

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์หาตำแหน่งบริเวณจำเพาะของ RTX ที่ใช้จับกับตัว
ดอรับบนผิวเซลล์เป้าหมายของโปรตีนพิษ Adenylate cyclase-Hemolysin
เพื่อใช้บำบัดรักษาโรคไอกรนที่เกิดจากเชื้อ *Bordetella pertussis*
(Identification of a Specific Receptor-Binding Region in the RTX subdomain
of Adenylate cyclase-Hemolysin Toxin for Therapeutic Application of
Whooping Cough caused by *Bordetella pertussis*)

เริ่มบริการ

14 ธ.ค. 2565

หัวหน้าโครงการวิจัย: ดร.นิรมล ธรรมวิริยสดี
หน่วยงาน: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

29 มี.ค. 2565

395615

600174213

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

บทคัดย่อ

โปรตีนพิษ Adenylate cyclase - hemolysin (CyaA) เป็นโปรตีนพิษขนาดใหญ่ ~170 kDa หลังจากเชื้อ *Bordetella pertussis* เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงก่อให้เกิดพยาธิสภาพและกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โปรตีนพิษ CyaA เป็นหนึ่งในสมาชิกของ Repeat in Toxin (RTX) family เนื่องจากมีลักษณะของการเรียงลำดับกรดอะมิโนซ้ำกัน 9 ตัว คือ Gly-Gly-X-Gly-X-Asp-Asp-X-Leu (Glycine - Aspartate rich nonapeptide repeat regions) ทางด้าน C terminus ซึ่งบริเวณนี้เป็นส่วนที่จับกับ Ca^{2+} แล้วทำให้เกิดการจัดเรียงโครงสร้างของโปรตีน อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับการจับกับเซลล์เป้าหมาย จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า โปรตีนพิษ HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* อีกหนึ่งในสมาชิกของ RTX family มีบริเวณของเปปไทด์ลำดับกรดอะมิโนที่ 914-936 ที่เกี่ยวข้องในการจับกับ Glycophorin receptor บนผิวเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งตรงกับ conserved region ลำดับกรดอะมิโนที่ 1621-1627 ของ CyaA ทางด้าน C-terminus ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงตัดชิ้นส่วนเปปไทด์ทางด้าน C-terminal region ลำดับกรดอะมิโนที่ 1601-1706 ของ CyaA-RTX subdomain ด้วยการสร้าง truncate cyaA-RTX gene fragment จากโคลนต้นแบบ pCyaA-RTX ด้วยวิธี Polymerase Chain reaction และ Cloning จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทดสอบความสามารถในการจับกับเซลล์เป้าหมาย ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวคน และเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อตัดด้าน C-terminal ของ RTX subdomain ออกประสิทธิภาพในการจับกับเซลล์เป้าหมายทั้งเม็ดเลือดขาวคนและเม็ดเลือดแดงแกะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งชี้ให้เห็นว่า C-terminal region ของ CyaA toxin ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1601-1706 มีความสำคัญต่อการจับกับกลุ่มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งการออกแบบเปปไทด์ในช่วงลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวของโปรตีนพิษนี้ อาจนำไปสู่การพัฒนา peptide vaccine เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคไอกรนที่ติดเชื้อจาก *B. pertussis* ที่มี CyaA toxin เป็นปัจจัยหลักในการก่อโรคในอนาคต และสามารถนำความรู้ที่ได้ไปศึกษาลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันกับโปรตีนพิษชนิดอื่นๆในกลุ่มของ RTX toxin ต่อไปได้เช่นเดียวกัน

Abstract

Adenylate cyclase-hemolysin toxin (CyaA) is one of the major virulence factors secreted from *Bordetella pertussis*, the etiologic agent of whooping cough. It is classified into the RTX (Repeat-in-ToXin) family due to its tandem repeated nonapeptides Gly-Gly-X-Gly-X-Asp-Asp-X-Leu (Glycine - Aspartate rich nonapeptide repeat regions), which are the putative calcium-binding sites and toxin-receptor interactions. Previously *Escherichia coli* -hemolysin (HlyA), a prototype RTX family, has shown that the HlyA region of residues 914-936 can interact the glycophorin receptor in mammalian red blood cells which corresponding to the conserve region of residues 1621-1627 of CyaA. Here, a truncated clone of CyaA-RTX fragment deleting the C-terminal region of residues 1601-1706 was investigated by Polymerase Chain reaction and Cloning. The deletion mutant was tested for toxin binding activities against human white blood cells and sheep erythrocytes. The results were shown that lacking the residues 1601-1706 of RTX subdomain toxin was decrease the binding capacity to the target cells. It has been indicated that C-terminal region of CyaA toxin, corresponding to amino acids 1601-1706 major determinant in the specific binding to the target cells. The fact that a peptide containing amino acids 1601-1706 may challenge for a therapeutic application of peptide which has *B. pertussis* pathogenic role. Moreover, homologous sequences exist in other RTX toxins; thus, the results in study can probably be extended to those toxins as well.

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.6 การทดสอบความสามารถในการจับตัวรับบนผิวเซลล์	21
3.6.7 Western blot analysis	22
4. ผลการทดลอง	23
4.1 ผลการสกัดและวิเคราะห์พลาสมิด pCyaA-RTX และ pET17b vector	23
4.2 ผลการสร้างยีน <i>cyaA-RTX</i> ที่ขาดส่วน C-terminal region โดยวิธี PCR	24
4.3 ผลการสร้าง pCyaA-RTX Δ 1602-1706	25
4.4 ผลการตรวจสอบ Recombinant clones ด้วยวิธี restriction enzyme analysis	27
4.5 ผลการตรวจสอบ Recombinant clones โดยวิธี DNA sequencing	28
4.6 ผลการแสดงออกของโปรตีน truncated CyaA-RTX	29
4.7 ผลการแสดงรูปแบบของโปรตีนพิษ truncated CyaA-RTX	31
4.8 ผลการทดสอบความสามารถในการจับกับกลุ่มเซลล์เป้าหมาย	32
5. อภิปรายผล	40
5.1 การสร้าง Recombinant clones ของโปรตีนพิษ pCyaA-RTX Δ 1602-1706	40
5.2 คุณลักษณะของโปรตีนพิษ Truncate CyaA-RTX	41
5.3 การทดสอบความสามารถในการจับ (Toxin binding) ของโปรตีน WT CyaA-RTX กับ Truncate CyaA-RTX ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะและเม็ดเลือดขาวคน	42
6. สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	43
6.1 สรุปผลการทดลอง	43
6.2 ข้อเสนอแนะ	43
7. ผลผลิต	44
บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก	49
ประวัตินักวิจัย	53
ผลงานวิจัยที่เผยแพร่	55
รายงานการเงิน	

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1-1	แสดง Virulence factors ของเชื้อ <i>Bordetella pertussis</i>	4
1-2	แสดงอัตราการเกิดโรคไอกรนในปี 2555	7
1-3	แสดงโครงสร้างของโปรตีนพิษ Adenylate cyclase – hemolysin	9
1-4	แสดงสมมติฐานกลไกในการจับกับแคลเซียมตำแหน่ง RTX ของโปรตีนพิษ CyaA	9
1-5	แสดง Sequencing alignment ของ conserve region ระหว่าง Repeat domain และ C-end ของ RTX toxin	10
3-1	แสดงลักษณะของ pET17b vector และตำแหน่งของ restriction enzyme	17
4-1	แสดงผลการวิเคราะห์พลาสมิด pCyaA-RTX และ pET17b vector	23
4-2	ตรวจสอบ PCR products ที่ได้ เมื่อใช้ Ta gradient ที่ 50-60°C	24
4-3	แสดง Purified ~2600 PCR products ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกลูโซโพลีเมอเรส เมื่อใช้ Ta ที่ 52°C	25
4-4	แสดงพลาสมิดกลายพันธุ์ pCyaA-RTX ที่ตัดตำแหน่งทาง C-terminus	26
4-5	แสดงโคโลนีที่เจริญบน LA + 100 µg/ml Amp plate ในการคัดเลือก recombinant clone	26
4-6	แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการตรวจสอบ recombinant DNA โดยวิธี Restriction enzyme analysis	27
4-7	แสดงการตรวจสอบลำดับเบสของยีน <i>cyaA-RTXΔ1602-1706</i>	28
4-8	แสดง SDS-PAGE ของโปรตีน CyaA-RTX-wild type และ truncate CyaA-RTX	29
4-9	แสดงผลการทำนายน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพิษ CyaA-RTX ₇₅₁₋₁₆₀₂	30
4-10	แสดง SDS-PAGE ของลักษณะรูปแบบโปรตีน truncate CyaA-RTX ที่ได้	31
4-11A	แสดง SDS-PAGE ต่อความสามารถของโปรตีน WT CyaA-RTX ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ	32
4-11B	แสดง Western blot analysis ของแถบโปรตีน WT CyaA-RTX ต่อความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ จาก Corresponding gel	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-12A แสดง SDS-PAGE ต่อความสามารถของโปรตีน WT CyaA-RTX ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน	34
4-12B แสดง Western blot analysis ของแถบโปรตีน WT CyaA-RTX ต่อความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน จาก Corresponding gel	35
4-13A แสดง SDS-PAGE ต่อความสามารถของโปรตีน Truncate CyaA-RTX ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ	36
4-13B แสดง Western blot analysis ของแถบโปรตีน Truncate CyaA-RTX ต่อความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ จาก Corresponding gel	35
4-14A แสดง SDS-PAGE ต่อความสามารถของโปรตีน Truncate CyaA-RTX ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน	38
4-14B แสดง Western blot analysis ของแถบโปรตีน Truncate CyaA-RTX ต่อความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน จาก Corresponding gel	39

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3-1 แสดงลำดับเบสทั้งหมดของ Primer ที่ใช้ในการทำ PCR	18

สารบัญคำย่อ

AC	Adenylate cyclase domain
ATP	Adenosine triphosphate
Amp	Ampicillin
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
bp	Base pair (s)
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CyaA	Adenylate cyclase-hemolysin toxin
CyaA-PF	Pore-forming domain of adenylate cyclase-hemolysin toxin
CyaC	Acyltransferase
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	ethanol
<i>et al.</i>	And others
g	Gram (s)
HCl	Hydrochloride
Hly	Hemolysin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb	Kilobase (s)
kDa	Kilodalton (s)
L	Liter (s)
LB	Luria-Bertani medium
mm	Millimeter (s)
mg	Milligram (s)

สารบัญคำย่อ (ต่อ)

ml	Milliliter (s)
mM	Millimolar (s)
M	Molar (s)
nm	Nanometer (s)
ng	Nanogram (s)
OD	Optical density (-ies)
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PF	Pore-forming fragment
PTX	Pertussis toxin
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RTX	Repeat-in-ToXin
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
UV	Ultraviolet
V	Volt (s)
μm	Micrometer (s)
μg	Microgram (s)
μl	Microliter (s)
μM	Micromolar (s)
$^{\circ}\text{C}$	Degrees Celsius
%	Percent

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องด้วยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงจากท่าน รศ.ดร.ชนันท์ อังศุชนสมบัติ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ควบคุมโครงการวิจัย รวมถึงการแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างทำโครงการวิจัย อีกทั้งให้การสนับสนุนช่วยเหลือในทุกๆด้าน ทำให้ผู้ทำวิจัยสามารถวางแผนในการทำงานได้อย่างเป็นระบบ สามารถตัดสินใจแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้อย่างถูกต้องมีประสิทธิภาพ และสามารถนำความรู้ความสามารถที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในอนาคตได้อีกด้วย จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการโครงการฯ อ.ดร.सानิตา สิงห์สนั่น และ อ.สุธิชา จันทะ ที่กรุณามาเจาะเลือดและช่วยเหลือในการทำวิจัยชิ้นนี้

งานวิจัยชิ้นนี้จะสำเร็จไม่ได้เลย หากมิได้รับทุนสนับสนุนทุนการวิจัยจาก สำนักสำนักบริหารโครงการวิจัยอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

นิรมล ธรรมวิริยสดี

31 กรกฎาคม 2556

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคไอกรน (Whooping cough หรือ Pertussis) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ ที่มีลักษณะไอซ้อนๆ ติดกัน จนหายใจไม่ทัน และเมื่อหายใจเข้าลึกๆ เป็นเสียง วู๊ป (Whoop) สลับกับการไอเป็นชุดๆ จึงเรียกโรคนี้อีกว่า "โรคไอกรน" โดยมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) โรคชนิดนี้ติดต่อกันได้ง่ายจากไอจามรดกันโดยตรง ผู้สัมผัสโรคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันจะติดเชื้อและเกิดโรคเกือบทุกราย (1) โรคนี้นับเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการตายในเด็ก "Baby killer" ส่วนใหญ่ติดเชื้อมาจากผู้ใหญ่ในครอบครัว ที่มีการติดเชื้อแต่ไม่มีอาการ (carrier) หรือมีอาการไม่มาก โดยทั่วไปแล้ว โรคนี้นั้นเป็นได้ทุกอายุถ้าไม่มีภูมิคุ้มกัน มีผู้ป่วยประมาณ 45 ล้านคนต่อปี และมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคนี้นี้ประมาณ 400,000 คนต่อปี (1) ปัจจุบันการให้วัคซีนป้องกันโรคไอกรนในเด็กแนะนำให้ใช้วัคซีนชนิด Acellular pertussis vaccine จากส่วนของโปรตีน Filamentous hemagglutinin, Pertactin และ Fimbriae แทนที่ Whole-cell vaccine ซึ่งทำให้มีอาการข้างเคียงน้อยลงมาก(2) อย่างไรก็ตาม มีการรายงาน พบว่า วัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคไอกรนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนดการสร้างโปรตีนเหล่านี้จากเชื้อ *B. pertussis* สายพันธุ์ Tohama I (3) ส่งผลให้เกิดอุบัติการณ์การเกิดโรคอุบัติซ้ำ (Pertussis Outbreak) และ WHO ได้รายงานจำนวนผู้ป่วยที่เป็นโรคไอกรนทั่วโลกประมาณ 10,454 ราย และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในทุกๆปี (4)

โปรตีนพิษ Adenylate cyclase - hemolysin (CyaA) ที่หลังจากเชื้อแบคทีเรีย *B. pertussis* เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อนี้มีความรุนแรง (Virulence factors) อันก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคและกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในคน (5) รวมทั้งยังไม่พบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนดในการสร้างโปรตีนพิษ CyaA เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ (3) ทำให้โปรตีนชนิดนี้มีความน่าสนใจและเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตวัคซีน อย่างไรก็ตาม กลไกในการจับกันระหว่างโปรตีนสารพิษกับเซลล์เป้าหมายที่แท้จริงของโปรตีนพิษ CyaA ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดหากมีการศึกษาเพิ่มเติมองค์ความรู้ใหม่ทางโครงสร้าง คุณลักษณะ และหน้าที่ในการออกฤทธิ์ของโปรตีนพิษชนิดนี้ได้อย่างถ่องแท้ จะสามารถนำไปสู่การพัฒนาและปรับปรุง เพื่อการประยุกต์ใช้โปรตีนสารพิษนั้นๆ ในการบำบัดรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและประสิทธิผลที่ยั่งยืนในอนาคต

โปรตีนพิษ CyaA จัดอยู่ในกลุ่มของ Repeat in Toxin (RTX) family เนื่องจากมีลักษณะของการเรียงลำดับกรดอะมิโนซ้ำกัน 9 ตัว คือ Gly-Gly-X-Gly-X-Asp-Aps-X-Leu (Glycine-Aspartate rich nonapeptide repeat region) ทางด้าน C-terminal และเป็นส่วนที่จับกับแคลเซียม ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้อยู่ในรูปของโปรตีนที่ทำงานได้ รวมทั้งเป็นส่วนที่มีความเกี่ยวข้องกับการจับระหว่างโปรตีน CyaA กับตัวรับ CD11b/CD18 integrin receptor บนอิมมูนเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (6) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Pichaya Pojanapotha et al., 2011 ได้ผลิตโปรตีนพิษเฉพาะส่วน RTX subdomain ของ CyaA (CyaA₇₅₁₋₁₇₀₆) ที่มีขนาด ~100 kDa โดยทำนายลักษณะโครงสร้างของส่วน Repeat region ที่มีกรดอะมิโนซ้ำกัน 9 ตัว คือ Gly-Gly-X-Gly-X-Asp-X-U-X เป็น Beta-roll structures จำนวน 5 block; block I: Gly¹⁰¹⁵ - Lys¹⁰⁸⁸, block II: Gly¹¹³⁸ - Asp¹²¹¹, block III: Gly¹²⁴ - Asp¹³⁵³, block IV: Gly¹³⁷⁷ - Asp¹⁴⁸⁵ และ block V: Gly¹⁵²⁹ - Leu¹⁵⁹¹ ที่มีความเกี่ยวข้องในการจับกับแคลเซียม (Calcium-induce Conformation) และเป็นส่วนที่ใช้จับระหว่างโปรตีนพิษกับเซลล์เป้าหมาย (7) และจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Bleuner M. et al., 2010 พบว่า เมื่อมี calcium เป็นตัวเหนี่ยวนำ RTX ทางด้าน C-terminus จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเรียงตัว (Folding) แบบ Beta-roll structures (6) และงานวิจัยของ Bauche C. et al., 2006 ซึ่งชี้ให้เห็นว่า CyaA₁₄₉₀₋₁₆₈₁ fragment ที่มีส่วนของ RTX Block V สามารถตอบสนองต่อแคลเซียมในการเรียงตัวได้ ในขณะที่ Truncate CyaA₁₋₁₄₄₉ ที่ขาดทั้ง Block V และ C-terminal signal ไม่สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง hemolysis และ cytotoxicity ได้ (7) นอกจากนี้ งานวิจัยก่อนหน้านี้ ยังพบว่า โปรตีนพิษ Leukotoxin จากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella hemolytica* อีกหนึ่งในสมาชิกของ RTX family มีบริเวณของโปรตีนส่วนที่อยู่ระหว่าง repeat domain และ C terminus ลำดับเบสที่ 841-872 เกี่ยวข้องในการจับกับ β_2 -integrin receptor ในเซลล์เป้าหมาย (10) และโปรตีนพิษ HlyA toxin ที่ลำดับเบส 914-936 เกี่ยวข้องในการจับกับ Glycophorin receptor บนผิวเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่นเดียวกัน (11) ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวตรงกับ conserved region ที่ลำดับเบส 1621-1627 ของ CyaA หลังตำแหน่ง block V ในส่วนของ C-terminal secretion signal

การทดลองนี้จึงตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ว่า เฉพาะส่วนของ C-terminal secretion signal ของโปรตีนพิษ CyaA มีความสำคัญต่อการจับกับ Receptor บนผิวเซลล์เป้าหมาย ซึ่งได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว (Human white blood cells; hWBCs) และเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ (Sheep red blood cells: sRBCs) ซึ่งความรู้ความเข้าใจเชิงโครงสร้างเกี่ยวกับความจำเพาะเจาะจง (Structural Basis of Target Specificity) ของโปรตีนสารพิษที่ได้นี้ จะนำไปสู่การพัฒนาและปรับปรุงในอนาคตเพื่อการประยุกต์ใช้โปรตีนสารพิษในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวเวชภัณฑ์ และการบำบัดรักษาโรคที่ก่อพยาธิสภาพในมนุษย์

1.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 เชื้อ *Bordetella pertussis*

เชื้อ *Bordetella* หรือ *Bodetellae* จัดอยู่ในวงศ์ Alcaligenaceae เป็นเชื้อแกรมลบรูปแท่ง สันคล้ายรูปกลม (cocci bacilli) (13) ติดสีจางเมื่อย้อมสีแกรมและอาจมีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) ลักษณะที่เห็นจากการย้อมสีแกรมจึงคล้ายเชื้อ *Haemophilus* เชื้อเจริญได้เฉพาะในบรรยากาศที่มีก๊าซ ออกซิเจนเท่านั้น (14) *B. pertussis* จัดเป็นเชื้อเจริญยากและต้องใช้อาหารเพาะเชื้อพิเศษ อาหาร สำหรับเพาะเชื้อ *B. pertussis* จำเป็นต้องมีสารจำเพาะเช่น charcoal เลือด แป้ง หรือ albumin เพื่อช่วย ในการดูดซับสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ และปัจจัยบางอย่างในการเจริญ เช่น nicotinamide (13, 14)

เชื้อ *B. pertussis* มีอัตราการเจริญช้า ใช้เวลานาน 3-6 วัน จึงสามารถเห็นโคโลนีบน อาหารเพาะเชื้อได้ พบอาศัยในคนเท่านั้น และไม่มีสัตว์อื่นเป็นพาหะ เชื้อตายง่ายเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อม และไม่ทนต่อความเย็นและความแห้ง (13, 14)

1.2.2 กลไกและลักษณะอาการ

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *B. pertussis* แบ่งออกได้ เป็น 2 กลุ่ม คือ Adhesins และ Toxins (15) ดังภาพที่ 1-1 ในกลุ่มของ Adhesins นั้นเป็นผลผลิตของเชื้อแบคทีเรียที่ช่วยให้เชื้อสามารถ ยึดจับกับ Respiratory epithelium ของผู้ติดเชื้อได้ ตัวอย่างเช่น Filamentous Hemagglutinin (FHA), Fimbriae, Agglutinogens และ Pertactin เป็นต้น ส่วนในกลุ่มของ Toxins จะมีทั้งชนิด Exotoxins และ Endotoxins ที่ช่วยทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายบกพร่อง และง่ายต่อการติดเชื้อ ตัวอย่างเช่น Pertussis toxin (PTX), Adenylate cyclase -hemolysin toxin (CyaA), Dermonecrotic toxin (DNT), และ Tracheal cytotoxin (TCT) เป็นต้น (13-15)

1) Pertussis toxin

เป็นปัจจัยก่อโรคหลักของเชื้อ โดยมีคุณสมบัติเป็นสารพิษชนิด A-B toxin โดยโครงสร้าง ประกอบด้วยหน่วยย่อยเอ 1 หน่วย และหน่วยย่อยบี 5 หน่วย (16) หน่วยย่อยบีทำหน้าที่จับ receptor ของ host ทั้งเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจและเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นส่งหน่วยเอเข้าสู่เซลล์ ทำให้ cAMP ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น เป็นผลให้เซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจมีการหลั่งสารน้ำและเมือกออกสู่ ทางเดินหายใจจำนวนมาก กระตุ้นให้ผู้ป่วยเกิดการระคายเคืองและไออย่างรุนแรง (15, 16)

2) Filamentous hemagglutinin (FHA)

ทำหน้าที่สำคัญในการเกาะติด host โดยสามารถจับกับ glycolipid บนผนังเซลล์เยื่อบุ ทางเดินหายใจหรือ glycoprotein บนผนังเซลล์ neutrophil (17) กระตุ้นให้เกิดการนำเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ เซลล์โดยขบวนการ phagocytosis (18)

3) Adenylate cyclase - hemolysin (CyaA)

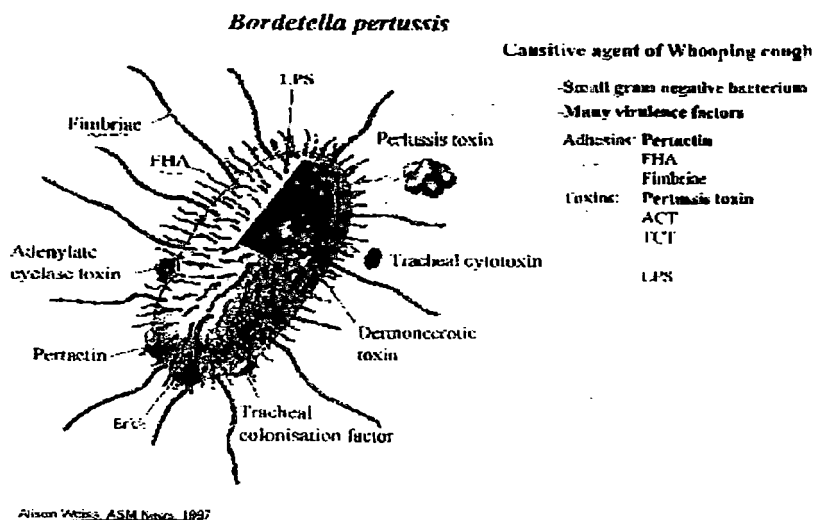
เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติ 2 ประการที่ไม่ขึ้นต่อกัน คือ ส่วน Adenyl cyclase (AC) activity เมื่อถูกนำเข้าสู่ เซลล์ host ส่วนของ AC domain ที่ถูกกระตุ้นด้วย calmodulin สามารถออกฤทธิ์เปลี่ยน Adenosine triphosphate (ATP) เป็น cAMP ทำให้มีระดับ cAMP ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น และมีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยยับยั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวในการเคลื่อนเข้าหาเชื้อและการเก็บกินเชื้อ (19) ส่วน Hemolysin domain สามารถทำให้เกิด hemolytic activity ในการสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์อื่น (20)

