Computational

Searching Analysis 33

Page

4.1.5 Transformation of Recombinant pPICZαA
Into *Pichia pastoris*, X-33 39
4.1.6 Recombinant GPV-PA from *Pichia pastoris* 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.
t-PA, Tissue Plasminogen Activator
u-PA, 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 Viridovipera stejnegeri (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 *SacI* restriction product of recombinant plasmid.....38

Figure 13 The transformant colony into *Pichia pastroris*.....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	*Agkistrodon blomhoffii Ussurensis* – 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	*Bothrops jararacussu*-48
°C	degree Celsius
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CRD	calcium regulation domain
Cys	cysteine
DNA	deoxyribonucleic acid
DSPA	*Desmodus rotundus* plasminogen activator
E. coli	*Escherichia coli*
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	isopropy1-β-D-thiogalactopyranoside
kDa	kiloDalton
L	Liter
LAAO	L-amino acid oxidase
LB	Luria-Bertani media
LV-Ka	*Lachesis muta muta* 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	polyvinylidine 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	*Trimeresurus stejnegeri* 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
α2-AP	α2 antiplasmin
μg	microgram
μl	microliter
μm	micrometer