4) Tracheal cytotoxin

เป็นส่วนของโครงสร้าง peptidoglycan ในชั้นผนังเซลล์ของเชื้อที่มีความจำเพาะในการจับกับเซลล์เยื่อทางเดินหายใจชนิด ciliated epithelium (21) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนไหวของ cilia และสามารถทำให้ cilia หลุดออกจากเซลล์ได้ รวมถึงสามารถยับยั้งการสร้าง DNA ทำให้เซลล์ตายโดยขาดเซลล์และเนื้อเยื่อที่ตายนี้ไม่สามารถถูกกำจัดออกจากทางเดินหายใจได้ เนื่องจากการทำหน้าที่ของ cilia บกพร่อง จึงทำให้เกิดการระคายเคืองภายในระบบทางเดินหายใจและกระตุ้นให้เกิดอาการไออย่างรุนแรงได้ (15, 21)

5) Dermonecrotic toxin

เป็นสารพิษชนิดไม่ทนความร้อน มีฤทธิ์กระตุ้นการหดตัวของเส้นเลือด ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นขาดเลือด ต่อมาจึงเกิดการรั่วของสารน้ำ เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวออกจากเส้นเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อเกิดเป็นจำเลือด (15)



ภาพที่ 1-1 แสดง Virulence factors ของเชื้อ *Bordetella pertussis*

(ที่มา: Alison weiss, ASM News 1997)

1.2.3 ลักษณะทางคลินิกของโรคไอกรน ลักษณะทางคลินิกของโรคไอกรนนั้นแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ ดังนี้ (14)

ระยะที่มีอาการหวัด (Catarrhal stage)

ระยะประมาณ 1-2 สัปดาห์แรกหลังได้รับเชื้อ ผู้ป่วยมักมีอาการไม่รุนแรง อาการคล้ายโรคไข้หวัด หรือคล้ายอาการติดเชื้อไวรัสในทางเดินหายใจส่วนบน เช่น มีไข้ต่ำ อ่อนเพลีย ไอจาม มีน้ำมูก ตาแดง และเบื่ออาหาร ระยะนี้เป็นระยะที่มีการแพร่กระจายเชื้อได้สูง เนื่องจากผู้ป่วยมีเชื้ออยู่ในทางเดินหายใจจำนวนมากที่สุด และผู้ป่วยมักขาดความระมัดระวังในการป้องกันการแพร่เชื้อ (13) ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันอยู่บางส่วน เช่น เคยฉีดวัคซีนอาจมีอาการในระยะนี้สั้นลงหรืออาการไม่ชัดเจน (22)

ระยะที่ไอรุนแรง (Paroxysmal stage)

ระยะประมาณสัปดาห์ที่ 2-6 ของการดำเนินโรค อาการไอมีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากมีการทำลายเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ และไม่สามารถกำจัดเซลล์ที่ตายและสารเมือกออกได้ จึงเกิดความระคายเคืองอย่างมาก ผู้ป่วยมีอาการไอติดต่อกันเป็นชุดเรียกว่า staccato cough ตามด้วยการสูดหายใจลึก ๆ ผ่านทางเดินหายใจที่บวมและตีบแคบจนมีเสียง "วี๊ด" ที่เรียกว่า whooping cough เนื่องจากอาการไอเกิดขึ้นอย่างงีบพลันและมีความรุนแรงมากจนผู้ป่วยไม่สามารถหายใจได้ อาการไอมักมีความรุนแรงและชัดเจนในผู้ใหญ่มากกว่าในเด็กเล็ก (23)

นอกจากนี้ยังพบอาการแทรกซ้อนจากการไออย่างรุนแรงได้ เช่น ภาวะขาดออกซิเจน (anoxia) อาการเขียว (cyanosis) เลือดออกที่เยื่อหุ้มตา (subconjunctival hemorrhage) เป็นต้น (13)

ระยะพักฟื้น (Convalescent stage)

ประมาณสัปดาห์ที่ 4-6 ของโรคและอาจดำเนินต่อไปเป็นเวลาหลายสัปดาห์ อาการไอจะค่อย ๆ ลดลงและความรุนแรงเริ่มน้อยลง แต่ผู้ป่วยอาจเกิดโรคแทรกซ้อน เนื่องจากความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ และอาจติดเชื้ออื่น ๆ ซ้ำได้ (13)

1.2.4 การตรวจวินิจฉัย

1) การตรวจโดยตรง

การย้อมสีแกรมมักได้ผลไม่ดีในการตรวจหาเชื้อในสิ่งส่งตรวจ เนื่องจากเชื้อมักมีขนาดเล็ก ติดสีจาง และมักมีจำนวนน้อย การตรวจหาเชื้อโดยตรงสามารถทำได้ด้วยเทคนิค direct fluorescent antibody (DFA) โดยการย้อมด้วย antibody ที่เคลือบสารสะท้อนแสงซึ่งให้ผลได้รวดเร็ว แต่มีความไวต่ำและอาจทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้ออื่น ๆ จึงทำให้เกิดผลบวกปลอมได้สูง (24) เทคนิค DFA ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยให้ antibody จำเพาะต่อสาร lipopolysaccharide ของเชื้อ *B. pertussis* ทำให้มีความจำเพาะสูงขึ้น (25)

2) การเพาะเชื้อ

ถือเป็นวิธีการมาตรฐานในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *B. pertussis* ทางห้องปฏิบัติการ เชื้อ *B. pertussis* อยู่ในกลุ่มเชื้อเจริญยาก เนื่องจากถูกยับยั้งการเจริญได้ง่ายโดยสารที่พบในอาหารเพาะเชื้อทั่วไปซึ่งอาจเป็นพิษต่อเซลล์เช่น peptone และ กรดไขมัน อาหารเพาะเชื้อ *B. pertussis* มักต้องมีส่วนประกอบของ charcoal เลือดเข้มข้นอย่างน้อย 15-20% และแป้ง (มันฝรั่ง) เพื่อช่วยในการดูดซับสารพิษต่างๆ (26) เชื้อ *B. pertussis* มีอัตราการเจริญช้า เจริญเฉพาะในบรรยากาศที่มีความชื้น มีก๊าซออกซิเจน และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เข้มข้น 5-7% อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส โดยโคโลนีของเชื้อ *B. pertussis* มีขนาดเล็ก นูน และเป็นมันวาว (13)

3) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

เชื้อ *Bordetella* ไม่สามารถสลายสารคาร์โบไฮเดรตได้โดยขบวนการ fermentation (24) ให้ผลบวกในการทดสอบ catalase และ oxidase ยกเว้น *B. parapertussis* และ *B. brochiseptica* ที่ให้ผลลบในการทดสอบ oxidase (14)

4) การทดสอบทางซีโรโลยี

การตรวจหาระดับ antibody ที่จำเพาะต่อ Pertussis toxin หรือ antigen ที่เตรียมขึ้นจากส่วนประกอบของเซลล์มีประโยชน์ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. pertussis* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น agglutination enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ complement fixation โดยระดับ antibody จะเริ่มสูงขึ้นประมาณสัปดาห์ที่ 3-4 หลังจากเริ่มมีอาการ (25-27)

5) การทดสอบระดับโมเลกุล

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเช่น PCR และ DNA probe เพื่อช่วยในการตรวจหาเชื้อ และจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ จากทั้งการตรวจสิ่งส่งตรวจโดยตรงและพิสูจน์เชื้อที่ได้จากการเพาะเชื้อ รวมถึงใช้ตรวจหาพื้นที่ควบคุมการสร้างปัจจัยก่อโรคและการสืบสวนทางระบาดวิทยา (13)

6) การแพร่ระบาดและการป้องกัน

โรคไอกรนเป็นโรคติดต่อสำคัญที่ยังมีอัตราการติดเชื้อและอัตราการตายทั่วโลก เชื้อ *B. pertussis* ไม่พบเชื้อในสิ่งแวดล้อมและไม่พบการก่อโรคในสัตว์ (4) ดังนั้นการแพร่กระจายของเชื้อจะเกิดระหว่างคนเท่านั้น แหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญได้แก่ ผู้ป่วย ในอดีตการติดเชื้อพบได้มากที่สุดของเด็กเล็กอายุระหว่าง 1-5 ปี เนื่องจากทารกแรกคลอดมักได้รับภูมิคุ้มกันมาจากมารดา หลังจากเริ่มมีการฉีดวัคซีนให้แก่เด็กเล็กในช่วงประมาณปี ค.ศ.1950 อัตราการเกิดโรคไอกรนในเด็กลดลงมาก (1, 2)

วัคซีนป้องกันโรคไอกรนเตรียมมาจากเชื้อตายทั้งเซลล์ (killed whole-cell vaccine) โดยให้พร้อมกับวัคซีนป้องกันโรคคอตีบและบาดทะยักที่เรียกว่าวัคซีน diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) (28) โดยเริ่มฉีดในเด็กอายุประมาณ 2 เดือน จากนั้นฉีดกระตุ้นอีก 2 ครั้ง เมื่ออายุ 1 ปีและ 4-6 ปี วัคซีนมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไอกรนได้ดี แต่พบว่าอาจมีผลข้างเคียงที่รุนแรงคือการเกิดภูมิแพ้ของสมองหรือระบบประสาทส่วนกลางอย่างถาวร (12) ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการนำเฉพาะส่วนประกอบของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น antigen และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคได้แก่ Pertussis toxin, Filamentous, Hemagglutinin, Fimbriae และ Pertactin มาใช้ผลิตวัคซีนชนิดไม่มีเซลล์ (Acellular vaccine) ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพและมีอัตราการเกิดผลข้างเคียงลดลง (2)

ตารางที่ 1 จำนวนผู้ป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคติดต่อที่สำคัญ จากการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา โดยเปรียบเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันของปีก่อน ๆ ประเทศไทย ปี พ.ศ. 2555 สัปดาห์ที่ 34

Table 1 Reported Cases of Priority Diseases under Surveillance by Compared to Previous Year, Thailand, 2012, 34th Week

Disease	2012				Case* (Current 4 week)	Mean** (2007-2011)	Cumulative 2012	
	Week 31	Week 32	Week 33	Week 34			Cases	Deaths
	Cases	Cases	Cases	Cases				
Cholera	0	0	0	0	0	49	28	0
Influenza	1393	1164	971	307	3835	9954	25130	30
Meningococcal Meningitis	0	1	0	0	1	2	7	2
Measles	90	120	50	17	277	314	3795	0
Diphtheria	0	0	0	0	0	2	22	3
Pertussis	0	0	1	0	1	1	10	0
Pneumonia (Admitted)	3660	3865	3058	1132	11715	13991	112827	789
Leptospirosis	98	91	47	11	247	510	2134	32
Hand foot and mouth disease	2016	1367	850	274	4507	698	29101	2
D.H.F.	1957	1788	1150	242	5137	9817	36587	37

ที่มา: สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด และสำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร และ สำนักระบาดวิทยา: รวบรวมข้อมูลในภาพรวมระดับประเทศ ข้อมูลในตารางจะถูกปรับปรุงทุกสัปดาห์ วัตถุประสงค์เพื่อการป้องกันควบคุมโรค/ภัย เป็นหลัก มิใช่เป็นรายงานสถิติของโรคนั้น ๆ ส่วนใหญ่เป็นการรายงาน "ผู้ป่วยที่สงสัย (suspect)" ไม่ใช่ "ผู้ป่วยที่ยืนยันว่าเป็นโรคนั้น ๆ (confirm)" ข้อมูลมีการเปลี่ยนแปลงย้อนหลังได้ทุกสัปดาห์ จึงไม่ควรนำข้อมูลสัปดาห์ปัจจุบันไปอ้างอิงในเอกสารวิชาการ

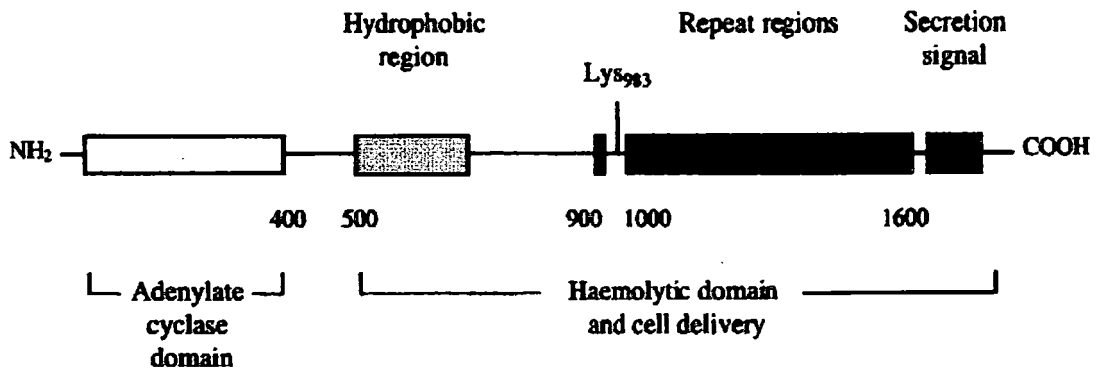
* จำนวนผู้ป่วย 4 สัปดาห์ล่าสุด (4 สัปดาห์ คิดเป็น 1 ช่วง)

ภาพที่ 1-2 แสดงอัตราการเกิดโรคไอกรนในปี 2555
(ที่มา <http://boe-wesr.net/> สืบค้น 11 มกราคม 2556)

2.7 โปรตีนพิษ Adenylate cyclase - hemolysin และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โปรตีนพิษ CyaA เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ (~170 kDa) ประกอบด้วย Domain สองส่วนในตัวเดียวกัน คือ ส่วนของ Adenylate cyclase domain ที่อยู่ทางด้าน N-terminal ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ Adenylate cyclase (AC) activity โดยเคลื่อนย้าย (translocate) ส่วนของ AC domain ให้เข้าสู่ภายในเซลล์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Calmodulin ภายในเซลล์แล้ว AC domain จะเปลี่ยน ATP เป็น cAMP จำนวนมาก ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเซลล์และก่อให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในที่สุด (29) และ ส่วนของ Hemolysin (Hly) domain หรือ Pore-forming (PF) domain ที่ทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงแคะ หรือทำให้เกิดรูรั่วบนผนังหุ้มเซลล์ ซึ่งอยู่ทางด้าน C-terminal ของโปรตีนพิษ ส่วนของ PF domain ของโปรตีนพิษนี้ ยังประกอบด้วยส่วนย่อยอีก 4 ส่วน คือ ส่วนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วจำนวนมาก (Hydrophobic region) ส่วนที่มีการเติมหมู่กรดไขมัน (Acylation region) ส่วนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 ตัว Gly-Gly-X-Gly-X-Asp-Asp-X-Leu เรียงตัวซ้ำๆกันจำนวนมาก (Glycine - Aspartate rich nonapeptide repeats) ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับ calcium (30) และส่วนปลายสุดเป็นบริเวณขนส่งโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ (Secretion signal) (20) แสดงดังภาพที่ 2-3

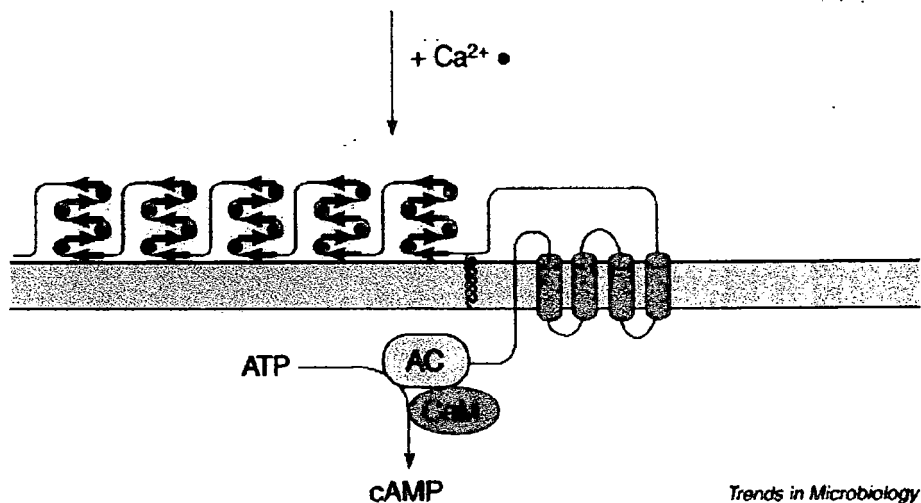
โปรตีนพิษ CyaA แรกเริ่มจะถูกสร้างในรูปของ Protoxin ที่ยังไม่สามารถทำงานได้ เมื่อเอนไซม์ CyaC-acyltransferase เติมกรด Palmitic acid เข้าไปที่ตำแหน่ง Lys-983 จะกระตุ้นความเป็นพิษของโปรตีนให้ออกฤทธิ์ได้ (31, 32) นอกจากนี้ยังพบว่า Calcium เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยในการจัดเรียงโครงสร้างของโปรตีนที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนชนิดนี้ (7, 30) มีการรายงานพบว่าโปรตีนพิษ CyaA ชนิดนี้จะมีการจับกับตัวรับ Glycoprotein $\alpha_M\beta_2$ integrin (เป็นที่รู้จักในนามของ CD11b/CD18 หรือ CR3) บนผิวเซลล์เป้าหมายประเภท Phagocytic cells เช่น Neutrophils และ Macrophages ตรง ส่วนของ RTX subdomain ของโปรตีนพิษ CyaA ที่ใช้จับกับ Receptor นั้นเอง (33) ทั้งกระบวนการจับกับ Calcium และกระบวนการเติมหมู่ Palmitoyl group ของโปรตีนพิษ CyaA นี้ มีความเกี่ยวข้องสำคัญต่อความสามารถในการจับระหว่างโปรตีนกับตัวรับบนผิวเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD11b/CD18 receptor ในกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เหนียวน่าให้เกิดกระบวนการ intoxication หรือความเป็นพิษภายในเซลล์ และสามารถจับเซลล์บางชนิดที่ไม่มี CD11b/CD18 receptor บนผิวเซลล์ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดงแคะ หรือ Liposome ซึ่งสามารถก่อให้เกิดรูรั่วบนผิวเซลล์ หรือทำให้เซลล์แตกได้ (34, 35) โดยที่การเติมหมู่ Palmitoyl จะไปเพิ่มแรงยึดจับผิวเซลล์ให้แน่นขึ้นและเป็นตัวเหนียวน่าให้เกิดกระบวนการ Protein-protein interactions และ Oligomerization สำหรับการออกฤทธิ์ของโปรตีนพิษนั้นๆ (36) ซึ่งความสามารถในการออกฤทธิ์ของโปรตีนพิษต่อเซลล์เป้าหมายเหล่านี้เป็นการแสดงให้เห็นว่า โปรตีนพิษ CyaA มีกลไกในการแทรกตัว และการจับบนผิวเซลล์ของกลุ่มเซลล์เป้าหมายที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันอีกด้วย (35)



ภาพที่ 1-3 แสดงโครงสร้างของโปรตีนพิษ Adenylate cyclase – hemolysin

(Smith AM et al., 2001)

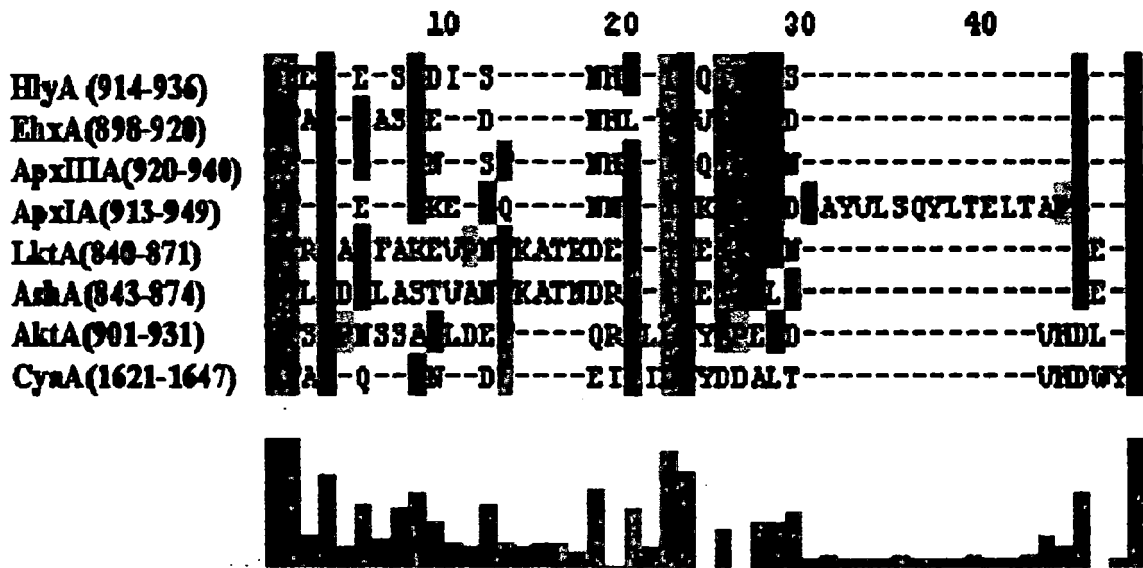
จากผลงานวิจัยก่อนหน้าของ Pojanapotha P. et al., 2011 ได้ผลิตโปรตีนพิษเฉพาะส่วน RTX subdomain ของ CyaA ที่มีขนาด ~100-kDa โดยทำนายลักษณะโครงสร้างของส่วน RTX region เป็น Beta-roll structures ที่มีความเกี่ยวข้องในการจับกับแคลเซียม (Calcium-induce Conformation) แบบ 5 repetitive blocks; block I: Gly¹⁰¹⁵ - Lys¹⁰⁸⁸, block II: Gly¹¹³⁸ - Asp¹²¹¹, block III: Gly¹²⁴ - Asp¹³⁵³, block IV: Gly¹³⁷⁷ - Asp¹⁴⁸⁵ และ block V: Gly¹⁵²⁹ - Leu¹⁵⁹¹ (7) และเป็นส่วนที่ใช้จับระหว่างโปรตีนพิษกับเซลล์เป้าหมาย เพื่อทำให้เกิดกระบวนการเป็นพิษต่อเซลล์ที่ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย แสดงดังภาพที่ 1-4



ภาพที่ 1-4 แสดงสมมติฐานกลไกในการจับกับแคลเซียมที่ตำแหน่ง RTX ของโปรตีนพิษ CyaA

(Ladant and Ullmann, 1999)

จากผลงานวิจัยของ Aitziber L. et al., 2003 (11) ได้ทำ Sequence alignment ของโปรตีนพิษชนิดต่างๆในกลุ่มของ RTX toxin บริเวณของโปรตีนส่วนที่อยู่ระหว่าง repeat domain และ C-terminus ภาพที่ 1-5 พบว่า ลำดับเบสที่ 814-872 ของ Leukotoxin (10) มีความคล้ายคลึงกับช่วงลำดับเบสที่ 914-936 ของ HlyA ซึ่งบ่งบอกให้เห็นถึงความสำคัญของช่วงลำดับเบสดังกล่าว และเป็นเหตุผลในการสร้างโคลนโปรตีนพิษ HlyA mutant ที่ตัดลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 914-936 ออก เพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำงานระหว่าง HlyA wild-type กับ mutant



ภาพที่ 1-5 แสดง Sequencing alignment ของ conserved region ระหว่าง Repeat domain และ C-end ของ RTX toxin.

HlyA, hemolysin from *E. coli*; *EhxA*, enterohemorrhagic hemolysin from *E. coli*; *ApxIIIa*, cytolyisin from *A. pleuropneumoniae*; *ApxIA*, hemolysin from *A. pleuropneumoniae*; *LktA*, leukotoxin A from *P. hemolytica*; *AshA*, leukotoxin from *Actinobacillus suis*; *AktA*, Leukotoxin from *A. actinomycetemcomitans*; *CyaA*, adenylate cyclase from *B. pertussis*.

สีที่ใช้ในภาพ: สีน้ำเงิน แสดง hydrophobic residues; สีน้ำเงิน แสดง basic residues; สีชมพู แสดง acid residues; สีส้ม แสดง Gly; สีเหลือง แสดง Pro; สีเขียว แสดง polar non-charged residues.

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Hemolytic activity) พบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนพิษ HlyA mutant ต้องใช้ปริมาณที่มากกว่า wild-type ประมาณ 10^5 เท่า จึงสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ถึง 50% ของทั้งหมด คือ ใช้ HlyA wild-type ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4.0×10^{-3} nM, Mutant เท่ากับ 1×10^2 nM สำหรับเม็ดเลือดแดงม้า และใช้ HlyA wild-type ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3.0×10^{-2} nM, Mutant เท่ากับ 4.2×10^2 nM สำหรับเม็ดเลือดแดงคน ผลการทดสอบความสามารถในการจับกับตัวรับบนกลุ่มเซลล์เป้าหมายชนิดต่างๆ พบว่า HlyA mutant ไม่สามารถจับกับตัวรับบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งของคนและม้า และไม่สามารถจับกับ Glycophorin ใน Affinity column เมื่อเปรียบเทียบกับ wild-type ที่ยังคงสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและจับกับ Glycophorin ได้ปกติ

เมื่อทำการสร้างเปปไทด์ในช่วง Trp⁹¹⁴-Arg⁹³⁶ และทดสอบความสามารถในการจับของ Peptide ต่อ Glycophorin receptor พบว่า WR peptide สามารถจับกับ Unilamellar vesicles ที่มี Glycophorin เป็นส่วนประกอบ ได้เท่านั้น และเมื่อศึกษาความสามารถในการป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงโดยใช้เปปไทด์ชิ้นนี้ พบว่า เมื่อใส่ WR peptide ลงไปจับกับเม็ดเลือดแดงก่อนที่จะใส่ HlyA toxin สามารถยับยั้งหรือลดอัตราการแตกของเม็ดเลือดแดงได้

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า HlyA mutant ที่ตัดส่วนของกรดอะมิโนลำดับเบสที่ 914 – 936 ออก ส่งผลต่อความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกลดลง และไม่สามารถจับกับตัวรับบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง หรือ Glycophorin บน Affinity column ได้ เมื่อทำการสังเคราะห์ WR peptide ในช่วง Trp⁹¹⁴-Arg⁹³⁶ โดยที่ทดสอบแล้วว่า ตัวของมันเองไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้นั้น สามารถจับกับ Glycophorin ที่อยู่บน Unilamellar vesicles ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และ WR peptide นี้ยังสามารถจับกับ Glycophorin receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้ป้องกันการจับของ HlyA toxin ซึ่งส่งผลทำให้ไม่เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (11)

1.3 สมมุติฐานของการทดลอง

การทดลองนี้จึงตั้งสมมุติฐานที่ว่า เปปไทด์ทางด้าน C-terminus ในส่วน RTX subdomain โดยเฉพาะส่วนของ C-terminal secretion signal ของโปรตีนพิษ CyaA มีความสำคัญต่อการจับกับ Receptor บนผิวเซลล์เป้าหมาย ซึ่งได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว (Human white blood cells; hWBCs) และ เซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ (Sheep red blood cells: sRBCs)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ศึกษาความสามารถของ RTX ในการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวคน และเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ
2. ได้ศึกษาบทบาทและความสำคัญของเปปไทด์ทางด้าน C-terminal ในส่วน RTX Subdomain ของโปรตีนพิษ CyaA ต่อการจับกับเซลล์เป้าหมาย

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ จะใช้พลาสมิดต้นแบบ pCyaA-RTX ของ Pichaya Pojanapotha *et al.*, 2011 (7) ที่สามารถสร้างโปรตีนเฉพาะส่วน RTX subdomain ของโปรตีน CyaA (CyaA-RTX) ขนาด ~100 kDa ได้จำนวนมากและอยู่ในรูปละลายน้ำ (soluble form) ที่ทำงานได้ ทำการวิเคราะห์หาคำแทนที่เกี่ยวข้องกับการจับกับเซลล์เป้าหมาย ซึ่งได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวคน และเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ โดยการตัดเอาส่วนทางด้าน C-terminus (aa 1602-1706) ออกจากโคลนยีนต้นแบบ pCyaA-RTX (pCyaA-RTX Δ 1602-1706) เหนียวทำให้เกิดการแสดงออกของยีน และทดสอบคุณลักษณะในการจับกับกลุ่มเซลล์เป้าหมาย (Toxin Binding) เปรียบเทียบกับโคลนต้นแบบ

บทที่ 2

วัตถุประสงค์

จากผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Pichaya Pojanapotha *et al.*, 2011 (7) ได้ผลิตโปรตีนพิษเฉพาะส่วน RTX subdomain ของ CyaA ที่มีขนาด ~100-kDa โดยทำนายลักษณะโครงสร้างของส่วน RTX region เป็น Beta-roll structures ที่มีความเกี่ยวข้องในการจับกับแคลเซียม (Calcium-induce Conformation) และเป็นส่วนที่ใช้จับระหว่างโปรตีนพิษกับเซลล์เป้าหมาย เพื่อทำให้เกิดกระบวนการเป็นพิษต่อเซลล์ที่ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. เพื่อศึกษาคุณลักษณะของ RTX ในการจับกับโปรตีนตอรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย ซึ่งได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวคน และเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ
2. เพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนพิษ CyaA ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการจับกับตัวรับของผิวเซลล์เป้าหมาย คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวคน และเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ
3. เพื่อศึกษาหาแนวการในผลิตวัคซีน หรือเพื่อใช้ในการบำบัดรักษาโรคที่เกิดจากโปรตีนสารพิษ CyaA

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

การดำเนินงานวิจัย ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. การสร้างโคลน pCyaA-RTX Δ 1602-1706 ที่ขาดชิ้นส่วนทาง C-terminal region
 - 1.1 สกัดและวิเคราะห์พลาสมิด pCyaA-RTX และ pET-17b vector จาก *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ได้รับมาจาก ดร.พิชญา พจนโพธา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราช และสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล ตามลำดับ
 - 1.2 สังเคราะห์ยีน cyaA-RTX subdomain ที่ขาดชิ้นส่วนทาง C-terminus ด้วยวิธี PCR
 - 1.3 ตัดต่อยีนที่ได้อลงใน pET-17b vector ตามกระบวนการ DNA cloning
 - 1.4 ตรวจสอบความถูกต้องของ Recombinant clone ที่ได้ โดยวิธี Restriction enzyme analysis และ DNA sequencing
2. การผลิตโปรตีนพิษ CyaA-RTX ที่ขาดชิ้นส่วนทาง C-terminal region
 - 2.1 Re-transform เข้า *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS
 - 2.2 เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ด้วย IPTG
 - 2.3 ตรวจสอบคุณลักษณะของโปรตีนที่ได้ โดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis
3. ทดสอบความสามารถของโปรตีน CyaA-RTX fragment ต่อความสามารถในการจับกับเซลล์เป้าหมาย ได้แก่ hWBCs และ sRBCs เปรียบเทียบผลที่ได้กับโปรตีนต้นแบบ

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องถ่ายรูป
2. ขวดดูแลน (Duran) ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
4. เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติ (Automatic pipette) ขนาด 0.2-2, 1-10, 2-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร
5. เครื่องชั่งสาร
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge refrigerated) (Benchtop Refrigerated Centrifuge, PCL holding)
7. เครื่องปรับอุณหภูมิ (Heat box)

8. เครื่องวัด pH (pH meter)
9. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (T90+ Spectrophotometer)
10. เครื่องคนสาร (Hotplate and stirrer)
11. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator)
12. เครื่อง Water bath
13. ชุด SDS-PAGE (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories)
14. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Powerpac Basic Power Supply, Bio-Rad Laboratories)
15. เครื่อง Blotting cassette (Trans-Blot Cell, Bio-Rad Laboratories)
16. ชุดวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (Gel electrophoresis unit)
17. โซนิเคเตอร์ (Sonicator) (UP50H ultrasonic process, hielscher)
18. ตู้บ่มเขย่าเชื้อ (Shaking incubator) (New Brunswick scientific, USA)
19. ทิป (Tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
20. ไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (Nitrocellulose membrane)
21. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
22. หลอดเซนทริฟิวจ์ (Centrifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมี

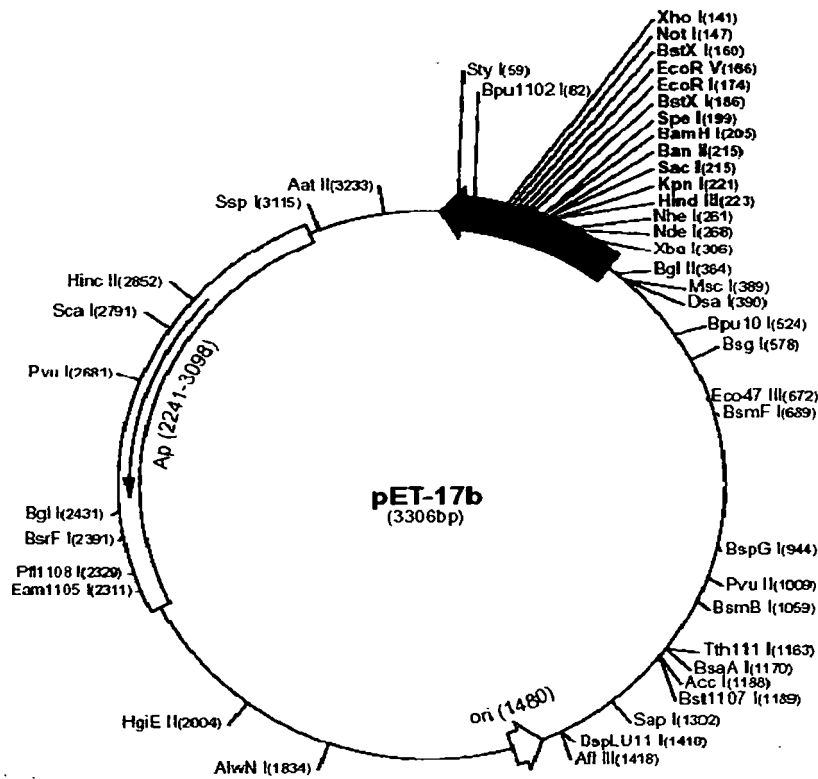
1. เม็ดเลือดแดงแก่ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ
2. เลือดคนจะได้รับการบริจาคจากนิติวิทยาศาสตร์การแพทย์ รุ่นที่ 10 มหาวิทยาลัยบูรพา
3. เอนไซม์ DNA polymerase, T4 DNA Ligase และเอนไซม์ตัดจำเพาะ Restriction enzyme (*BamHI* และ *HindIII*) ซื้อจากบริษัท New England Biolabs/Promega
4. Anti-RTX monoclonal antibody-9D4 ถูกสร้างมาจาก Listlabs
5. Acetic acid
6. 30% Acrylamide/Bis solution 29:1 (Bio-Rad Laboratories)
7. Ampicillin
8. Ammonium persulfate (APS)
9. Agarose gel (vivantis)
10. Coomassie blue R-250
11. Calcium chloride
12. Di-sodium hydrogen orthophosphosphate-1,2-hydrate

13. Ethyl alcohol (Absolute, 95%, 70%)
14. Glycerol
15. Glycine
16. 2-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-propanediol
17. Isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG)
18. Loading dye ที่มี SYBR Gold ผสมอยู่ (10X)
19. Kit สำหรับสกัด DNA จาก agarose gel (GF-1 Gel DNA Recovery KIT , Vivantis)
20. Kit สำหรับสกัดพลาสมิด (GF-1 plasmid extraction kit, Vivantis)
21. 10x Ligation buffer
22. LB media
23. Magnesium chloride
24. Oligonucleotide primers จะถูกสร้างมาจาก Sigma PROLIGO, ประเทศสิงคโปร์
25. Marker (100 bp marker, *Lamda-HindIII* marker, *Prestained Protein marker*)
26. Methyl Alcohol
27. Skimmed milk
28. Sodium chloride
29. Sodium hydroxide
30. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
31. Tris-HCl
32. Tetramethylethylenediamine (TEMED)
33. Triton-X
34. Tween-20
35. Yeast extract

3.3 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 pET17b vector

pET17b vector คือ พลาสมิดพาหะที่ใส่ตัดต่อยีน truncated *cyaA-RTX* และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ซึ่งประกอบด้วย T7 promoter, Origin of replication, Multicloning sites และ Ampicillin resistance (Ap^r) gene (42)



ภาพที่ 3-1 แสดงลักษณะของ pET17b vector และตำแหน่งของ restriction enzyme (Seed, 1987) (Novagen)

3.3.2 pCyaA-RTX plasmid

pCyaA-RTX plasmid คือ พลาสมิดที่สามารถผลิตโปรตีนพิษเฉพาะส่วน RTX region ของ CyaA toxin ที่มีขนาดเล็ก ~100-kDa โดยการตัดเอาส่วน hydrophobic region (aa 500-700) ออกจากโคลนยืนต้นแบบ pCyaA-PF โดย pCyaA-RTX plasmid ได้รับมาจาก ดร.พิชญา พจนโพธา คณะแพทยศาสตร์ศิริราช เพื่อใช้ในการปรับเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนหรือตัดชิ้นส่วนของเปปไทด์ที่คาดว่า จะมีความเกี่ยวข้องในการจับกับตัวรับของเซลล์เป้าหมาย

3.4 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้

E. coli สายพันธุ์ JM109 [*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*(r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-pro AB*), (*F' traD36 proAB lacI' Δ*(*lacZ*)M15)] ใช้สำหรับกระบวนการสร้างโคลนยืนของ DNA (DNA manipulation)

ในขณะที่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS [*F'*, *ompT*, *hsdS_B*(r_B^- , m_B^-), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pLysS, *Cm^r*] ใช้สำหรับการแสดงออกของ recombinant plasmids

3.5 Oligonucleotide primers ที่ใช้

Primers ที่ออกแบบ ถูกสังเคราะห์โดย Thermo Fisher Scientific Inc. (Fermentas) ซึ่งถูกออกแบบให้เริ่มที่ M⁴⁸² (start codon) และสิ้นสุดที่กรดอะมิโน I¹⁶⁰² หลังจากนั้นเปลี่ยนให้เป็น stop codon (เปลี่ยนลำดับเบส 1 ตำแหน่ง) รวมทั้งกลายพันธุ์เบส 2 ตำแหน่ง เพื่อให้เกิดตำแหน่งของ restriction enzyme *Bam*HI ในการตัดต่อยีน ลำดับเบสของ Primers แสดงดัง ตารางที่ 3-1 โดยกำหนดให้ ตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้เป็น Restriction enzyme ตำแหน่ง start และ stop codon แสดงให้เห็นในตัวอักษรสีแดง และตำแหน่งลำดับเบสที่กลายพันธุ์แสดงให้เห็นเป็นตัวหนา มี stock ความเข้มข้น 100 μ M

ตารางที่ 3-1 แสดงลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทำ PCR

Primer	Sequence	Restriction site
	M ⁴⁸² A N S D	
CyaA_RTX- f	5'- GAT ATA <u>CAT ATG</u> GCC AAT TCG GAC -3'	<i>Nde</i> I
	stop	
CyaA_I ¹⁶⁰² -r	5'- CC GCC <u>CGG ATC CTA</u> GAT CGT -3'	<i>Bam</i> HI

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การสกัดพลาสมิดและวิเคราะห์โดย Agarose Gel electrophoresis

นำ Single colony ของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดจาก Agar plate มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium 3 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ตลอดคืนประมาณ 12-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายใส่ลงใน microcentrifuge tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5,000Xg นาน 5 นาที เก็บ pellet ทิ้ง supernatant เมื่อปั่นเก็บ pellet จนหมดแล้วเติม Solution1 ปริมาตร 250 µl ลงไปในหลอดที่มี pellet และนำไป vortex หรือ pipetting เติม Solution2 ปริมาตร 250 µl และ inverting 4-6 ครั้ง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม buffer NB ปริมาตร 400 µl และ inverting 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000Xg นาน 10 นาที ถ่าย 700 µl ของ supernatant ลงใน column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000Xg นาน 1 นาที ทิ้งของเหลวและนำไปปั่นซ้ำจน supernatant หมด เติม wash buffer 700 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000Xg นาน 1 นาที และทิ้งของเหลว ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000Xg นาน 1 นาที ถอดเอา collection tube ทิ้งไป และเปลี่ยนเอา microcentrifuge tube มาใส่แทน เติมน้ำกลั่น 30 µl ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000Xg นาน 1 นาที

เตรียมแผ่นเจล 0.8% โดยใช้ผงวุ้น Agraose ผสมใน 1XTBE buffer ให้ได้ปริมาตร 50 ml (Agraose 0.4 g : 1XTBE buffer 50 ml) และทำให้เจลละลายโดยใช้ Microwave รอให้อุ่นและเทลงบนจานที่มีหวี (comb) วางอยู่ รอให้เจลแข็งแล้วดึง comb ออก นำเจลที่แข็งแล้ววางลงในเครื่อง gel 23 electrophoresis หยด loading dye ที่มี SYBR Gold ผสมอยู่ลงบนแผ่นพาราฟิล์ม ดูดสารละลายที่มีพลาสมิด 2 µl ลงผสม loading dye บนพาราฟิล์มที่เตรียมไว้ หยดลงในหลุมด้านบน agraose gel ปรับความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าให้เป็น 110 volt นาน 60-70 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปเปรียบเทียบกับ band ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker) แล้วถ่ายรูป

3.6.2 การสร้างโปรตีนกลายพันธุ์โดยใช้วิธีพื้นฐานทาง PCR-based mutagenesis

ทำการสร้างยีนเฉพาะส่วน Ca^{2+} -binding repeat region (*cyaA-RTX*) โดยการตัดชิ้นส่วนของยีนทางด้าน C-terminus กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 1602-1706 ออกจากพลาสมิดต้นแบบ pCyaA-RTX โดยการออกแบบ primer และ amplify gene ตามลำดับเบสในตารางที่ 3-1 ดังกล่าว และตัดต่อยีนเข้ากับ pET-17b vector

เตรียม sample reactions ลงใน 0.2 ml microcentrifuge tube โดยใช้ RTX template 100 ng, 10 µM primer CyaA-RTX forward และ reverse อย่างละ 1 µl, 100% DMSO 1.5 µl, 10 mM dNTPs 1 µl, 1XPhusion® GC buffer และเอนไซม์ Phusion® DNA Polymerase 0.5 µl ปริมาตรรวมทั้ง 50 µl เตรียมเสร็จแล้ว ใส่ลงในเครื่อง Thermocycle เซตตั้งเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละ

cycle โดยให้อุณหภูมิ Annealing ที่ 52°C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบผล PCR products ที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis สกัดแบน PCR product บริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล และนำไปเชื่อมสายดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ (pET N/B) ที่ตัดด้วย *NdeI* และ *BamH* เช่นเดียวกัน ด้วยเอนไซม์ Ligase enzyme นำ recombinant DNA ที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านที่เตรียมให้อยู่ในรูป competent cell โดยวิธี $CaCl_2$ (Transformation)

3.6.3 ตรวจสอบ Recombinant clone โดยวิธี Restriction enzyme analysis และ DNA sequencing

เมื่อสกัด recombinant DNA จากแบคทีเรียแล้ว นำมาตรวจสอบผลการโคลนนิ่ง โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *BamHI* restriction enzymes บ่มทิ้งไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ *Lamda/HindIII* marker และ 100 bp marker

Recombinant clone ที่ผ่านการตรวจด้วยวิธี restriction enzyme analysis ว่าถูกต้องแล้ว มาตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสยีน *cyaA-RTX Δ1602-1706* โดยการส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ โดย 1st BASE DNA Sequencing service

3.6.4 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย IPTG

นำเชื้อ *E. coli* BL21(DE3)pLysS ที่มีพลาสมิดที่ต้องการ มาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ 37°C ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง (Starter) แล้วใช้เชื้อ 1 ml จาก Starter เติมลงใน 100 ml LB medium ที่มี 100 µg/ml ampicillin ใน 250 ml sterile flask (หรือ 1% จาก Starter) เขย่าเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อ 37°C นาน 2-3 ชม. หรือจนกว่า OD₆₀₀ จะถึง 0.5-0.6 แบ่งเชื้อแบบ sterile technique ออกมาให้ได้ 1 OD. Packed cell แล้ว label เป็น uninduced cell แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโดยเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 mM ลงใน flask เพาะเชื้อ นำไปเขย่าต่อ อีก 6 ชม. วัด OD₆₀₀ อีกครั้ง จดบันทึกค่า แบ่งเชื้อแบบ sterile technique ออกมาให้ได้ 1 OD. Packed cell แล้ว label เป็น induced cell ไว้เตรียมสำหรับแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ในขั้นตอนต่อไป

3.6.5 การสกัดโปรตีน และวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

นำเซลล์แบคทีเรียที่มี recombinant DNA อยู่ จำนวน 50 ml มาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และเท supernatant ส่วนของ LB broth ที่เติม 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 buffer (buffer A+ 5 mM CaCl₂ แข็ง) 5 ml แล้ว resuspend ทำการ break เซลล์ด้วยวิธีการ freezing-thawing 1 ครั้ง และนำไป sonicate ด้วยเครื่อง sonicator ที่ความแรงของคลื่นเสียงปานกลาง-สูง โดย sonicate 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที และหยุดพัก 1 นาที (ในน้ำแข็ง) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000×g เป็นเวลา 20-25 นาที ที่ 4°C ดูดเก็บ supernatant ใส่ tube ใหม่ Label ว่าเป็น Crude lysate นำไปแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE 10 µl เพื่อตรวจสอบโปรตีนอีกครั้ง นำสารละลายโปรตีนที่ได้มาแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ต่อไป

เตรียม SDS-PAGE โดยใช้ separating gel 10% และ stacking gel 4% (รายละเอียดการเตรียม อยู่ในภาคผนวก) และเตรียมตัวอย่างโปรตีนโดยผสม sample กับ 4Xloading dye buffer (60 mM Tris-HCl pH 7.5, 2% SDS, 10% glycerol, 0.025% bromophenol blue, 100 mM DTT) ในอัตราส่วน 3:1 แล้ว heat ที่ 95°C เป็นเวลา 10 นาที vortex แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไป load ลงในเจล โดยใช้ prestained marker เพื่อเปรียบเทียบ molecular weight และเติม running buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS) ทำการแยกโปรตีนในสภาวะกระแสไฟฟ้าคงที่ constant Amp 25 mA ต่อ 1 เจล (~200 V) จาก cathode ไปยัง anode จน dye ตกขอบล่างของแผ่นเจล นำเจลไปย้อมสี 0.1% Coomassie brilliant blue เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีออกด้วย destaining solution (10% ethanol and 10% glacial acetic acid) ตลอดจนหรือจนกว่า background จะใส เพื่อศึกษาแถบโปรตีนต่าง ๆ

3.6.6 การทดสอบความสามารถในการจับตัวรับบนผิวเซลล์

นำเม็ดเลือดแดงแกะหรือเม็ดเลือดขาวคนที่เตรียมแยกได้ ปั่นล้างสิ่งปนเปื้อนอีกครั้ง ด้วย 1XTBS buffer จากนั้นเตรียม sample reaction ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบดังนี้: Negative control (Sterile DW 150 µl, 10x TBS 20 µl, red/white blood cells 30 µl) และ Crude lysate (10x TBS 20 µl, red/white blood cells 30 µl, Crude lysate 150 µl) โดยให้มีปริมาตรสุดท้าย (total volume) 200 µl แล้วนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้น นำไปปั่นแยกลำดับขั้น ที่ความเร็วรอบ 12,000×g นำแต่ละชั้น (fraction) ที่ได้ไปแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ Western blot analysis เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของโปรตีน RTX

3.6.7 Western blot analysis

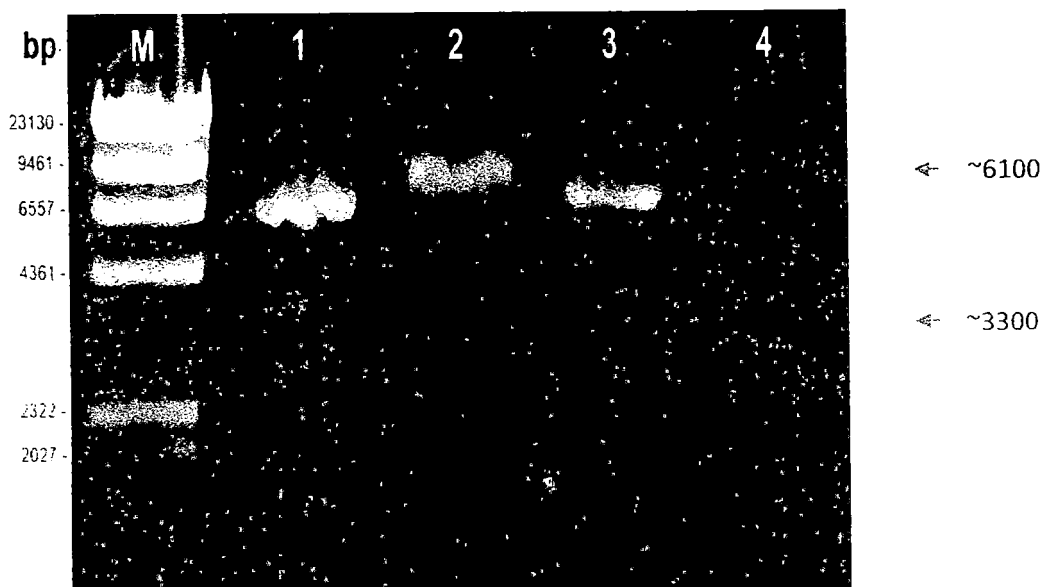
แผ่นเจลที่ได้จาก SDS-PAGE และยังไม่ได้อ้อมสี Coomassie blue นำมาย้ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยวิธี semi-dry blotting โดยแช่แผ่น nitrocellulose membrane กระดาษกรอง และแผ่นเจลใน transfer buffer (39 mM glycine, 48 mM Tris-HCl (pH 9.2), 0.0375% SDS, 5% methanol) เป็นเวลา 15-30 นาที นำ Fiber pad วางบน blotting cassette ตามด้วยกระดาษกรอง 1 แผ่น ตามด้วยแผ่น nitrocellulose membrane และแผ่นเจล โดยให้เจลอยู่ด้านขั้ว cathode และแผ่น nitrocellulose membrane อยู่ด้านขั้ว anode โดยไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นวางกระดาษกรองอีก 1 แผ่น ทำการ transfer โปรตีนที่ constant current 350 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่น nitrocellulose membrane ที่ได้ไปย้อมด้วยสี 0.1% Ponceaus S ใน 5% acetic acid 5-10 วินาที ล้างสี Ponceus S ออกด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการ block nonspecific binding โดยการแช่ใน Blotto solution (5% skim milk ใน 1xPBS buffer) 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่แผ่น nitrocellulose membrane ใน primary antibody (anti-RTX polyclonal antibody) ใน Blotto solution ด้วยอัตราส่วน 1: 5,000 นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นแช่ใน secondary antibody (goat-anti rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase) ใน Blotto solution ด้วยอัตราส่วน 1: 4,000 นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 10 นาที และล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นแช่ใน carbonate buffer (100 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9.8) ที่ประกอบด้วย developer solution [5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT)] จนเห็นแถบ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งและเก็บในที่มืด

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดและวิเคราะห์พลาสมิด pCyaA-RTX และ pET17b vector

จากการสกัดพลาสมิด pCyaA-RTX และ pET17b vector จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยชุด GF-1 plasmid extraction Kit แล้วตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดที่สกัด โดยการตัดด้วย restriction enzyme คือ *Bam*HI และ *Hind*III ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปรัน 0.8% (w/v) Agarose gel electrophoresis ผลที่ได้พบว่า พลาสมิด pCyaA-RTX ที่ได้ผ่านการตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI และ *Hind*III มีลักษณะ band เดียว คือ ขนาด ~6100 bp สูงกว่า RTX Plasmid ปกติ และ pET17b vector ที่ผ่านการตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI และ *Hind*III มีขนาด ~3300 bp (ภาพที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 แสดงผลการวิเคราะห์พลาสมิด pCyaA-RTX และ pET17b vector ด้วย 0.8% (w/v)

Agarose gel electrophoresis

โดย Lane M: λ /HindIII marker

Lane 1: pCyaA-RTX plasmids

Lane 2: pCyaA-RTX plasmids ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III

Lane 3: pET17b vector

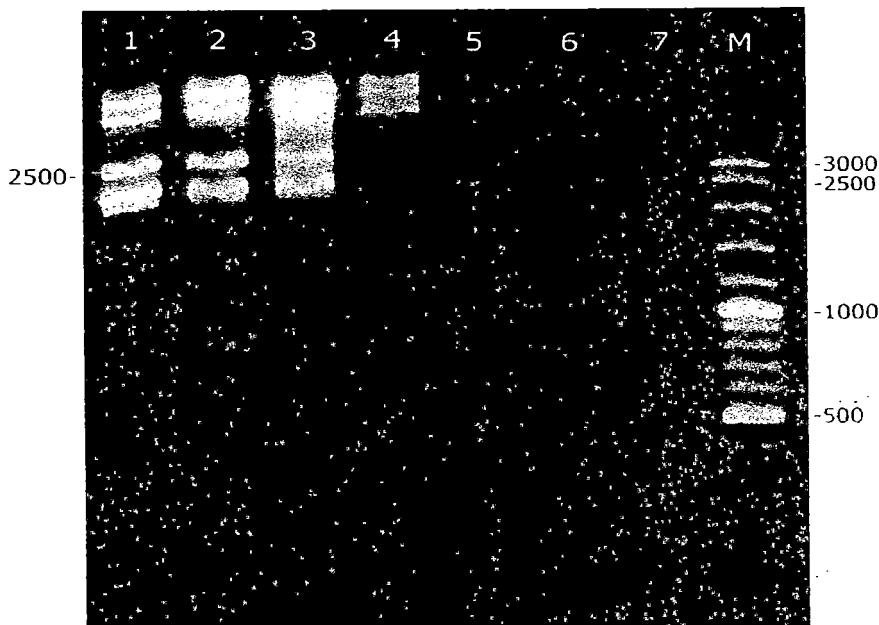
Lane 4: pET17b vector ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III

616.204
96645ก 23

3 95615

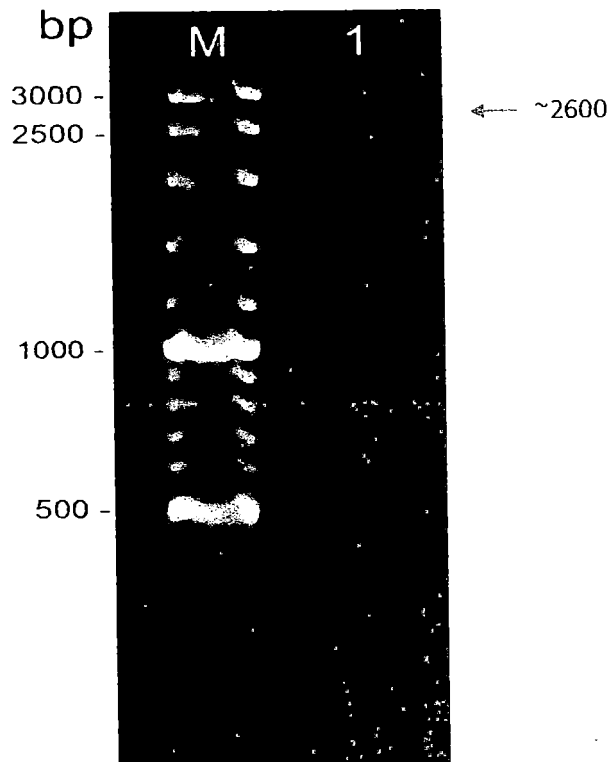
4.2 ผลการสร้างยีน *cyaA-RTX* ที่ขาดส่วน C-terminal region โดยวิธี PCR

นำพลาสมิด pCyaA-RTX ที่สกัดได้ใช้เป็น DNA template ในการสังเคราะห์ยีน *cyaA-RTX* ที่ขาดส่วนของ C-terminal secretion signal (truncate gene ขนาด ~2560 bp) โดยออกแบบ forward primer: 5'-GATATACATATGGCCAATTCGGAC-3' และ reverse primer: 5'- CCGCCCGGATCCTAGATCGT -3' ตามลำดับ ผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing (Ta) แบบ gradient ที่ 50-60°C จำนวน 30 รอบ แล้วทำการวิเคราะห์หาขนาดของ PCR products ประมาณ 2560 bp. ที่ได้ ด้วย 0.8% (w/v) Agarose gel electrophoresis ซึ่งสามารถพบแถบ PCR products ในช่วง Ta = 50-55°C product (ภาพที่ 4-2) โดยเลือกผลของ Band PCR product ที่ Ta = 52°C และตัดเจลเฉพาะแบนที่ขนาด ~2600 bp และสกัด DNA ออกจากเจล (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-2 ตรวจสอบ PCR products ที่ได้ เมื่อใช้ Ta gradient ที่ 50-60°C ด้วย 1% (w/v) Agarose gel electrophoresis

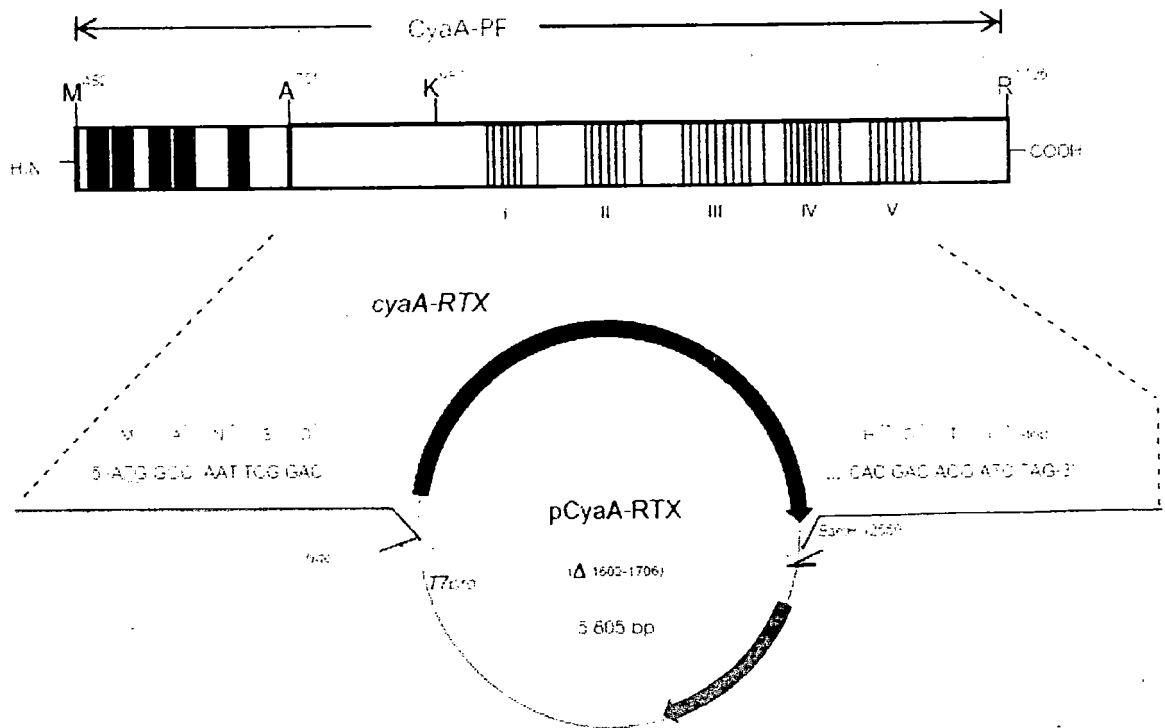
โดย	Lane M: VC 100 bp marker	Lane 4: PCR products ที่ 56.8°C
	Lane 1: PCR products ที่ 50.2°C	Lane 5: PCR products ที่ 59.1°C
	Lane 2: PCR products ที่ 52.0°C	Lane 6: PCR products ที่ 60.0°C
	Lane 3: PCR products ที่ 54.4°C	Lane 7: Negative control



ภาพที่ 4-3 แสดง Purified ~2600 bp PCR products ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เมื่อใช้ T_a ที่ 52°C วิเคราะห์ด้วย 0.8% (w/v) Agarose gel electrophoresis โดย Lane M: VC 100 bp marker
Lane 1: Purified ~2600 bp PCR products ที่ $T_a = 50.2^\circ\text{C}$

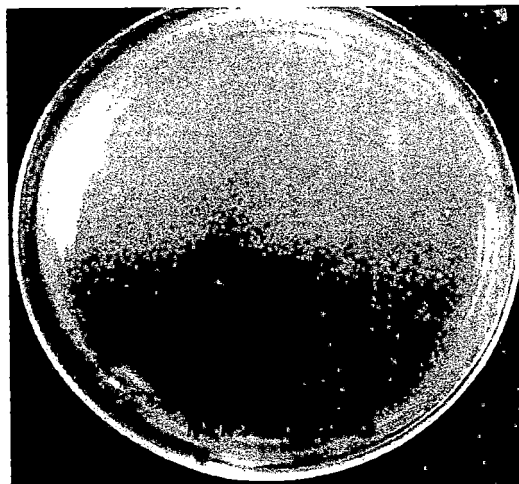
4.3 ผลการสร้าง pCyaA-RTX Δ 1602-1706

ชิ้นส่วนของ PCR products ที่คาดว่าเป็นยีน *cyaA-RTX* Δ 1602-1706 (Deletion gene) ที่มีลำดับเบส 2559 bp. ที่สามารถถอดรหัสจากกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง A⁷⁵¹ ถึง I¹⁶⁰¹ ของโปรตีนพิษ CyaA เฉพาะส่วน RTX region ที่ตัดชิ้นส่วนทางด้าน C-terminal region ออก ซึ่งมีตำแหน่งที่สามารถตัดด้วย *NdeI* และ *BamHI* ที่ตำแหน่งปลาย 5' และ 3' จากการออกแบบด้วย forward และ reverse primers ตามลำดับ ทำให้สามารถตัดต่อลงใน pET17b vector ที่ตัด restriction enzymes ณ ตำแหน่งเดียวกัน ด้วยการทำให้สามารถสร้าง recombinant clone ของ pCyaA-RTX Δ 1602-1706 ขนาด 5,805 bp. ได้ ดังแสดงภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 แสดงพลาสมิดกลายพันธุ์ pCyaA-RTX (Δ 1602-1706) ที่ตัดตำแหน่งทางด้าน C-terminus

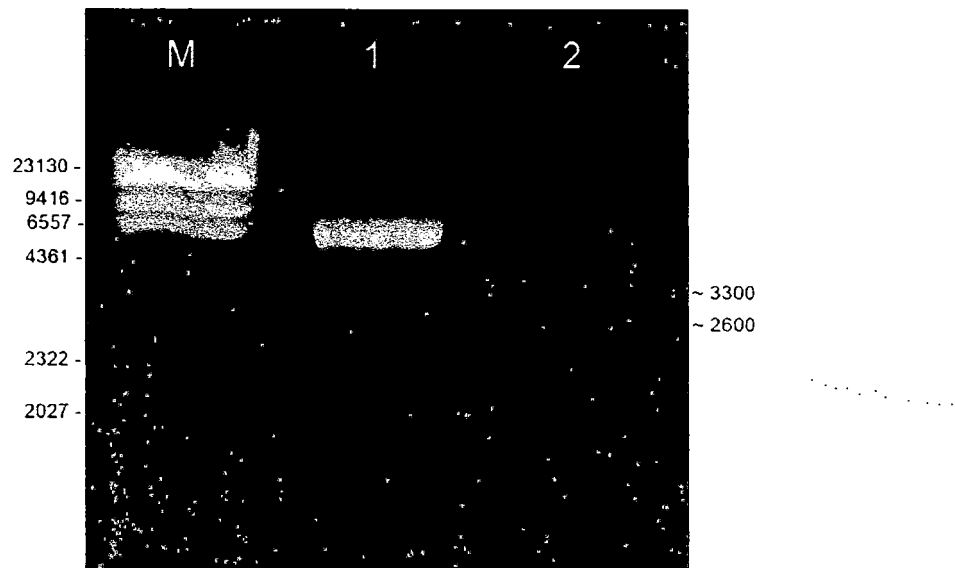
นำ Ligation ที่ได้ มา transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 พบโคลนที่สามารถเจริญบน LA ที่มี Ampicillin 100 μ g/ml ประมาณ 10 โคลน (ภาพที่ 4-5) ทำการคัดเลือก Recombinant clones ทั้งหมด และตรวจสอบความถูกต้องของโคลนด้วยวิธี Restriction enzyme analysis และ DNA sequencing



ภาพที่ 4-5 แสดงโคลนที่เจริญบน LA + 100 μ g/ml Amp plate ในการคัดเลือก recombinant clones

4.4 ผลการตรวจสอบ Recombinant Clones ด้วยวิธี Restriction enzyme analysis

ตรวจสอบ Recombinant DNA โดยกระบวนการ restriction enzyme *NdeI* และ *BamHI* analysis ใน lane 2 ของภาพที่ 4-6 พบแถบ DNA 2 แถบ ของ ยีน *cyaA-RTX Δ1602-1706* ขนาด ~2600 bp. และ แถบ pET17b vector ขนาด ~3300 bp. (ภาพที่ 4-6) เมื่อวิเคราะห์ขนาดของ DNA ที่ ได้ด้วย 0.8% (w/v) Agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 4-6 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการตรวจสอบ recombinant DNA โดยวิธี Restriction enzyme analysis เมื่อเทียบกับ *Lamda DNA/HindIII* Marker เมื่อวิเคราะห์ด้วย 0.8% (w/v) Agarose gel electrophoresis

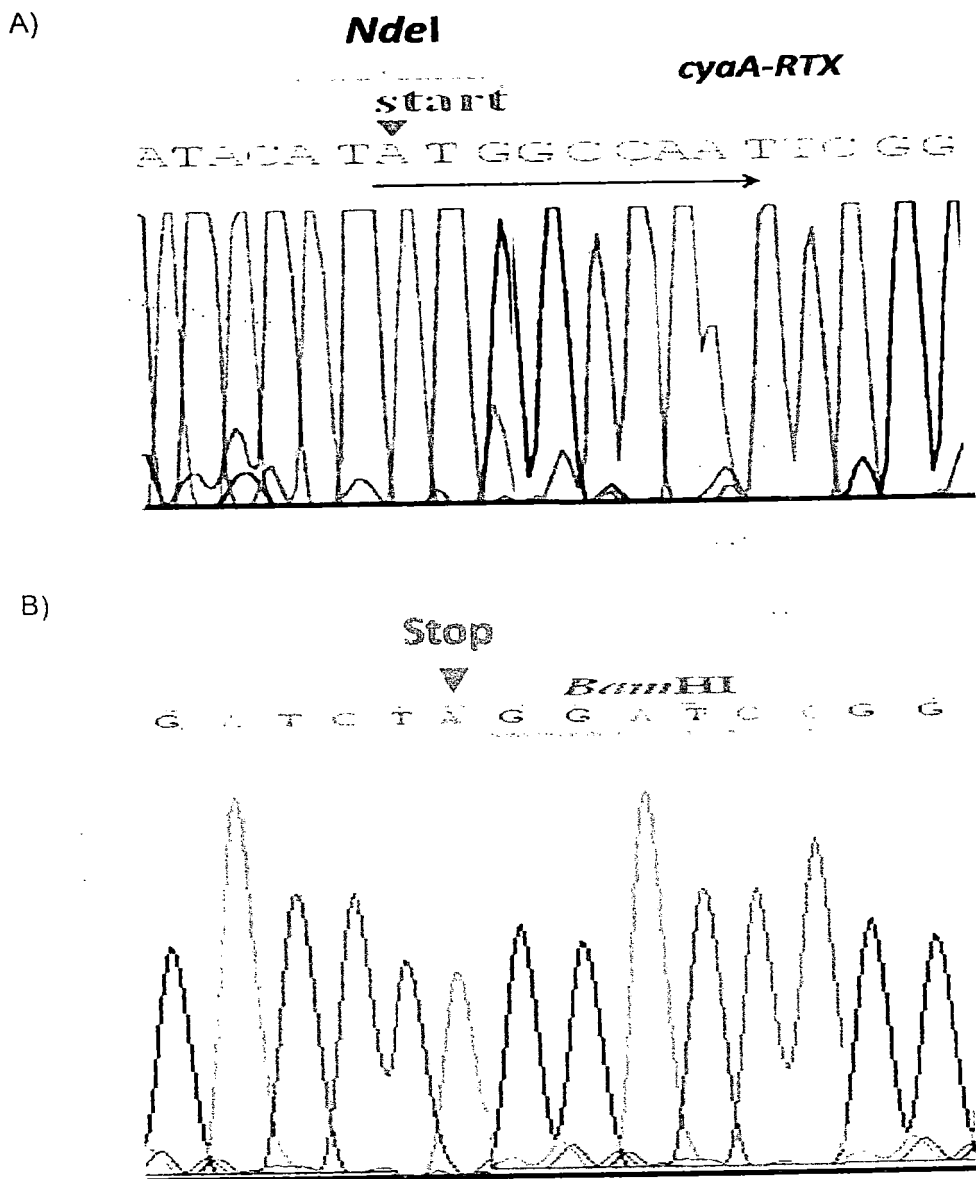
โดย Lane M: *Lamda DNA/HindIII* Marker

Lane 1: uncut recombinant DNA ขนาด ~5800 bp.

Lane 2: cut recombinant DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *BamHI*

4.5 ผลการตรวจสอบ Recombinant Clones โดยวิธี DNA sequencing

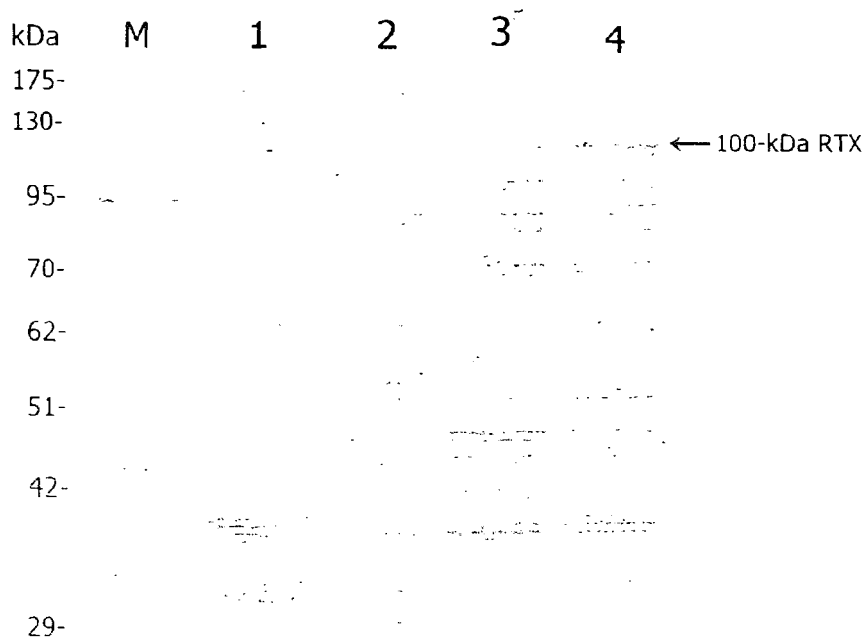
จากการตรวจสอบ Recombinant clone โดยวิธี DNA sequencing พบว่า ลำดับเบสของยีน *cyaA-RTX* $\Delta 1602-1706$ ที่ตำแหน่ง ปลาย 5' มีลำดับเบสของ restriction enzyme *NdeI* ในจุดของ Start codon และปลาย 3' มีลำดับเบสของ *BamHI* ที่ตำแหน่งหลัง Stop codon ตามการออกแบบไพรเมอร์ที่กำหนดไว้ (ภาพที่ 4-7) โดยตรวจสอบลำดับเบสดังกล่าว จากการใช้ primer: T7 promotor (A) และ T7 terminator (B) ตามลำดับ



ภาพที่ 4-7 แสดงการตรวจสอบลำดับเบสของยีน *cyaA-RTX* $\Delta 1602-1706$ โดยวิธี DNA sequencing analysis ที่มีตำแหน่งของปลาย 5' *NdeI* (A) และปลาย 3' *BamHI* (B)

4.6 ผลการแสดงออกของโปรตีน truncated CyaA-RTX

นำ Recombinant clone ของ pCyaA-RTX Δ 1602-1706 หรือ truncated CyaA-RTX subdomain ที่ได้ และ pCyaA-RTX-wild type มา retransform เข้า *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE)pLysS และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน โดยใช้ IPTG inducer ภายใต้การทำงานของ T7 promotor เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนและนำเซลล์ที่ได้ นำ Packed 0.1 O.D₆₀₀ cells มาโหลดบน SDS-PAGE พบว่า โคลน pCyaA-RTX-wild type มีการแสดงออกของโปรตีน CyaA เฉพาะส่วน RTX subdomain ที่มีขนาดประมาณ 100 kDa (ภาพที่ 4-8, Lane 4) และ โคลน pCyaA-RTX Δ 1602-1706 มีการแสดงออกของโปรตีน truncated CyaA-RTX ที่มีขนาดประมาณ 90 kDa (ภาพที่ 4-8, Lane 3)



ภาพที่ 4-8 แสดง SDS-PAGE (Coomassie blue-stained 10% gel) ของโปรตีน CyaA-RTX-wild

type และโปรตีน truncated CyaA-RTX

- โดยที่
- Lane M: prestained protein marker
 - Lane 1: pET17b vector
 - Lane 2: uninduced RTX
 - Lane 3: induced truncated RTX protein
 - Lane 4: induced RTX-wide type proteins

นอกจากนี้ ยังพบว่า น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แสดงออกของ truncated CyaA-RTX มีความสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลที่ทำนายโดยใช้โปรแกรม Compute pI/Mw จากฐานข้อมูลทาง Bioinformatics เมื่อคิดจากตำแหน่งของกรดอะมิโน M⁷⁵¹ ถึง I¹⁶⁰² รวมทั้งสิ้น 852 กรดอะมิโน ซึ่งมีค่า Theoretical pI/Mw เท่ากับ 4.24 / 88612.23 Da. แสดงดังภาพที่ 4-9

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

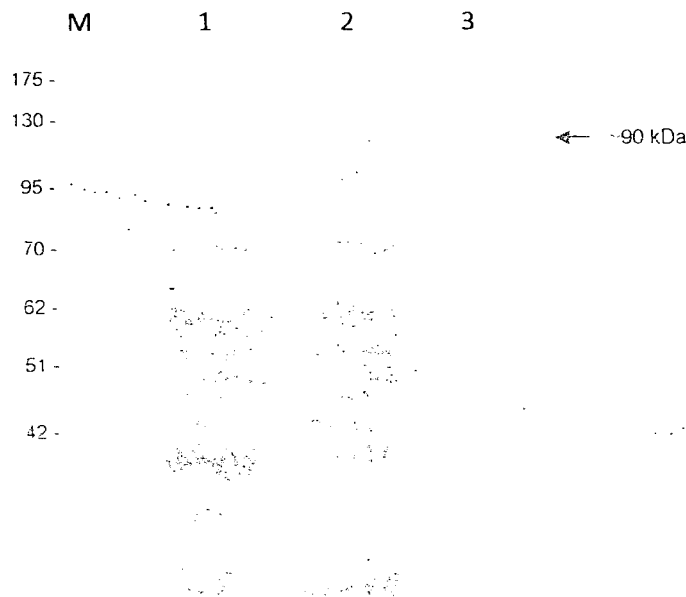
10	20	30	40	50	60
MANSDGLRKM	LADLQAGWNA	SSVIGVQTTE	ISKSALELAA	ITGNADNLKS	VDVFVDREVQ
70	80	90	100	110	120
GERVAGQPVV	LDVAAGGIDI	ASRKGERPAL	TFITPLAAPG	EEQRRRIKTG	KSEFTTFVEI
130	140	150	160	170	180
VGKQDRWRIR	DGAADTTIDL	AKVVSQLVDA	NGVLKHSIKL	DVIGSDGDDV	VLANASRIHY
190	200	210	220	230	240
DGGAGTNTVS	YAALGRQDSI	TVSADGERFN	VRKOLNNANV	YREGVATQTT	AYGKRTEENVQ
250	260	270	280	290	300
YRHVELARVG	QLVEVDLLEH	VOHIIGGAGN	DSITGNAHDN	FLAGGSGDDR	LDGGAGNDTL
310	320	330	340	350	360
VGEGEONTVI	GGAGDDVFLQ	DLGWVSNQLD	GGAGVDTVKY	NVHQPSEERL	ERMGDTGIHA
370	380	390	400	410	420
DLQKGTVEKW	PALNLFVVDH	VKNIENLHGS	RLNDRIAGDD	QDNELWGHDS	NDTIRGRGGD
430	440	450	460	470	480
DILRGGGLGD	TLYGEDGNDI	FLODBETVSD	DIDGGASLDT	VDYSAMIHPG	RIVAPHEYGF
490	500	510	520	530	540
GIEADLSREW	VRKASALGVD	YYDNVRNWNEN	VIGTSMKDVL	IGDAQANTLM	GQGGDDTVRE
550	560	570	580	590	600
GDGDDLLFGG	DGNDMLYGDA	GNDTLYGGGLG	DDTLEGGAGN	DWFGQTOARE	RDVLRGGDGV
610	620	630	640	650	660
DTVSYQOTGA	HAGIAAGRIG	LGILADLGGG	RVDKLGEGAGS	SAYDTVSGIE	NVVGTELADR
670	680	690	700	710	720
ITGDAQANVL	RGAGGADVLA	GGEGDDVLLG	GDGDDQLSGD	AGRDRLYGEA	GDDWFFQDAA
730	740	750	760	770	780
NAGNLLDGGD	GRDTVDFSGP	GRGLDAGAKG	VFLSLGKGF	SLMDEPETS	NVLRNIENAVG
790	800	810	820	830	840
SARDDVLIGD	AGANVLNGLA	GNDVLSGGAG	DDVLLGDEGS	DLLSGDAGND	DLFGGQGGDDT
850					
YLFVGVGYGHD	TI				

Theoretical pI/Mw: 4.24 / 88612.23

ภาพที่ 4-9 แสดงผลการทำนายน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพิษ CyaA-RTX₇₅₁₋₁₆₀₂ จากลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม Compute pI/Mw

4.7 ผลการแสดงรูปแบบของโปรตีนพิษ truncated CyaA-RTX

เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน โดยใช้ IPTG inducer แล้ว Recombinant protein ที่ผลิตได้จะถูกตรวจสอบรูปแบบ folding หรือ form ของโปรตีนที่ผลิต โดยนำเซลล์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนไป Sonicate ให้เซลล์แตก และนำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000Xg เปรียบเทียบแบนโปรตีนที่พบก่อนและหลังปั่น จากผลการทดลองพบว่า โปรตีน truncated CyaA-RTX อยู่ในรูปละลายน้ำ หรือ Soluble form จากที่เห็นแบนใน fraction ของ supernatant แสดงดังภาพที่ 4-10, lane 2



ภาพที่ 4-10 แสดง SDS-PAGE (Coomassie blue-stained 10% gel) ของลักษณะรูปแบบโปรตีน truncated CyaA-RTX ที่ได้

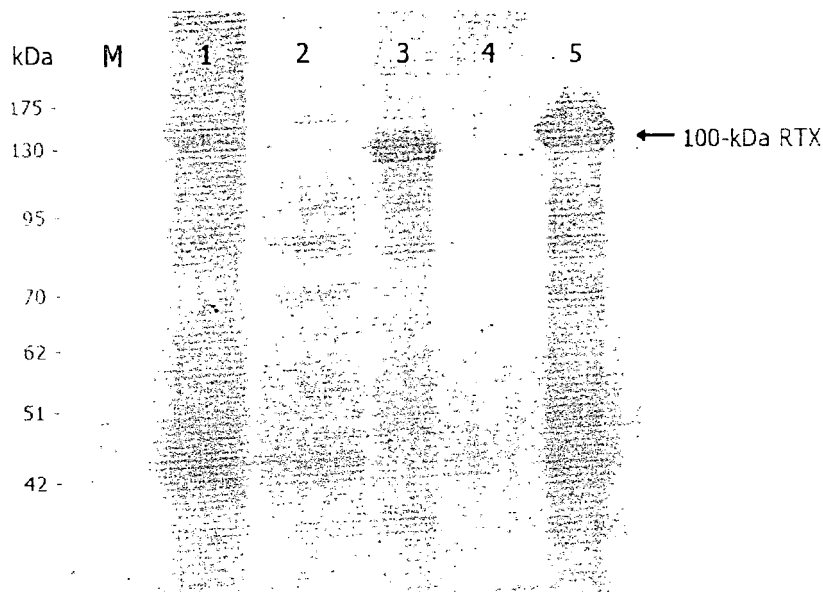
- โดย Lane M: prestained protein marker
Lane 1: Total ของ Truncated CyaA-RTX
Lane 2: Supernatant fractions ของ Truncated CyaA-RTX
Lane 3: Pellet fractions ของ Truncated CyaA-RTX

4.8 ผลการทดสอบความสามารถของโปรตีนในการจับกลุ่มเซลล์เป้าหมาย

นำ Crude lysate ของ truncated CyaA-RTX / wild type ปริมาตรอย่างละ 150 μ l (~1 mg) มาผสมกับเซลล์เม็ดเลือดที่ละลายใน 1XTBS buffer ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปปั่นแยก fraction ที่ความเร็วรอบ 12000Xg ซึ่งเป็นความเร็วรอบที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดตกตะกอนหรืออยู่ในชั้นของ pellet หากโปรตีน RTX สามารถจับกับเซลล์เม็ดเลือด ก็จะพบแบนโปรตีนที่ชั้นของ pellet นี้ พิสูจน์ตำแหน่งของแบนโปรตีน RTX ที่พบด้วย SDS-PAGE และ Western blot analysis

4.8.1 ความสามารถของโปรตีน WT CyaA-RTX ในการจับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ

ผลของ SDS-PAGE analysis ในการจับระหว่างโปรตีน WT CyaA-RTX กับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ พบแบนขนาด ~100 kDa ในชั้นของ pellet (ภาพที่ 4-11A, Lane 3) ที่แสดงให้เห็นถึงการจับกับเม็ดเลือดแดงจำนวนมากในชั้นของ Pellet เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนของ Total fraction (ภาพที่ 4-11A, Lane 1) และไม่พบแบนโปรตีน ~100 kDa ดังกล่าวในชั้นของ Supernatant (ภาพที่ 4-11A, Lane 2) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจับของโปรตีน WT CyaA-RTX กับเม็ดเลือดแดงแกะได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 4-11A แสดง SDS-PAGE (Coomassie blue-stained 10% gel) ต่อความสามารถของโปรตีน WT CyaA-RTX ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ

โดย Lane M : prestained protein marker

Lane 1 : Total sRBCs reactions ของ WT CyaA-RTX

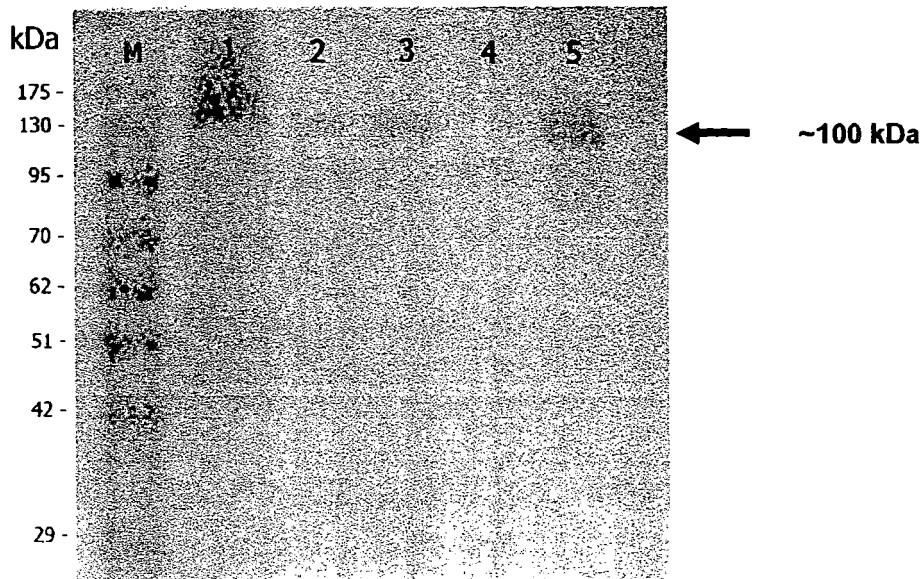
Lane 2 : Supernatant fractions ของ WT CyaA-RTX

Lane 3 : Pellet fractions ของ WT CyaA-RTX

Lane 4 : Pellet fraction ของ lysate-free sRBCs (Negative control)

Lane 5 : Crude cell lysate ของ WT CyaA-RTX

พิสูจน์ตำแหน่งของแบนโปรตีนขนาด ~100 kDa ด้วย anti-RTX polyclonal antibody ที่จำเพาะกับส่วนของ RTX epitope ของ CyaA พบว่าแถบโปรตีนที่ตำแหน่งนั้น คือ RTX toxin เนื่องจากผลของ Western blot analysis ปรากฏแถบโปรตีนที่ตำแหน่งเดียวกันกับ SDS-PAGE (ภาพที่ 4-11B)



ภาพที่ 4-11B แสดง Western blot analysis ของแถบโปรตีน WT CyaA-RTX ต่อความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ ที่ได้จาก Corresponding gel

โดย Lane M: prestained protein marker

Lane 1: Total sRBCs reactions ของ WT CyaA-RTX

Lane 2: Supernatant fractions ของ WT CyaA-RTX

Lane 3: Pellet fractions ของ WT CyaA-RTX

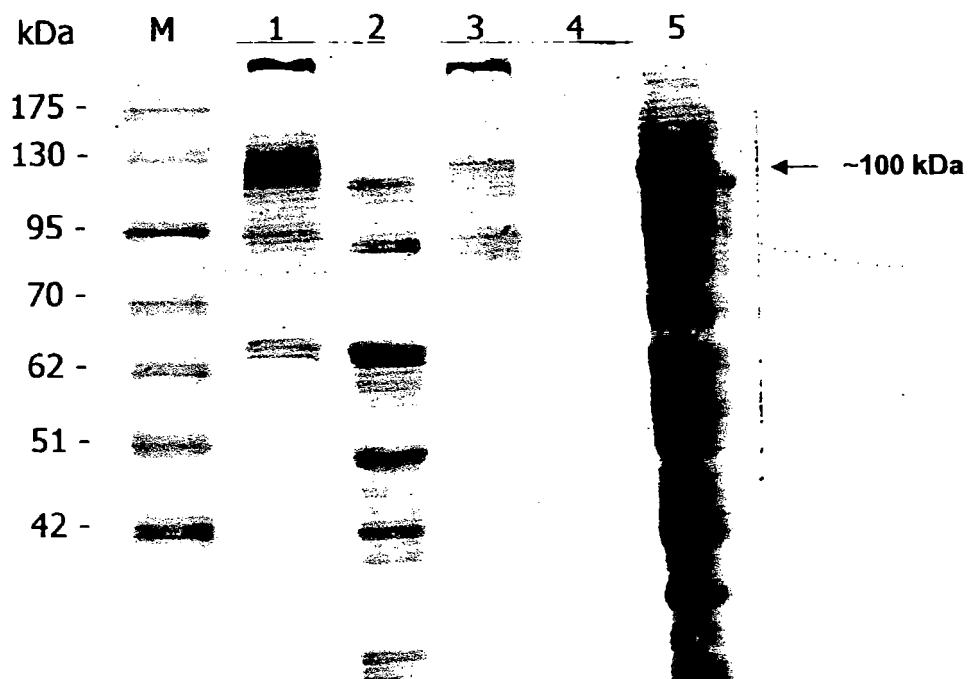
Lane 4: Pellet fraction ของ lysate-free sRBCs (Negative control)

Lane 5: Crude cell lysate ของ WT CyaA-RTX

ผลการเปรียบเทียบความสามารถของโปรตีน WT CyaA-RTX ในการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย พบว่า โปรตีน WT CyaA-RTX มีประสิทธิภาพในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะได้เป็นอย่างดี แสดงดังภาพที่ 4-11

4.8.2 ความสามารถของโปรตีน WT CyaA-RTX ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน

ผลของ SDS-PAGE analysis ในการจับระหว่างโปรตีน WT CyaA-RTX กับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน พบแบนขนาด ~100 kDa ในชั้นของ pellet (ภาพที่ 4-12A, Lane 3) ที่แสดงให้เห็นถึงการจับกับเม็ดเลือดขาวในชั้นของ Pellet เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนของ Total fraction (ภาพที่ 4-12A, Lane 1) และไม่พบแบนโปรตีน ~100 kDa ดังกล่าวในชั้นของ Supernatant (ภาพที่ 4-12A, Lane 2) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจับของโปรตีน WT CyaA-RTX กับเม็ดเลือดขาวคนได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 4-12A แสดง SDS-PAGE (Coomassie blue-stained 10% gel) ต่อความสามารถของโปรตีน

WT CyaA-RTX ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน

โดย Lane M: prestained protein marker

Lane 1: Total hWBCs reactions ของ WT CyaA-RTX

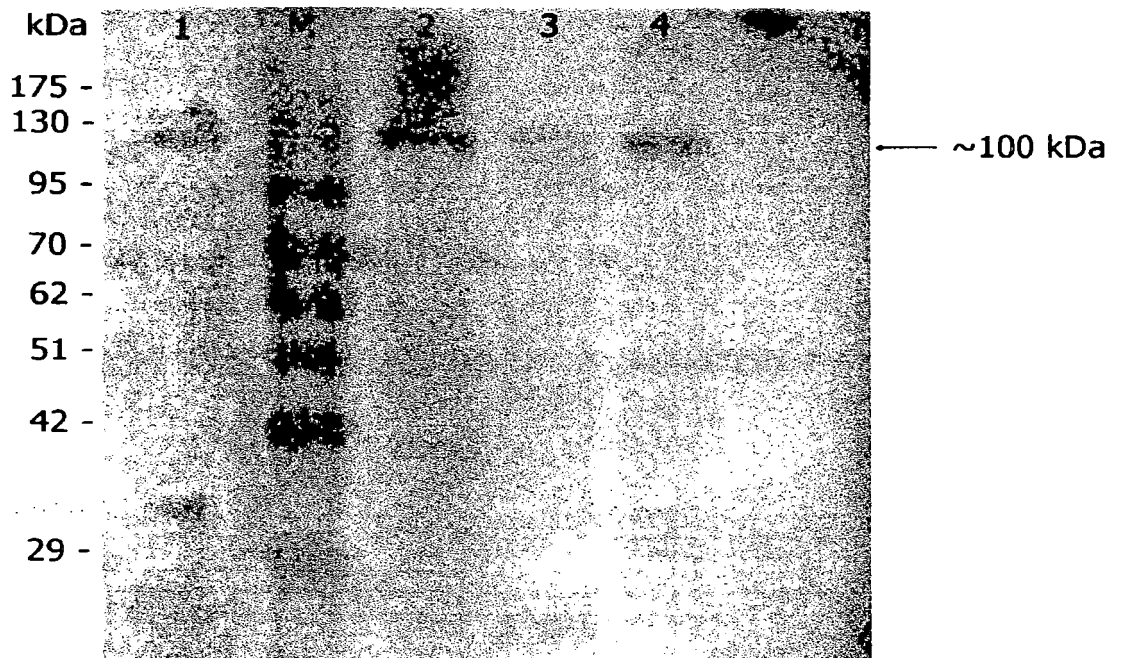
Lane 2: Supernatant fractions ของ WT CyaA-RTX

Lane 3: Pellet fractions ของ WT CyaA-RTX

Lane 4: Pellet fraction ของ lysate-free hWBCs (Negative control)

Lane 5: Crude cell lysate ของ WT CyaA-RTX

พิสูจน์ตำแหน่งของแบนโปรตีนขนาด ~100 kDa ด้วย anti-RTX polyclonal antibody ที่จำเพาะกับส่วนของ RTX epitope ของ CyaA พบว่าแถบโปรตีนที่ตำแหน่งนั้น คือ RTX toxin เนื่องจากผลของ Western blot analysis ปรากฏแถบโปรตีนที่ตำแหน่งเดียวกับ SDS-PAGE (ภาพที่ 4-12B)



ภาพที่ 4-12B แสดง Western blot analysis ของแถบโปรตีน WT CyaA-RTX ต่อความสามารถในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน ที่ได้จาก Corresponding gel

โดย Lane M: prestained protein marker

Lane 1: Crude cell lysate ของ RTX

Lane 2: Total hWBCs reactions ของ RTX

Lane 3: Supernatant fractions ของ RTX

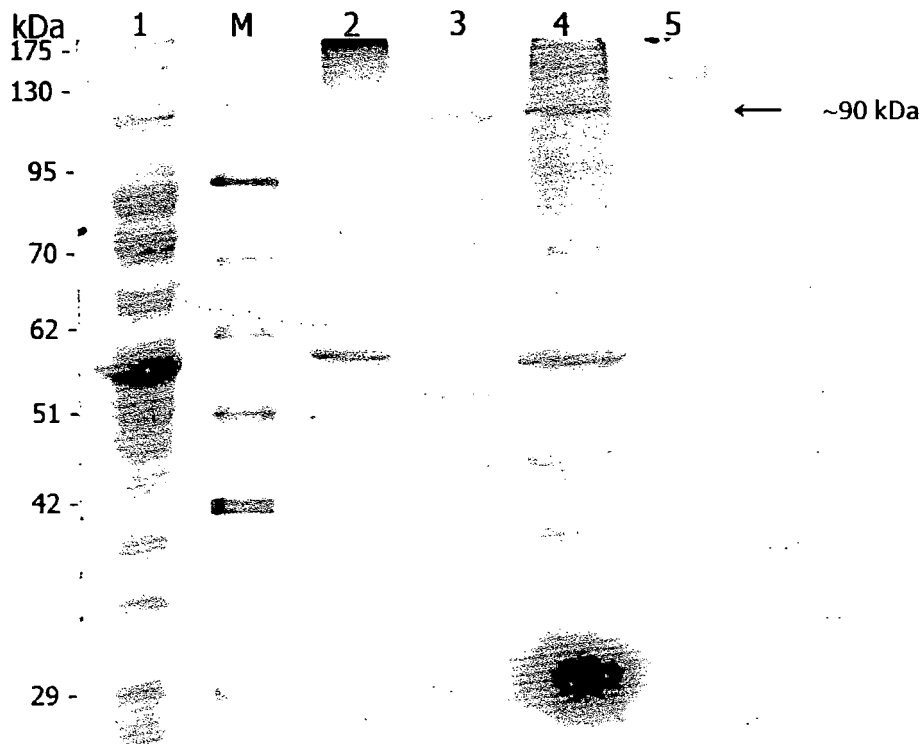
Lane 4: Pellet fractions ของ RTX

Lane 5: Pellet fraction ของ lysate-free hWBCs (Negative control)

ผลการเปรียบเทียบความสามารถของ โปรตีน WT CyaA-RTX ในการจับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย พบว่า โปรตีน WT CyaA-RTX มีประสิทธิภาพในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคนได้เป็นอย่างดี แสดงดังภาพที่ 4-12

4.8.3 ความสามารถของโปรตีน Truncated CyaA-RTX ในการจับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ

ผลของ SDS-PAGE analysis ในการจับระหว่างโปรตีน Truncated CyaA-RTX กับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ พบว่าในชั้นของ Pellet (ภาพที่ 4-13A, Lane 2) ไม่พบแบนขนาด ~90 kDa ที่แสดงให้เห็นถึงการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดง เมื่อเทียบกับชั้นของ Supernatant (ภาพที่ 4-13A, Lane 3) และชั้นของ Total fractions (ภาพที่ 4-13A, Lane 4) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจับกับตัวรับบนเม็ดเลือดแดงแกะได้ไม่ดี เมื่อทำการตัดชิ้นส่วนทางด้าน C-terminal region ของโปรตีน CyaA-RTX

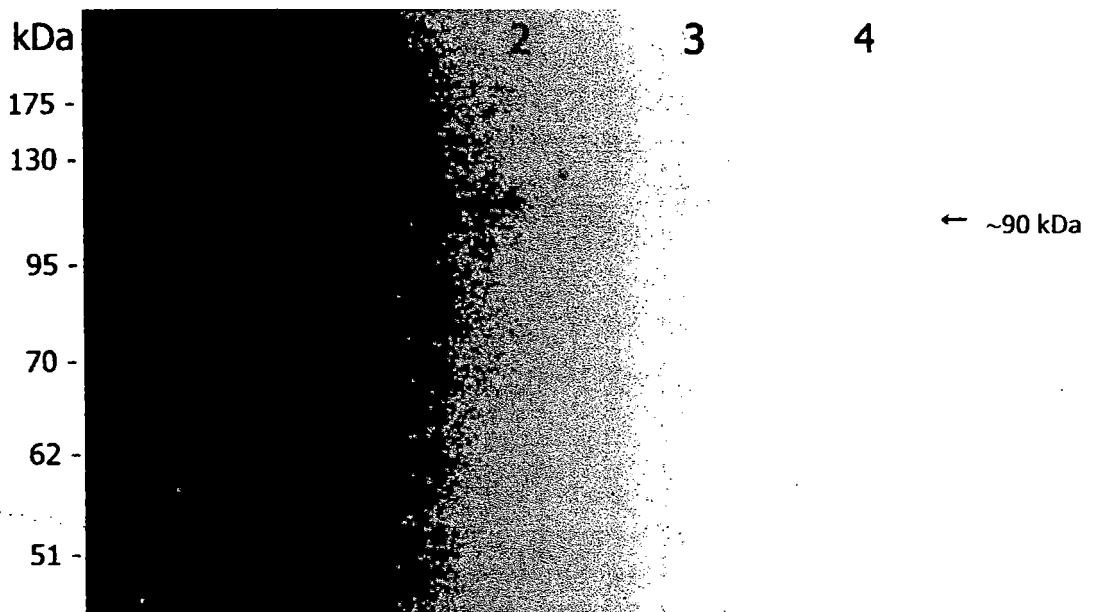


ภาพที่ 4-13A แสดง SDS-PAGE (Coomassie blue-stained 10% gel) ต่อความสามารถของโปรตีน

Truncated CyaA-RTX ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ

- โดย
- Lane M: prestained protein marker
 - Lane 1: Crude cell lysate ของ Truncated CyaA-RTX
 - Lane 2: Pellet fractions ของ Truncated CyaA-RTX
 - Lane 3: Supernatant fractions ของ Truncated CyaA-RTX
 - Lane 4: Total sRBCs reactions ของ Truncated CyaA-RTX
 - Lane 5: Pellet fraction ของ lysate-free sRBCs (Negative control)

พิสูจน์ตำแหน่งของแบนโปรตีนขนาด ~90 kDa ด้วย anti-RTX polyclonal antibody ที่จำเพาะกับส่วนของ RTX epitope ของ CyaA พบว่าแถบโปรตีนที่ตำแหน่งนั้น คือ RTX toxin เนื่องจากผลของ Western blot analysis ปรากฏแถบโปรตีนที่ตำแหน่งเดียวกันกับ SDS-PAGE (ภาพที่ 4-13B)



ภาพที่ 4-13B แสดง Western blot analysis ของแถบโปรตีน Truncated CyaA-RTX ต่อความสามารถ

ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ ที่ได้จาก Corresponding gel

โดย Lane M: prestained protein marker

Lane 1: Total sRBCs reactions ของ Truncated CyaA-RTX

Lane 2: Supernatant fractions ของ Truncated CyaA-RTX

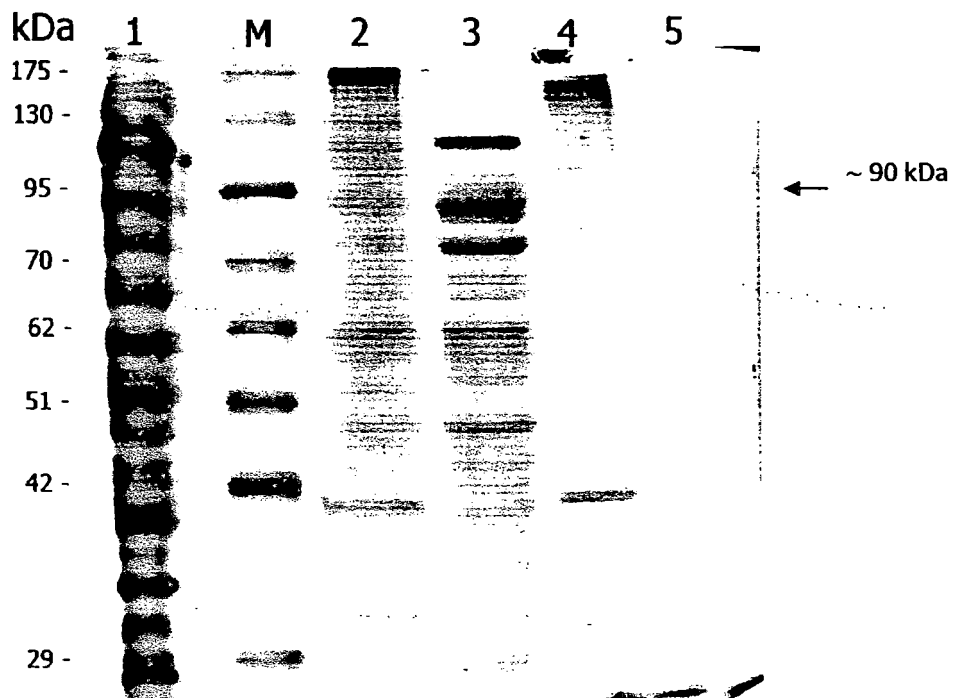
Lane 3: Pellet fractions ของ Truncated CyaA-RTX

Lane 4: Crude cell lysate ของ Truncated CyaA-RTX

ผลการเปรียบเทียบความสามารถของโปรตีน Truncated CyaA-RTX ในการจับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย พบว่า เมื่อขาดชิ้นส่วนของ C-terminal region (aa 1602-1706) ทำให้สูญเสียประสิทธิภาพในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ (ภาพที่ 4-13)

4.8.4 ความสามารถของโปรตีน Truncated CyaA-RTX ในการจับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน

ผลของ SDS-PAGE analysis ในการจับระหว่างโปรตีน Truncated CyaA-RTX กับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน พบว่าในชั้นของ Pellet (ภาพที่ 4-14A, Lane 4) ไม่พบแบนขนาด ~90 kDa ที่แสดงให้เห็นถึงการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน เมื่อเทียบกับชั้นของ Supernatant (ภาพที่ 4-14A, Lane 3) และชั้นของ Total fractions (ภาพที่ 4-14A, Lane 2) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจับกับตัวรับบนเม็ดเลือดแดงขาวคนได้ไม่ดี เมื่อทำการตัดชิ้นส่วนทางด้าน C-terminal region ของโปรตีน CyaA-RTX



ภาพที่ 4-14A แสดง SDS-PAGE (Coomassie blue-stained 10% gel) การทดสอบความสามารถของ

Truncate CyaA-RTX ในการจับต่อเม็ดเลือดขาวคน

โดย Lane M: prestained protein marker

Lane 1: Crude cell lysate ของ Truncated CyaA-RTX

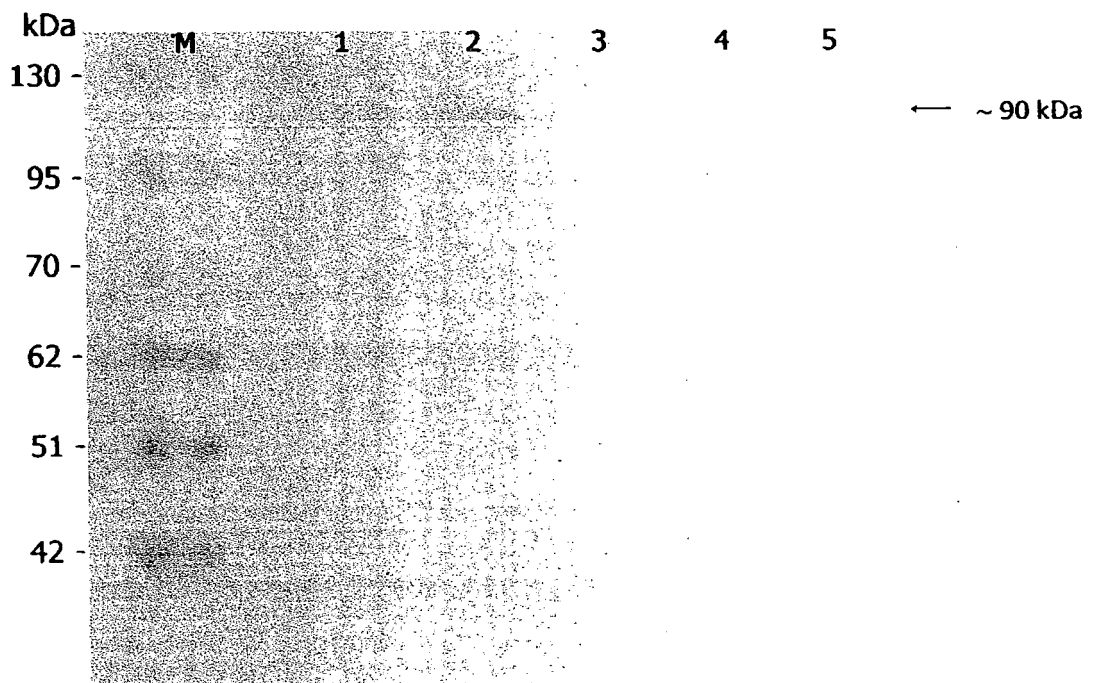
Lane 2: Total hWBCs reactions ของ Truncated CyaA-RTX

Lane 3: Supernatant fractions ของ Truncated CyaA-RTX

Lane 4: Pellet fractions ของ Truncated CyaA-RTX

Lane 5: Pellet fraction ของ lysate-free hWBCs (Negative control)

พิสูจน์ตำแหน่งของแบนโปรตีนขนาด ~90 kDa ด้วย anti-RTX polyclonal antibody ที่จำเพาะกับส่วนของ RTX epitope ของ CyaA พบว่าแถบโปรตีนที่ตำแหน่งนั้น คือ RTX toxin เนื่องจากผลของ Western blot analysis ปรากฏแถบโปรตีนที่ตำแหน่งเดียวกันกับ SDS-PAGE (ภาพที่ 4-14B)



ภาพที่ 4-14B แสดง Western blot analysis ของแถบโปรตีน Truncated CyaA-RTX ต่อความสามารถ

ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน ที่ได้จาก Corresponding gel

โดย Lane M : prestained protein marker

Lane 1 : Total hWBCs reactions ของ Truncated CyaA-RTX

Lane 2 : Supernatant fractions ของ Truncated CyaA-RTX

Lane 3 : Pellet fractions ของ Truncated CyaA-RTX

Lane 4 : Pellet fraction ของ lysate-free hWBCs (Negative control)

Lane 5 : Crude cell lysate ของ Truncated CyaA-RTX

ผลการเปรียบเทียบความสามารถของโปรตีน Truncated CyaA-RTX ในการจับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย พบว่า เมื่อขาดชิ้นส่วนของ C-terminal region (aa 1602-1706) ทำให้สูญเสียประสิทธิภาพในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวคน (ภาพที่ 4-14)

บทที่ 5

อภิปรายผล

ในการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อตัดชิ้นส่วนของยีนทางด้าน C-terminal region จากพลาสมิดต้นแบบ pCyaA-RTX ให้ได้โปรตีน CyaA เฉพาะส่วนของ Gly-Asp repetitive blocks เพื่อศึกษาคุณลักษณะการทำงานของกรดอะมิโนทางด้าน C-terminus ของ RTX subdomain ต่อการจับกับเซลล์เป้าหมาย คือ เม็ดเลือดแดงแกะ และเม็ดเลือดขาวคน โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจับกับเซลล์เป้าหมาย ระหว่างโปรตีน WT CyaA-RTX กับ Truncated CyaA-RTX

5.1 การสร้าง Recombinant clone ของโปรตีนพิษ pCyaA-RTX Δ 1602-1706

จากการสกัดและวิเคราะห์พลาสมิด pCyaA-RTX และ pET17b vector จาก *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ได้จาก ดร.พิชญา พจนโพธา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราช ด้วยชุด GenElute™ Plasmid Miniprep Kit และวิเคราะห์ด้วย 0.8% (w/v) Agarose gel electrophoresis พบว่า แแถบ DNA ของ pCyaA-RTX และ pET17b vector ที่สกัดได้มีปริมาณของ DNA อยู่ในช่วง 50 – 100 ng เมื่อเทียบกับ Lamda DNA/HindIII Marker (38)

จากการสร้างยีน pCyaA-RTX เฉพาะส่วน Gly-Asp repetitive blocks ที่ขาดส่วนของ C-terminal secretion signal โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) จากการออกแบบ primer และ amplify gene (37) ผลของ PCR product เกิดขึ้นได้ เมื่อใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing (Ta) ที่ 52°C ได้แถบ DNA ลักษณะ linear form ขนาดประมาณ 2600 bp. และ เกิด non-specific band ขึ้นเมื่อเทียบกับ 100 bp Ladder DNA Marker จึงทำการ purify PCR band ที่ต้องการให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น ด้วยวิธีการตัดแบน และ elute DNA ออกจากเจล ซึ่ง DNA ที่ได้ในตอนแรกยังมีลักษณะเป็น blunt end หรือ DNA ปลายทู่ ซึ่งไม่สามารถเชื่อมต่อกับ vector ได้ จึงต้องนำ DNA insert และ vector มาตัดด้วย NdeI และ BamHI ซึ่งเป็น restriction enzyme ทำให้ได้ DNA insert และ vector ที่มีลักษณะเป็น sticky end ที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ด้วย DNA ligase ได้เป็น Recombinant plasmid ขนาด ~ 5.8 kbp. โดยวิธี DNA cloning (38)

Recombinant plasmid ที่ได้ เมื่อนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 จะได้โคลนแบคทีเรียที่ประกอบด้วย vector ที่มียีนดื้อยา Ampicilin (antibiotic resistant gene: Amp^R) ทำให้สามารถคัดเลือก host cell ที่มี vector นี้ได้ด้วย LB agar plate ที่มี 100 μ g/ml Ampicilin (38, 40) จึงทำการคัดเลือกโคลน จำนวน 10 โคลน ที่เป็น isolated colony มาสกัด rDNA plasmid ด้วยชุด GF-1 plasmid

extraction Kit และนำไปตรวจสอบ โดยวิธี restriction enzyme analysis ด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *BamHI* เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้น ซึ่งได้ Recombinant plasmid เพียง 3 โคลนจาก 10 โคลน สามารถบอกได้ว่าขั้นตอนการ ligation อาจใช้สัดส่วนระหว่าง insert และ vector ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม (38)

5.2 คุณลักษณะของโปรตีน Truncated CyaA-RTX

จากนั้นนำ recombinant plasmid ที่ได้มาถ่ายโอน (transform) ลงใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพทำให้เกิดการแสดงออกของยีน (expression) สูง โดยมีคุณสมบัติของ λ -DE3 ที่เป็นส่วนของยีน T7 bacteriophage | ทำให้ถอดรหัส T7 RNA polymerase ภายใต้การควบคุมของ *lac* UV5 promoter และมี pLysS plasmid ที่สร้างเอนไซม์ T7 lysozyme ออกมาย่อย T7 RNA polymerase ทำให้ในสภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ก็ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนออกมา โปรตีนจะถูกสังเคราะห์ก็ต่อเมื่อมีการกระตุ้นด้วย IPTG เท่านั้น (43)

ในการทดลองครั้งนี้กระตุ้นการแสดงออกของยีน *cyaA-RTX* ด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.1 mM อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ในการแสดงของโปรตีนพิษ CyaA-PF ตามงานวิจัยของ Powthongchin และ Angsuthanasombat, 2008 (44) และ Pichaya Pojanapotha *et al.*, 2011 (7) ผลการแสดงออกของยีนเมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE เทียบกับ Chromatin Prestained protein ladder, pET17b vector, uninduced/ induced CyaA-RTX พบว่า ในช่วงการกระตุ้นการแสดงออก (induce) มีแถบโปรตีนของ 100-kDa ของ CyaA-RTX ซึ่งทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนอยู่แล้ว ภายใต้สภาวะระบบของ Protein expression นี้ (7)

ส่วน pCyaA-RTX Δ 1602-1706 ในช่วงที่มีการเหนี่ยวนำ (induce) พบแถบโปรตีน truncated CyaA-RTX ขนาดประมาณ 90 kDa เช่นกัน เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน และไม่พบแถบโปรตีนขนาดดังกล่าว ในช่วงที่ไม่มีการเหนี่ยวนำหรือกระตุ้น (uninduce) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ได้นี้ใกล้เคียงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการทำนายโดยใช้โปรแกรม Compute pI/Mw จากฐานข้อมูลทาง Bioinformatics (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool) จากตำแหน่งกรดอะมิโน M⁷⁵¹ - I¹⁶⁰² จำนวนกรดอะมิโน 852 ตัว คำนวณค่า Theoretical pI / Mw ได้เท่ากับ 4.24 / 88612.23 Da. อย่างไรก็ตาม ปริมาณของโปรตีน truncated CyaA-RTX ที่แสดงออก ยังคงมีปริมาณน้อยกว่า WT CyaA-RTX ซึ่งอาจเกิดจากคุณภาพของ rDNA ที่ได้ยังไม่ดีเท่าที่ควร แต่โปรตีนที่แสดงออกอยู่ในรูปของ Soluble form ที่ละลายน้ำได้ เช่นเดียวกับ WT CyaA-RTX ที่เป็นตัวแทนของ native folding แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องของการเรียงตัวโปรตีน หรือ folding เช่นเดียวกับโปรตีนต้นแบบ (6, 42, 44)

5.3 การทดสอบความสามารถในการจับ (Toxin binding) ของโปรตีน WT CyaA-RTX กับ Truncated CyaA-RTX ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะและเม็ดเลือดขาวคน

จากการทดสอบความสามารถในการจับ (Toxin binding) ระหว่างโปรตีน WT CyaA-RTX กับ Truncated CyaA-RTX ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะและเม็ดเลือดขาวคน ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot analysis พบว่า ประสิทธิภาพในการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ทั้งสองชนิดของ Truncated CyaA-RTX ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับ WT CyaA-RTX ดังแสดงให้เห็นดังภาพที่ 4-14 ที่ไม่พบแถบ 90-kDa ในชั้นของ hWBCs และ sRBCs pellet fraction เมื่อรันบน SDS-PAGE และ Western blot analysis

ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า C-terminal region ของ CyaA toxin ในช่วงเปปไทด์ 1602-1706 มีความสำคัญต่อการจับกับกลุ่มเซลล์เป้าหมายทั้งเม็ดเลือดแดงแกะและเม็ดเลือดขาวคน ซึ่งความสำคัญของโปรตีนพิษ CyaA ทางด้าน C-terminus นี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับการที่ Calcium เมื่อจับกับตำแหน่งของ repeat region จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเรียงตัว (Folding) แบบ Beta-roll structures ทางด้าน C-terminus ทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Bleuner M. *et al.*, 2010 (8) และจากงานวิจัยของ Bauche C. *et al.*, 2006 ที่ชี้ให้เห็นว่า ตำแหน่งของ RTX Block V สามารถตอบสนองต่อแคลเซียมในการเรียงตัวได้ในขณะที่ ถัดจากทั้ง Block V และ C-terminal signal จะไม่สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง cytotoxicity และ hemolysis ได้ (9)

จากการเปรียบเทียบ Sequence alignment ของโปรตีนพิษชนิดต่างๆในกลุ่มของ RTX family ของงานวิจัย Aitziber L. *et al.*, 2003 (11) ก็แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ CyaA ในช่วงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1621-1627 บริเวณของโปรตีนส่วนที่อยู่ระหว่าง repeat domain และ C-terminus ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการจับกับตัวรับบนเซลล์เป้าหมาย ดังเช่นโปรตีนพิษชนิดอื่นๆที่พบความสำคัญของช่วงเปปไทด์ที่คล้ายคลึงกัน ตัวอย่างเช่น ลำดับกรดอะมิโนที่ 814-872 ของโปรตีนพิษ Leukotoxin จากเชื้อแบคทีเรีย *P. hemolytica* เกี่ยวข้องในการจับกับ β_2 -integrin receptor ในเซลล์เป้าหมาย (10) และช่วงลำดับกรดอะมิโนที่ 914-936 ของโปรตีนพิษ HlyA จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เกี่ยวข้องในการจับกับ Glycophorin receptor บนผิวเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (11) ซึ่งบ่งบอกให้เห็นถึงความสำคัญของช่วงลำดับเปปไทด์ดังกล่าว

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสรุปได้ว่า สามารถสร้างโคลนยีน pCyaA-RTX Δ 1602-1706 ที่ผลิตโปรตีนพิษ CyaA เฉพาะส่วน Gly-Asp repetitive blocks (Truncated CyaA-RTX) ขนาด ~90 kDa โดยใช้เทคนิคทาง PCR ในการ amplify ยีน ขนาด ~2600 bp. เชื่อมต่อสายดีเอ็นเอเข้ากับ pET17b vector แล้วนำเข้าสู่โฮสต์แบคทีเรีย *E. coli* ได้ recombinant DNA (rDNA) และเมื่อนำ rDNA ที่ได้มากระตุ้นการแสดงออกด้วย 0.1mM IPTG ที่อุณหภูมิ 37°C พบแถบโปรตีน Truncated CyaA-RTX ที่ขาดชิ้นส่วนในด้าน C-terminal region ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1602-1706 ขนาดประมาณ ~90 kDa ในรูปแบบที่ละลายน้ำ และผลของการทดสอบความสามารถในการจับ (Toxin binding) เปรียบเทียบกับโปรตีน CyaA-RTX ต้นแบบ พบว่า โปรตีน Truncated CyaA-RTX ลดประสิทธิภาพในการจับกับเซลล์เป้าหมายทั้งเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะและเม็ดเลือดขาวคน ได้อย่างเห็นได้ชัดเจน

จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปให้เห็นว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ 1602 – 1706 ของ CyaA toxin ในส่วนของ Secretion signal ทางด้าน C-terminal region ที่สำคัญเกี่ยวข้องในการจับกับ receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงและผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวคนอย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งการออกแบบเปปไทด์ในช่วงลำดับเบสดังกล่าวอาจสามารถนำไปใช้ในการผลิต peptide vaccine เพื่อประโยชน์ต่อการป้องกันรักษาโรคไอกรนจาก *B. pertussis* ที่มี CyaA toxin เป็นปัจจัยหลักในการก่อโรคในอนาคต และสามารถนำความรู้ที่ได้นี้ไปศึกษาลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันกับโปรตีนพิษชนิดอื่นๆในกลุ่มของ RTX toxin

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลไกการจับเซลล์ของโปรตีน CyaA-RTX ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เพื่อง่ายต่อการควบคุมในเชิงปริมาณของโปรตีนที่ใช้ และลดปัญหาจากการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่น
2. ควรทดสอบ peptide blocking โดยการออกแบบ peptide สายสั้นๆทางด้าน C-terminal region มาทดสอบความสามารถในการแย่งจับหรือทำลายประสิทธิภาพในการจับระหว่างโปรตีนพิษ CyaA-RTX wild type กับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย (Protection against binding by peptide)
3. หากทราบตำแหน่งของ peptide ของโปรตีนพิษ CyaA ที่สามารถยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์ ก็สามารถพัฒนาเปปไทด์ที่ทดสอบในรูปแบบของ peptide synthetic vaccine เพื่อใช้ในการบำบัดรักษาโรคต่อไปในอนาคต

บทที่ 7

ผลผลิต

ผลงานที่เผยแพร่/ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

1. **Thamwiriyasati N., Angsuthanasombat C.** Receptor-Binding Region in the RTX subdomain of Adenylate cyclase-Hemolysin Toxin against Sheep erythrocytes and human white blood cell. *Protein Expression and Purification*, 2013. (Manuscript in preparation)
2. **Yentongchai M., Angsuthanasombat C., Thamwiriyasati N.** Generation of the *Bordetella pertussis* CyaA toxin fragment containing the hydrophobic region with an acylation site for structure-folding studies. Proceeding in Burapha University International Conference, Burapha University, Thailand: July 4th -5th, 2013. HSP342-9: page 706-712.
3. **นิรมล ธรรมวิริยสดี.** โรคไอกรน: หนทางวิจัยสู่แนวทางการผลิตวัคซีน. จุลสารการวิจัยคณะสหเวชศาสตร์: โครงการเปิดบ้านสหเวชศาสตร์ วันที่ 16 สิงหาคม 2556.
4. **นิรมล ธรรมวิริยสดี.** การวิเคราะห์หาตำแหน่งบริเวณจำเพาะของ RTX ที่จับกับตัวดอบบรับบนผิวเซลล์เป้าหมายของโปรตีนพิษ Adenylate cyclase-Hemolysin เพื่อใช้บำบัดรักษาโรคไอกรนที่เกิดจากเชื้อ *Bordetella pertussis*. ประชุมโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาครั้งที่ 1 (HERP CONGRESS I) วันที่ 21-23 มกราคม 2556.

บรรณานุกรม

1. Crowcroft NS, Pebody RG. (2006). Recent developments in pertussis. *Lancet*, 367, 1926-1936.
2. Olin P, Gustafsson L, Barreto L, et al. (2003). Declining pertussis incidence in Sweden following the introduction of acellular pertussis vaccine. *Vaccine*, 21, 2015-2021.
3. Packard ER, Parton R, Coote JG, et al. (2004). Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. *Journal of medical microbiology*, 53, 355-365.
4. Wood N, McIntyre P. (2008). Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatric respiratory reviews*, 9, 201-211.
5. Mooi FR. (1988). Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 54, 465-474.
6. El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, et al. (2003). Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *The Journal of biological chemistry*, 278, 38514-38521.
7. Pojanapotha P, Thamwiriyasati N, Powthongchin B, et al. (2011). *Bordetella pertussis* CyaA-RTX subdomain requires calcium ions for structural stability against proteolytic degradation. *Protein expression and purification*, 75, 127-132.
8. Blenner MA, Shur O, Szilvay GR, et al. (2010). Calcium-induced folding of a beta roll motif requires C-terminal entropic stabilization. *Journal of molecular biology*, 400, 244-256.
9. Bauche C, Chenal A, Knapp O, et al. (2006). Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *The Journal of biological chemistry*, 281, 16914-16926.
10. Lainson FA, Murray J, Davies RC, et al. (1996). Characterization of epitopes involved in the neutralization of *Pasteurella haemolytica* serotype A1 leukotoxin. *Microbiology*, 142, 2499-2507.

11. Aitziber LC, Félix MG, Helena Ostolaza. (2003). A Receptor-binding Region in *Escherichia coli* α -Hemolysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19159-19163.
12. Deen JL, Mink CA, Cherry JD, et al. (1995). Household contact study of *Bordetella pertussis* infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 21, 1211-1219.
13. กัทธชัย กิรติสิน. (2552). ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล: กรุงเทพมหานคร.
14. อิสยา จันทร์วิทยานุกิต และ วิชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์. (2551). แบคทีเรียทางการแพทย์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพมหานคร.
15. Smith AM, Guzman CA, Walker MJ. (2001). The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev*, 25, 309-333.
16. Rappioli R. (1994). Pathogenicity mechanisms of *Bordetella*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 192, 319-336.
17. Arico B, Nuti S, Scarlato V, et al. (1993). Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 9204-9208.
18. Loch C, Bertin P, Menozzi FD, et al. (1993). The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Molecular microbiology*, 9, 653-660.
19. Ladant D, Ullmann A. (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in microbiology*, 7, 172-176.
20. Confer DL, Eaton JW. (1982). Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science*, 217, 948-950.
21. Goldman WE, Herwaldt LA. (1985). *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin. *Dev Biol Stand*, 61, 103-111.
22. Herwaldt L. (1991). Pertussis in adults: what physicians need to know. *Arch intern Med* 151, 1510-1512.

23. Hewlett E. (2000). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. ed. t, editor. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone.
24. Halperin S, Bortolussi R, Wort A. (1989). Evaluation of culture, immunofluorescence and serology for the diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol*, 27, 752-757.
25. McNicol P, Giercke S, Gray M, et al. (1995). Evaluation and validation of a monoclonal immunofluorescent reagent for direct detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol*, 33, 2868-2871.
26. Koneman E, Allen S, Janda W, et al. (2005). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. ed. t, editor. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott: Williams & Williams.
27. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, et al. (1998). A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*, 16, 1901-1906.
28. Fine PE, Clarkson JA. (1987). Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Reviews of infectious diseases*, 9, 866-883.
29. Gueirard P, Druilhe A, Pretolani M, et al. (1998). Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. *Infect Immun*, 66, 1718-1725.
30. Rose T, Sebo P, Bellalou J, et al. (1995). Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *The Journal of biological chemistry*, 270, 26370-26376.
31. Barry EM, Weiss AA, Ehrmann IE, et al. (1991). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *Journal of bacteriology*, 173, 720-726.
32. Thamwiriyasati N, Powthongchin B, Kittiworakarn J, et al. (2010). Esterase activity of *Bordetella pertussis* CyaC-acyltransferase against synthetic substrates: implications for catalytic mechanism in vivo. *FEMS microbiology letters*, 304, 183-190.
33. Gueronprez P, Khelef N, Blouin E, et al. (2001). The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the $\alpha(M)\beta(2)$ integrin (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine*, 193, 1035-1044.

34. Basar T, Havlicek V, Bezouskova S, et al. (2001). Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *The Journal of biological chemistry*, 276, 348-354.
35. Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. (1999). The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol*, 7, 356-361.
36. Stanley P, Koronakis V, Hughes C. (1998). Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62, 309-333.
37. moomsci.com (2010). เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) [online]. แหล่งที่มา <http://www.moomsci.com/msdata/index.php/2011-06-01-11-03-11/2011-06-01-11-15-6/9/polymerase-chain-reaction-pcr> สืบค้นเมื่อวันที่ 5 เมษายน 2555
38. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
39. สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. *สารานุกรมพันธุศาสตร์*. เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น: กรุงเทพมหานคร; 2548.
40. การแสดงออกของโปรตีน (Protein expression) ในแบคทีเรีย [Online]. http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=16 2013 [สืบค้นเมื่อวันที่ 10 มกราคม 2556].
41. สายทิพย์ ซาปาวี. (2555) เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสกับงานวิจัยด้านวัคซีน. *วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม*. 19 (2), 19-20.
42. Mierendorf RC, Morris BB, Hammer B, Novy RE. (1998). Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *Methods Mol Med*. 13, 257-292.
43. Grodberg, J. and Dunn, J. J. (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, 170(3): 1245-1253
44. Powthongchin, B. & Angsuthanasombat, C. (2008). High level of soluble expression in *Escherichia coli* and characterisation of the CyaA poreforming fragment from a *Bordetella pertussis* Thai clinical isolate. *Arch Microbiol*, 189, 169-174

ภาคผนวก ก
การเตรียมสาร

1. การเตรียม LB broth

Bacto-peptone	10 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	10 g
DW	(เติมให้ครบ 1000 ml)

นำไปนึ่งอบฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 45 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น แล้วเก็บที่ 4°C

2. การเตรียม LA plate

Bacto-peptone	10	g
Bacto-yeast extract	5	g
NaCl	10	g
European Bacteriological Agar	15	g
DW	(เติมให้ครบ 1000 ml)	

นำไปนึ่งอบฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 45 นาที ตั้งทิ้งให้อุ่น แล้วเทใส่ sterile plate ประมาณ plate ละ 3 ml ตั้งทิ้งไว้ปล่อยให้แห้ง แล้วเก็บที่ 4°C

3. การเตรียม Ampicillin 100 mg/ml

Ampicillin	0.1	g
DW	1.0	ml เก็บที่ -20°C

หมายเหตุ Ampicillin จะถูกเก็บใน 4°C เวลาที่ใช้ต้องทำอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง ก่อน เพราะถ้าเปิดใช้เลยอาจทำให้ Ampicillin เหนียวและเสียสภาพได้

4. การเตรียม 10X TBE buffer

Tris-base	108	g
Boric acid	55	g
EDTA	8.3	g
DW	(เติมให้ครบ 1000 ml)	

นำไปนึ่งอบฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ เวลาใช้ต้องทำการเจือจางความเข้มข้นให้เป็น 1X

5. การเตรียม 0.8% (w/v) agarose gel

Agarose	0.8	g
1XTBE buffer	100	ml

แล้วทำให้ผงเจลละลายเป็นสารละลาย ปราศจากฟอง ด้วยตุ๋นไมโครเวฟ จากนั้นนำสารละลายที่ได้เทลงในถาดเจล (Cast gel)

6. การเตรียม 6X loading dye

6X loading dye	1.0	ml
SYBR Green	5.0	µl เก็บที่ -20°C

7. การเตรียม Λ HindIII marker

Λ HindIII marker	5	µl
Dye	95	µl

นำไปต้มที่อุณหภูมิ 65°C เวลา 5 นาที และแช่ในน้ำแข็ง 3 นาที นำไปเก็บที่ -20°C

8. การเตรียม 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	36.3	g
DW	100	ml

ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 8.8 จากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 200 ml ด้วย DW แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียม 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	3.0	g
DW	40	ml

ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 6.8 จากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย DW แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. การเตรียม 10% SDS

Sodiumdodecyl	10	g
DW	(เติมให้ครบ 100 ml)	

11. การเตรียม 10% APS

APS	1.0	g
DW	10	ml เก็บที่ -20°C

12. การเตรียมสารละลายในการทำ SDS-PAGE

12.1 Separating gel 10%

DW	4.1	ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5	ml
30% Acrylamide	3.3	ml
10% SDS	100	μ l
10% APS	50	μ l
TEMED	10	μ l

12.2 Stacking gel 4%

DW	1.8	ml
30% Acrylamide	0.4	ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.75	ml
10% SDS	30	μ l
10% APS	50	μ l
TEMED	10	μ l

13. การเตรียม Running buffer pH 8.3

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	3.02	g
Glycine	14.4	g
SDS	1.0	g
DW	900	ml

ปรับ pH ด้วย NaOH ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 8.3 จากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ด้วย DW

14. การเตรียม Staining solution

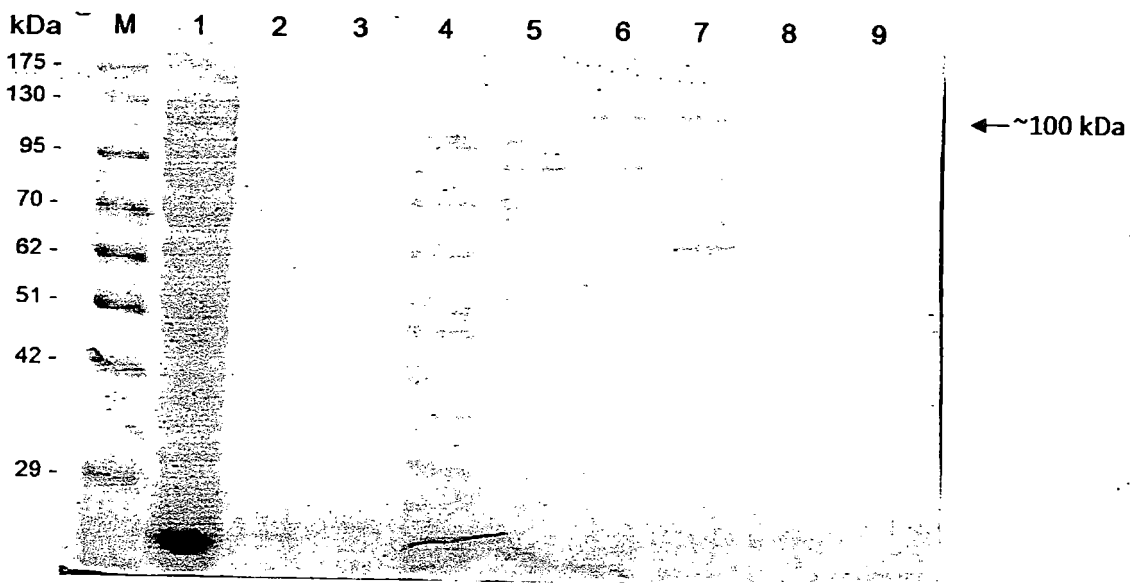
Coomassie Brilliant Blue R250	0.25	g
50% Methanol	400	ml
10% Acetic acid	70	ml
DW	(เติมให้ครบ 1000 ml) เก็บที่อุณหภูมิห้อง	

15. การเตรียม Destaining solution

50% Methanol	400	ml
10% Acetic acid	100	ml
DW	(เติมให้ครบ 1000 ml) เก็บที่อุณหภูมิห้อง	

ภาคผนวก ข
ผลการทำให้โปรตีน RTX บริสุทธิ์

นำ crude cell lysate ที่สกัดออกจากเซลล์แบคทีเรีย มาผ่านกระบวนการ Purification โดยเริ่มจาก Equilibrate column ด้วย Filter sterile MiliQ water 5 column volume จากนั้น Equilibrate column ด้วย Buffer A 5 column volume โหลดโปรตีนตัวอย่าง 1 ml เก็บ fraction เป็น Flow through ล้างส่วน unbound protein ด้วย Buffer A 3 column volume เก็บ fraction เป็น washing Elution โปรตีน แบบ stepwise gradient Buffer (30, 40, 50, 60 และ 100% NaCl) เก็บ fraction เป็น E1, E2 และ E3 ตามลำดับ จากนั้น ล้าง column ด้วย Buffer B Re – Equilibrate column ด้วย Filter sterile MiliQ water 5 column volume เก็บ column ด้วย 20% Ethanol ที่ -20oC จากนั้นนำไปตรวจสอบผลด้วย SDS-PAGE ซึ่งผลที่ได้คือ พบโปรตีนอยู่ในช่วง fraction ที่ 40-50%NaCl ตามลำดับ



ภาพ แสดงผลการทำให้โปรตีน RTX ให้บริสุทธิ์ เมื่อรันบน 10% SDS-gel ที่ย้อมด้วยสี Coomassie Blue

- | | | | |
|--------|--------------------------|--------|----------------------------|
| Lane M | : prestained marker | | |
| Lane 1 | : crude | Lane 6 | : Elute40% B ₂ |
| Lane 2 | : Flow through | Lane 7 | : Elute50% B ₁ |
| Lane 3 | : wash1 | Lane 8 | : Elute60% B ₁ |
| Lane 4 | : Elute30%B ₂ | Lane 9 | : Elute100% B ₁ |
| Lane 5 | : Elute40%B ₁ | | |

**ผลงานที่เผยแพร่/ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ
ทั้งในระดับชาติและนานาชาติ**



Generation of the *Bordetella pertussis* CyaA toxin fragment containing the hydrophobic region with an acylation site for structure-folding studies

Mattayaus Ventongchal^a, Chanan Angsuthanasombati^b, and Niranon Phamywriyasati

Introduction

Adenylate cyclase - haemolysin toxin (CyaA) is a large protoxin (~177 kDa) which is a bifunctional toxin composed of two functional domains, a 400-residue N-terminal adenylate cyclase (AC) domain and a 1,306-residue C-terminal haemolysin or pore-forming (PF) domain [1]. The PF domain comprises four important parts; a hydrophobic region (residues 500-700), an acylation region (residues 800-1,000), a glycine-aspartic acid repeat region (residues 1,000-1,600) containing the nonapeptide repeats (Gly-Gly-X-Gly-X-Asp-Asp-X-Leu), and a C-terminal secretion signal. Toxin activation of CyaA via palmitoylation at Lys⁹⁸³ and calcium binding to the nonapeptide repeats are required for delivery of the AC domain into the target cell interior as well as for formation of lytic pores [2].

Previously, the CyaA pore-forming (CyaA-PF) domain expressed in *Escherichia coli* was shown to retain its hemolytic activity [3]. The preliminary results from hydropathy plot based on hydrophobicity analysis of an amino acid, together with mutagenesis studies, suggested that the transmembrane domain of CyaA is the hydrophobic region between residues 500 to 700 and contains a five putative α -helical bundle, but its structure of pore formation still remain to be investigated. To pave the way for studying mechanisms of membrane insertion and lytic pore-formation of the *B. pertussis* CyaA toxin.

Experimental Design

Plasmid DNA extraction by alkaline lysis method



Construction of recombinant plasmids by partial digestion (*TalI*) & complete digestion (*Adel*)



Synthesized the blunt of recombinant plasmids by Klenow fragment of DNA polymerase I



Toxin expression

polymerase I. The digested plasmid was facilitated the self-ligation later on. The resulting 5,880-bp recombinant plasmid was named as pCyaA-PF6His Δ 1091-1652 (see Figure 1). The correct construct was verified by restriction analysis and DNA sequencing.

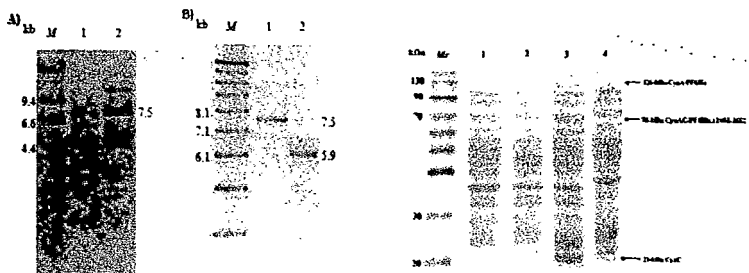


Figure 2 Restriction enzyme digestion for subcloning of pCyaA-PF6His template

Figure 3 Expressed protein profiles of pCyaA-PF6His and pCyaA-PF6His Δ 1091-1652

Expression of the CyaA truncated toxin

The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS for expression the gene product. The ~70-kDa CyaA fragment with C-terminal 6His tag (calculated molecular mass = 68392.20 Da) was highly produced almost exclusively as a soluble protein compared with the wild type (Fig 3). The 21-kDa CyaC-acyltransferase was also expressed in this condition.

Results & Discussion

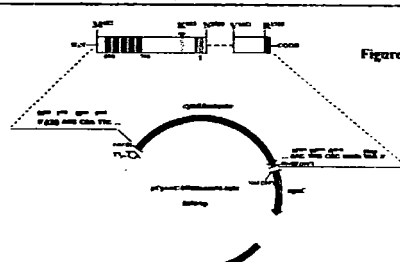


Figure 1. Schematic diagrams of the recombinant plasmids (pCyaA-PF6His Δ 1091-1652) encoding the CyaA protein fragment.

Conclusion

In conclusion, this present report provides evidence that the gene segment encoding the hydrophobic region with an acylation site of CyaA toxin was successfully subcloned. The 70-kDa truncated CyaA toxin with 6His-tagged C-terminal end was well highly-expressed as a soluble protein in *E. coli* in order to further study its functionality.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was generously supported by the Thailand Research Fund in cooperation with the Office of the Higher Education Commission (to N.T., MRG5480261)

REFERENCES

1. Lafont, D., and Ullmann, A. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. Trends Microbiol 7: 173-176
2. Knapp, O., Meier, E., Püllschnee, C., Mada, J., Schar, F., and Blaser, B. 2003. Channel formation in model membranes by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: Effect of calcium. Biochemistry 42: 9877-9884.
3. Ventongchal, M., and Angsuthanasombati, C. 2008. High level of soluble expression in *Escherichia coli* and characterization of the CyaA pore-forming fragment from a *Bordetella pertussis* Thai clinical isolate. Arch Microbiol 190: 169-174.

Construction of recombinant plasmids containing the *cyaA*-PF fragment gene

The gene segment encoding the hydrophobic region with an acylation site (deleting aa 1091 to 1652) and 6His-tagged C-terminal end of CyaA was subcloned by restriction enzyme analysis. The pCyaA-PF6His template was digested with one cut at the 1,824-bp *cyaA* site by *TalI* restriction enzyme (7.5-kb band) and 3,514-bp *cyaA* by *Adel* restriction enzyme (5.9-kb band) (see Figure 2). To create blunt ends of double-stranded DNA, filling in recessed 3' ends of DNA fragments and digesting away protruding 3' overhangs were made by Klenow fragment of DNA

HSP342-9

Generation of the *Bordetella pertussis* CyaA toxin fragment containing the hydrophobic region with an acylation site for structure-folding studies

Mattayaus Yentongchai^a, Chanan Angsuthanasombat^b, and Niramom Thamwiriyasati^{a*}

^a Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

^b Laboratory of Molecular Biophysic and Structural Biochemistry, Bacterial Protein Toxin Research cluster, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakornpathom 73170, Thailand

* Tel: +66-82-685457; E-mail: niramom@buu.ac.th

ABSTRACT

Adenylate cyclase-haemolysin toxin (CyaA) is one of the major virulence factors secreted from *Bordetella pertussis*, the etiologic agent of whooping cough. CyaA is a bifunctional toxin composed of two major domains, the adenylate cyclase domain and the pore-forming domain. Previously, the CyaA pore-forming (CyaA-PF) domain expressed in *Escherichia coli* was shown to retain its hemolytic activity. The preliminary results from hydropathy plot based on hydrophobicity analysis of an amino acid, together with mutagenesis studies, suggested that the transmembrane domain of CyaA is the hydrophobic region between residues 500 to 700 and contains a five putative α -helical bundle. It is planned to generate the CyaA protein fragment which is responsible for membrane insertion and pore formation in defining relationships between sequence, structure and function. In this study, the recombinant plasmids encoding the CyaA hydrophobic region with an acylation site (CyaA-PF Δ 1091-1652) have been subcloned by restriction enzyme digestion and over-expressed in *Escherichia coli* as a ~70-kDa soluble protein. The particular gene of interest will be further investigated its functionality.

Keywords: Adenylate cyclase - haemolysin toxin, *Bordetella pertussis*, Hydrophobic region, Partial digestion, Pore-formation

INTRODUCTION

Adenylate cyclase - haemolysin toxin (CyaA) is one of the major virulence factors of *Bordetella pertussis*, a gram-negative pathogen causing whooping cough in humans (Carbonetti et al., 2005). CyaA belongs to the same RTX (Repeat-in-Toxin) family as the *Escherichia coli* haemolysin, HlyA. CyaA is synthesised as an inactive precursor, which is post-translationally modified by fatty-acylation at the conserved Lys⁹⁸³ into active CyaA in the process catalysed by CyaC-acyltransferase (Barry et al., 1991; Hackett et al., 1994). CyaA is a large protoxin (~177 kDa) which is a bifunctional toxin composed of two functional domains, a 400-residue N-terminal adenylate cyclase (AC) domain and a 1,306-residue C-terminal haemolysin or pore-forming (PF) domain (Ladant and Ullmann, 1999). The PF domain comprises four important parts; a hydrophobic region (residues 500-700), an acylation region (residues 800-1,000), a glycine-aspartic acid repeat region (residues 1,000-1,600) containing the nonapeptide repeats (Gly-Gly-X-Gly-X-Asp-Asp-X-Leu), and a C-terminal secretion signal (Ladant and Ullmann, 1999; Welch, 2001). Toxin activation of CyaA via palmitoylation at Lys⁹⁸³ and calcium binding to the nonapeptide repeats are required for delivery of the AC domain into the target cell interior as well as for formation of lytic pores (Knapp et al., 2003; Rose et al., 1995).

CyaA can intoxicate host immune cells by translocating catalytic AC domain into the cytoplasm. Upon binding to the intracellular calmodulin, CyaA catalyses the production of supraphysiological level of cAMP and subsequently inhibits normal functions of phagocytes, leading to cell death by apoptosis (Gueirard et al., 1998). Unlike cytotoxic activity via AC translocation that involves the entire toxin, pore-forming (haemolytic) activities of CyaA mediated by the PF domain do not require the AC domain (Ehrmann et al., 1992; Sakamoto et al., 1992). It has been shown that myeloid phagocytic cells expressing $\alpha_M\beta_2$ -intergrin receptor (CD11b/CD18) such as neutrophils and macrophages were considered as primary target cells of the *Bordetella* CyaA toxin. Nevertheless, CyaA is also toxic against sheep erythrocytes, which lack the $\alpha_M\beta_2$ -intergrin receptor, suggesting a different mechanism of cell invasion (Osickova et al., 1999). Additionally, it has been demonstrated that the pore-forming activity of CyaA could be acylated at Lys⁹⁸³ by CyaC-acyltransferase in promoting lysis of the target cells (Basar et al., 2001). However, detailed understanding of the molecular mechanism of action of the CyaA toxin is still not completely described, particularly the steps of toxin insertion and pore-formation in target cell membrane.

Previously, the CyaA pore-forming (CyaA-PF) domain expressed in *Escherichia coli* was shown to retain its hemolytic activity (Powthongchin and Angsuthanasombat, 2008). The preliminary results from hydropathy plot based on hydrophobicity analysis of an amino acid, together with mutagenesis studies, suggested that the transmembrane domain of CyaA is the hydrophobic region between residues 500 to 700 and contains a five putative α -helical bundle, but its structure of pore formation still remain to be investigated. To pave the way for studying mechanisms of membrane insertion and lytic pore-formation of the *B. pertussis* CyaA toxin, we decided to construct the recombinant clone of hydrophobic region together with an acylation site within the PF domain (*cyaA-PF Δ 1091-1652*) co-expressing with *cyaC* gene, the accessory protein required for toxin activation. The recombinant CyaA subdomain have been successfully generated by genetic approach and over-expressed as a soluble native fold. The 70-kDa CyaA-PF truncate toxin will be further investigated to define the functional motifs responsible for membrane insertion and pore-formation.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid DNA extraction by alkaline lysis method

A single colony of recombinant *E. coli* was incubated into LB broth containing 100 µg/ml ampicillin and incubated overnight at 37°C with shaking at 200 rpm. Cell collected by centrifugation, resuspend in ice-cold Solution I, lysis cell by adding Solution II and Solution III used to neutralize. After 10-min incubation on ice, the precipitated chromosomal DNA was separated by centrifugation. Plasmid DNA was conserved from supernatant by adding two volumes of isopropanol and centrifugation. Then the pellet was washed with 70% ethanol, air dried and resuspend in 20 µl of sterile water.

Construction of recombinant plasmids

The pCyaAC-PF6His plasmid encoding both the ~126-kDa CyaA-PF fragment with 6His tag and the ~21-kDa CyaC acyltransferase under control of the T7-promoter (Powthongchin and Angsuthanasombat, 2008) was used as a template. The recombinant plasmid encoding *cyaA* deleted gene (aa 1091-1652) co-express with *cyaC* was digested with *TatI* (partial digestion) and *AdeI* (complete digestion), and subsequently synthesized the blunt end by Klewnow fragment of DNA polymerase I to facilitate self-ligation later on. Selected clones with the required recombinant DNA were first identified by restriction endonuclease digestion of the plasmids and then verified by DNA sequencing, using 1st BASE DNA Sequencing service

Toxin expression

The recombinant plasmids were re-transformed into *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS for protein expression. An overnight culture of each selected clone was grown at 30 °C in Luria-Bertani medium containing 100 mg/ml ampicillin. When the cell culture at OD₆₀₀ reached ~0.6, toxin expression was induced with IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) at a final concentration of 0.1 mM, and incubation was continued for another 6 h. *E. coli* cells were harvested and re-suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 5 mM CaCl₂ and 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), and subsequently disrupted in a French Pressure Cell at 10,000 psi. After centrifugation at 12,000g for 20 min at 4°C, total proteins in soluble crude lysates were analysed by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)

RESULTS AND DISCUSSION

Construction of recombinant plasmids containing the *cyaA*-PF fragment gene

The gene segment encoding the hydrophobic region with an acylation site (deleting aa 1091 to 1652) and 6His-tagged C-terminal end of CyaA was subcloned by restriction enzyme analysis. The pCyaAC-PF6His template was digested with one cut at the 1,824-bp *cyaA* site by *TatI* restriction enzyme (7.5-kb band) and 3,514-bp *cyaA* by *AdeI* restriction enzyme (5.9-kb band) (see Figure 1). To create blunt ends of double-stranded DNA, filling in recessed 3' ends of DNA fragments and digesting away protruding 3' overhangs were made by Klewnow fragment of DNA polymerase I. The digested plasmid was facilitated the self-ligation later on. The resulting 5,880-bp recombinant plasmid was named as pCyaA-PF6HisΔ1091-1652 (see Figure 2). The correct construct was verified by restriction analysis and DNA sequencing.

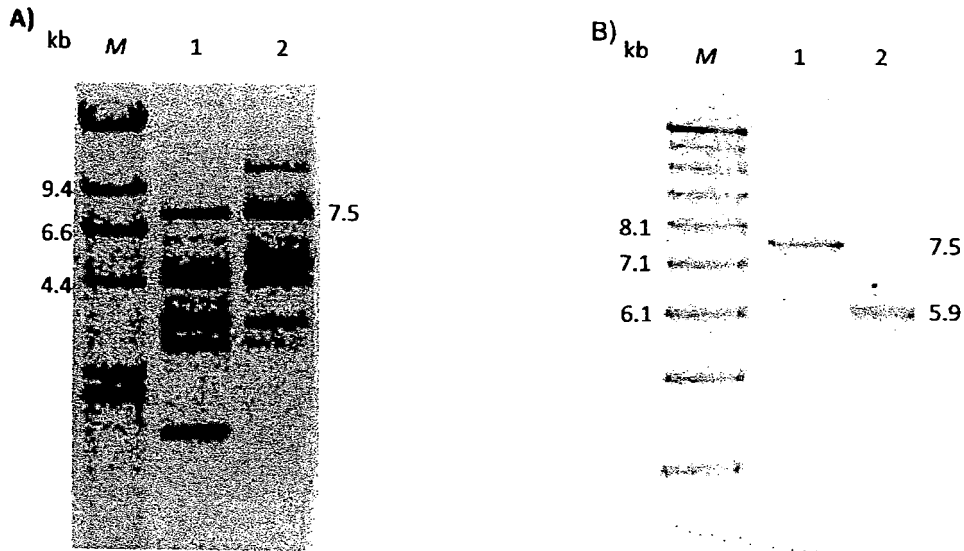


Figure 1 Restriction enzyme digestion for subcloning of pCyaAC-PF6His template

A) Agarose gel electrophoresis (Ethidium bromide 0.8%) analysis of partial digestion by *TatI*. The partial digest of pCyaAC-PF6His with one cut were used by *TatI* 1U (lane 1) and 0.5U/120 ng DNA (Lanes 2). *M* represents λ /*HindIII* digested DNA markers

B) Agarose gel electrophoresis (Ethidium bromide 0.8%) analysis of complete digestion by *AclI*. The purified 7.5-kb products of *TatI* partial digests were used as a template (lane 1), and subsequently digested by *AclI* (Lanes 2). *M* represents λ /*BstEII* digested DNA markers

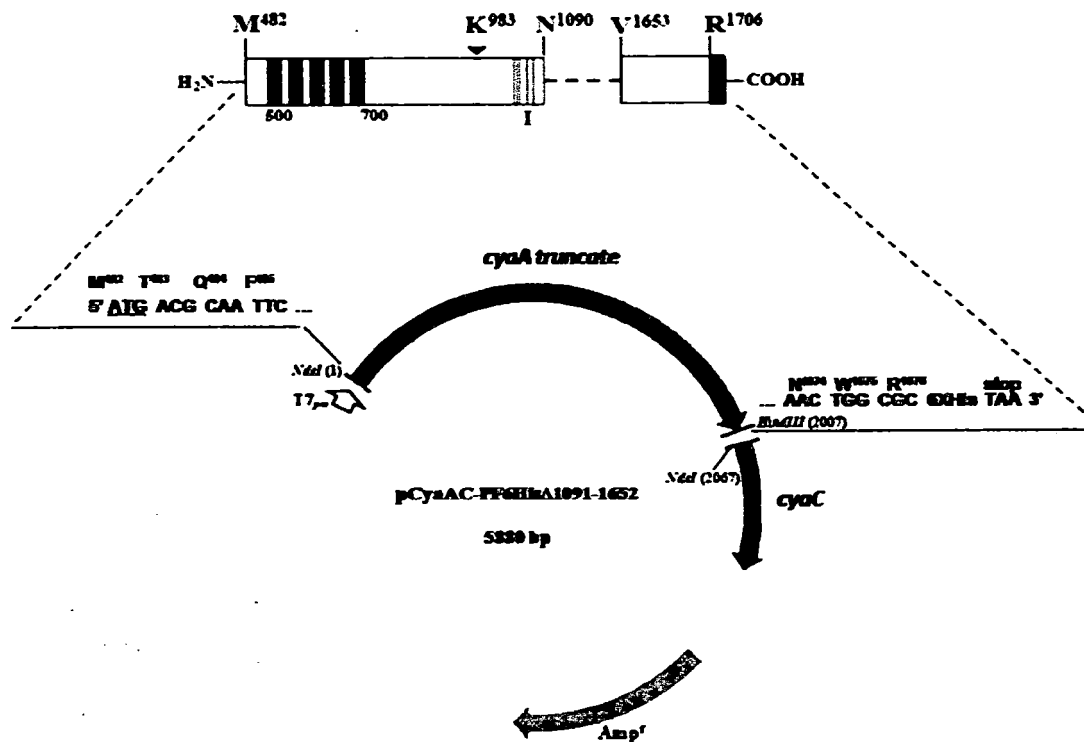


Figure 2. Schematic diagrams of the recombinant plasmids (pCyaAC-PF6HisΔ1091-1652) encoding the CyaA protein fragment.

Transcription of the corresponding genes is under control of the T7 promoter (T7pro) of the pET-17b expression vector (thin line). The arrows indicate the transcriptional direction of the corresponding promoter and genes. The nucleotide and deduced amino acid sequences at the 5'- and 3'-ends of the structural gene segment of *cyaA*-PF6His (2,067 bp) and *cyaC* (558 bp) are shown, respectively, with the underlined nucleotides representing the start codon. Amp^r indicates the ampicillin resistance gene. For clarity, only the restriction endonuclease sites mentioned in the text are shown. The expressing CyaA-PF6His deletion fragment is shown at the top.

Expression of the CyaA truncated toxin

The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS for expression the gene product. The ~70-kDa CyaA fragment with C-terminal 6His tag (calculated molecular mass = 68392.20 Da) was highly produced almost exclusively as a soluble protein compared with the wild type (Fig 3). The 21-kDa CyaC-acyltransferase was also expressed in this condition.

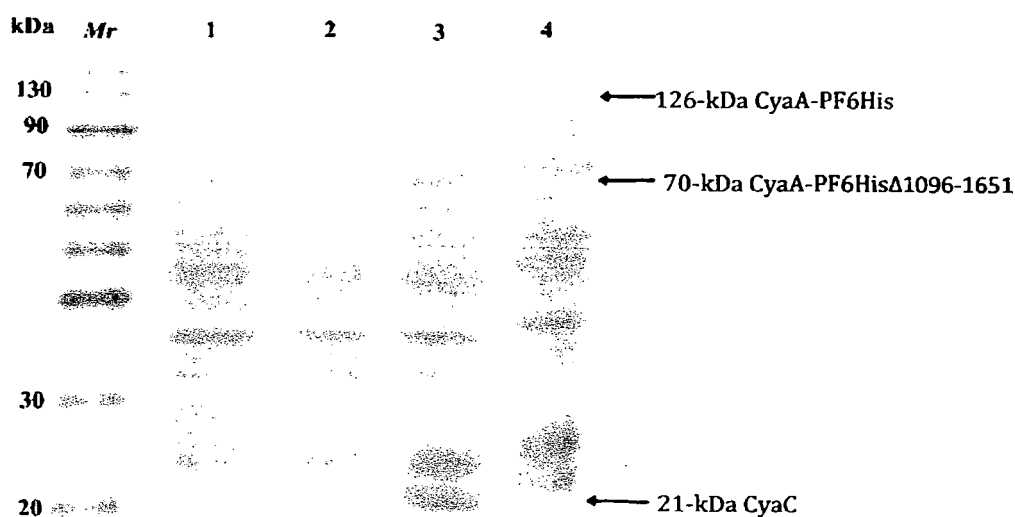


Figure 3. Expressed protein profiles of pCyaAC-PF6His and pCyaAC-PF6HisΔ1091-1652

SDS-PAGE (Coomassie blue-stained 10% gel) of *E. coli* lysates expressing the 126-kDa CyaA-PF protein from pCyaAC-PF6His and the 70-kDa CyaA-PF6His truncate fragment from pCyaAC-PF6HisΔ1091-1652. *Mr* represents standard protein markers. *E. coli* cells harbouring the pET-17b vector were used as a negative control (lane 1). Lanes 2, 3 and 4 are lysates extracted from *E. coli* cells harbouring uninduced, induced pCyaAC-PF6HisΔ1091-1652, and pCyaAC-PF6His, respectively.

In conclusion, this present report provides evidence that the gene segment encoding the hydrophobic region with an acylation site of CyaA toxin was successfully subcloned. The 70-kDa truncated CyaA toxin with 6His-tagged C-terminal end was well highly-expressed as a soluble protein in *E. coli* in order to further study its functionality.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was generously supported by the Thailand Research Fund in cooperation with the Office of the Higher Education Commission (to N.T., MRG5480261)

REFERENCES

- Basar, T. Havlicek, V., Bezouskova, S., Hackett, M., and Sebo P. 2001. Acylation of Lys 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *J Biol Chem* 276(1): 348-354.
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L., and Goodwin, M.S. 1991. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol* 173: 720-726.
- Carbonett, N.H., Artamonava, G.V., Andreassen, C., and Bushar, N. 2005. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin provide a one-two punch for establishment of *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect Immun* 73: 2698-2703.
- Ehrmann, I.E., Weiss, A.A., Goodwin, M.S., Gray, M.C., Barry, E., and Hewlett, E.L. 1992. Enzymatic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* is not required for hemolysis. *FEBS Lett* 304: 51-56.
- Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M., and Guiso, N. 1998. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect Immun* 66: 1718-1725.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Hewlett, E.L. 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* 266: 433-435.
- Knapp, O., Maier, E., Polleichtner, G., Masin, J., Sebo, P., and Benz, R. 2003. Channel formation in model membranes by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: Effect of calcium. *Biochemistry* 42: 8077-8084.
- Ladant, D., and Ullmann, A. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* 7: 172-176.
- Osickova, A., Osicka, R., Maier, E., Benz, R., and Sebo, P. 1999. An amphipathic α -helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J Biol Chem* 274:37644-37650.
- Powthongchin, B., and 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(2): 169-174.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J., and Ladant, D. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* 270: 26370-26376.
- Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P., and Ladant, D. 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* 267: 13598-13602.

Identification of a Specific Receptor-Binding Region in the RTX subdomain of Adenylate cyclase-Hemolysin Toxin for Therapeutic Application of Whooping Cough caused by *Bordetella pertussis*

Niramon Thamwiriyasati¹, Sanita Singnanan¹, Suticha Chunta¹, Chanan Angsuthanasombat²

¹ Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

² Laboratory of Molecular Biophysics and Structural Biochemistry, Bacterial Protein Toxin Research Unit, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakornpathom 73170, Thailand

Abstract

Bordetella pertussis adenylate cyclase-hemolysin toxin (CyaA) represents a unique RTX (Repeat-in-ToXin) pore-forming toxin that can permeabilize the target membrane by forming lytic pores. It has been shown that the repetitive blocks in the CyaA-RTX subdomain supports calcium-bound protein folds into a parallel β -roll structure and interacts with the specific target cells. Data in our results present that the coexpressed recombinant protein, a 100-kDa RTX (A⁷⁵¹-R¹⁷⁰⁶) together with a 21-kDa CyaC-acyltransferase, can bind highly enough to human white blood cells and sheep red blood cells rather than the RTX alone. Further attempts were made to investigate the rtx region for binding the target cells. A mutant RTX lacking the peptide (RTX Δ 1600-1706) is prepared and tested for binding those target cells. Single alanine substitution (D1169A) in the predicted beta roll which is not identical to tandem repeated nonapeptides is compared its activity with the RTX-C wild-type. Identification of a specific receptor-binding region of RTX toxin is still in progress.

Introduction

CyaA is a virulence factor secreted from *Bordetella pertussis*, a causative agent of whooping cough [1]. It is classified into the RTX (Repeat-in-ToXin) family due to its tandem repeated nonapeptides, Gly-Gly-X-Gly-X-Asp-XU-X, which are the putative calcium-binding sites [2].

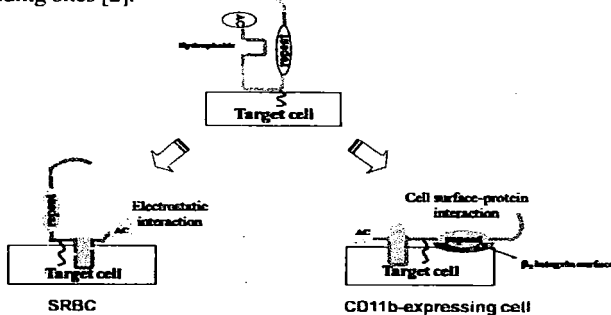


Fig1. The interaction of RTX toxin between the target cells

Objective & Methods

To identify a specific receptor binding region of RTX by eliminating the peptide region Δ 1600-1706 at C-terminal and mutagenesis.

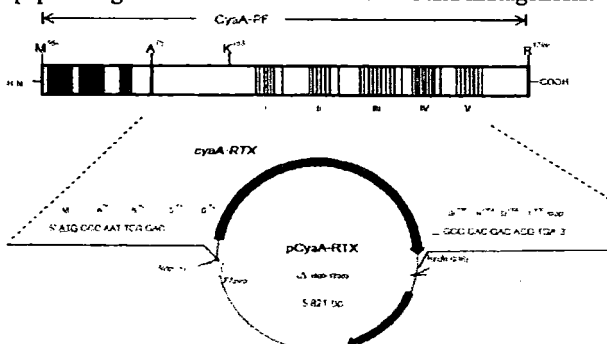


Fig2. The deletion mutant, lacking residues 1600-1706 of RTX, was generated using PCR

Cloning & Expression

Both *cyaA-RTX* and *cyaC* were cloned into the same plasmid vector. The 6.1-kb bands of pCyaA-RTX and 700-bp *cyaC* gene digested with *NdeI* and *BamHI* was verified as shown in Fig3. This recombinant clone was able to express as a 100-kDa soluble RTX toxin and a 21-kDa CyaC enzyme as shown in Fig4.

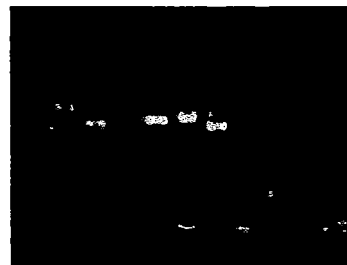


Fig3. Restriction enzyme digestion using *NdeI* and *BamHI* of pRTX, pCyaA-C-PF and pRTX-C, respectively.

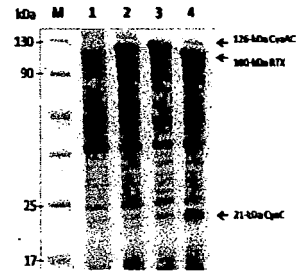


Fig4. Expressed protein profiles of pRTX, pRTX-C and pCyaA-C

Toxin binding to target cells

RTX coexpressed with CyaC, but not RTX alone, could bind either sheep erythrocytes or human white blood cells. The antibody was able to recognize the RTX toxin in the fraction of pellets representing the protein binding with the cells as shown in Fig5.

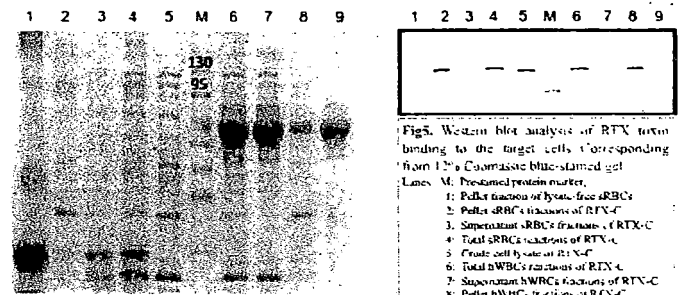


Fig5. Western blot analysis of RTX toxin binding to the target cells corresponding from 12^h Coomassie blue-stained gel. Lanes: M: Prestained protein marker; 1: Pellet fraction of lysate from SRBCs; 2: Pellet SRBCs fractions of RTX-C; 3: Supernatant SRBCs fractions of RTX-C; 4: Total SRBCs fractions of RTX-C; 5: Control cell lysate of R1V-C; 6: Total WBCs fractions of RTX-C; 7: Supernatant WBCs fractions of RTX-C; 8: Pellet WBCs fractions of RTX-C; 9: Pellet fraction of lysate from WBCs

Conclusions and applications

The finding of major determinant in the specific binding of RTX to erythrocytes and white blood cells may suggest a therapeutic application of this peptide in Pertussis infections in which CyaA has a pathogenic role. Moreover, the results in this study can probably be extended to other toxins as well.

Acknowledgement

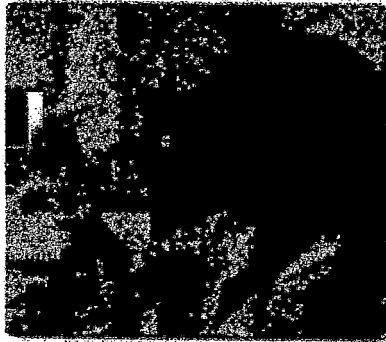


มูลนิธิวิจัยและพัฒนา
The Thailand Research Fund



References

- Barry EM, Weiss AA, Ehrmann IE, Gray MC, Hewlett EL, Goodwin MS (1991) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. J Bacteriol 173:720-726
- Bauche F, Chenal A, Knapp O, Bodenreider C, Berr R, Ja-Vinac A, Ladame D (2006) Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Biol Chem 281:16914-16926



อาจารย์ ดร.นิรมล ธรรมวิจิตรศรี

Niramon Thamwityasati, Ph.D.

กลุ่มวิชาแบคทีเรีย สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

email: niramong@buu.ac.th

โทร 0-3810-3163

โรคไอกรน: ทบทวนวิจัยสู่แนวทางการผลิตวัคซีน

โรคไอกรนเป็นโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ที่มีการระบาดอย่างกว้างขวางในวัยเด็ก และประชากรอายุชรา เป็นเชื้อที่เพาะขึ้นได้ยาก พบเชื้อได้ไม่พบบ่อยในผู้ป่วย ผู้ที่ป่วยมักได้รับการวินิจฉัยจากอาการ ไอ รุนแรงที่ต่อเนื่อง ผู้ที่มีโรคนี้มักไม่มีไข้ร่วมกับอาการอื่น และมักมีโรคก่อนการหาย พบได้บ่อยในเด็ก ส่วนใหญ่ติดเชื้อผ่านทางผู้เลี้ยงดูหรือครอบครัว ซึ่งมีการติดต่อแบบไม่เฉพาะเจาะจง โดยเกิดจากการจามหรือไอของผู้ป่วย ส่วนใหญ่เป็นเด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี และเป็นเด็กที่ไม่เคยได้รับวัคซีนป้องกัน โดยทั่วไปแล้ว โรคนี้เป็นได้ทุกอายุ ถ้าไม่มีภูมิคุ้มกัน แต่ในวัยผู้ใหญ่ หรือผู้ใหญ่อาจไม่มีอาการ ดร. นิรมล กล่าวไว้ว่า ในประเทศไทย อุบัติการณ์ของโรคไอกรนลดลงมาก ซึ่งเป็นผลจากการที่ระดับความครอบคลุมของการได้รับวัคซีนป้องกันมีมากขึ้น โภชนาการที่ดี (GAP) เด็กอายุต่ำกว่า 6 ปี จะได้รับวัคซีนป้องกันโรคไอกรน ซึ่งเป็นวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *B. pertussis* ที่ตายแล้ว อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันประเทศไทยได้ปรับอายุให้ครอบคลุมในเด็กอายุเกิน 5 ปี มากขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเด็กที่ไม่ได้รับวัคซีน พบการระบาดเป็นครั้งคราวในเด็กนักเรียนเป็นระยะ ผลของวัคซีนการป้องกันของโรคไอกรนยังมีจำกัด แม้แต่ในราชวิทยาลัยการแพทย์ป้องกันโรค ดร. นิรมล จึงสนใจจะเตรียมงานวิจัยที่ให้ความเข้าใจเกี่ยวกับส่วนประกอบต่างๆของเชื้อ โดยศึกษาโปรตีนพิษ Adenylate cyclase - hemolysin toxin หรือ CyaA เพื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิต หรือพัฒนาวัคซีน (Acellular vaccine) แทนการใช้เชื้อแบคทีเรียที่ตายแล้ว นอกจากนี้จากการวิจัยและเก็บข้อมูลเชิงภาคในการป้องกันของโรคนี้จากอังกฤษ โดย ดร. นิรมล ที่ทำการโคลนนิ่งและหาส่วนของโปรตีน CyaA และศึกษาเพื่อหาว่าของตำแหน่งโปรตีนพิษที่ควรใช้ในการจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่สร้างภูมิคุ้มกันในร่างกาย ตลอดจนศึกษาโครงสร้างของโปรตีนชนิดนี้เพื่อการผลิตวัคซีนป้องกันโรค เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคต่อไป

สาขาวิชา **ดร.นิรมล ธรรมวิจิตรศรี** สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์
 ชั้นปีที่ 1 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

การนำเสนองานวิจัยที่เสนอ

1. Pajrapotha P, Thamwityasati N, Pongthongchit B, Katzenmoler G, Anguthanasombat C. *Bordetella pertussis* CyaA-RTX subdomain requires calcium ions for structural stability against proteolytic degradation. *Protein Express. Purif.* 2011; 75: 127-132.
2. Thamwityasati N, Singarian S, Chunta S, Anguthanasombat C. Identification of a Specific Receptor-Binding Region in the RTX subdomain of Adenylate cyclase-Hemolysin Toxin. *HEPP CONGRESS I. January 21st - 23rd, 2013.*