GENETIC EXPRESSION OF TAGGING PROTEINS FOR IMMUNOLOGICAL APPLICATION AND BIOLOGICAL STUDIES

YANEENART SUWANWONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006**

ISBN 074-04-7356-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การแสดงออกทางพันธุกรรมของโปรตีนติดตาม เพื่อการประยุกต์ใช้ทางภูมิคุ้มกันวิทยา และการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (GENETIC EXPRESSION OF TAGGING PROTEINS FOR IMMUNOLOGICAL APPLICATONS AND BIOLOGICAL STUDIES)

ญาณีนาถ สุวรรณวงศ์ 4336813 MTMT/D
ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วีระพงศ์ ปรัชชญาสิทธิกุล, Ph.D., ฉัตรเฉลิม อิศรางกูร ณ อยุธยา, ปร.ด., ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช, ปร.ด., พจนีย์ ศรีมาโนชญ์, Ph.D.

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้นำเสนอการผลิตโปรตีนลูกผสมซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับแอนติบอดี และมีความสามารถในการเรืองแสง หรือทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ โดยใช้วิธีการทางพันธุวิศวกรรม ยีนควบคุมการสร้างโปรตีนลูกผสมประกอบด้วยโปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติในการจับจำเพาะกับแอนติบอดี (z-domain) ทางปลายด้าน N หรือ C ของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFPuv)ได้ถูกสร้างขึ้น และแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* โปรตีนลูกผสมทั้งหมด (ZZGFP, GFPZ และ GFPZZ) สามารรถสกัดแยกให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์จับจำเพาะกับอิมมูโนกลอบูลิน จี (IgG) นอกจากนี้ โปรตีนลูกผสมซึ่งมีคุณสมบัติดังกล่าว พร้อมทั้งมีสายเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนฮิสทิดีน (H6GFPZ และ H6GFPZZ)ยังถูกสร้างขึ้นด้วย เพื่อช่วยในการสกัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์จับจำเพาะซึ่งมีโลหะเป็นตัวกลาง และใช้ในการติดยึดโปรตีนเข้ากับพื้นผิวซึ่งมีโลหะเป็นตัวกลาง จากการศึกษาพบว่า โปรตีนลูกผสมที่ประกอบด้วย โปรตีนจับจำเพาะกับแอนติบอดีซึ่งต่อเข้าที่ปลายด้าน N ของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ให้ปริมาณโปรตีนที่ทำหน้าที่อย่างสมบูรณ์ มากกว่าโปรตีนลูกผสมที่ประกอบด้วยโปรตีนจับจำเพาะกับแอนติบอดีซึ่งต่อเข้าที่ปลายด้าน C ของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวถึง 10 เท่า การวิเคราะห์ความสามารถในการจับจำเพาะกับแอนติบอดีของโปรตีนลูกผสมที่สร้างขึ้น โดยใช้หลักการของ surface plasmon resonance พบว่า โปรตีนลูกผสม GFPZ, GFPZZ, H6GFPZ และ H6GFPZZ มีค่าคงที่ในการจับจำเพาะ (K_A) กับ IgG = 6.7, 81.1, 2.4 และ 60.3 ($x10^7 M^{-1}$) ตามลำดับ โปรตีนลูกผสมทั้งหมดได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* และ anti-nuclear antibody ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจับกับแอนติบอดี และการเรืองแสง เทียบเท่ากับการใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนลูกผสมซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่ใช้ในการจับกับแอนติบอดีสองส่วน (GFPZZ และ H6GFPZZ) ให้การเรืองแสงมากกว่าโปรตีนซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่ใช้ในการจับกับแอนติบอดีเพียงส่วนเดียว (GFPZ และ H6GFPZ) ในขณะเดียวกันโปรตีนลูกผสมประกอบด้วยโปรตีนซึ่งจับจำเพาะกับแอนติบอดี และฮีโมโกลบินจากแบคทีเรีย (VHb) ซึ่งสามารถทำหน้าที่แทนเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ถูกสร้างขึ้น โปรตีนลูกผสม ZVHb และ ZZVHb มีค่าคงที่ในการจับจำเพาะ (K_A) กับ IgG = 9.7 และ 49.1 ($x\ 10^7\ M^{-1}$) และทำการวัดค่า peroxidase activity ได้ 3.9 และ 1.5 units/mg ตามลำดับ ซึ่งเมื่อได้ทำการปรับสภาวะในการวัดให้เหมาะสมขึ้นแล้ว พบว่า สามารถตรวจวัดโปรตีนลูกผสมดังกล่าว ได้น้อยที่สุดถึง 250 ng ซึ่งมากกว่าเอนไซม์ horse-radish peroxidase เพียง 5 เท่า

นอกจากนี้ บทบาทของโปรตีนลูกผสมเรืองแสงในทางชีววิทยายังได้ถูกศึกษา โดยใช้โปรตีนลูกผสมซึ่งมีความสามารถในการจับจำเพาะกับโลหะ และเรืองแสงสีเขียว ในการศึกษาผลของโปรตีนจับจำเพาะกับโลหะ ในการเคลื่อนที่ของโลหะภายในเซลล์แบคทีเรีย เซลล์ซึ่งแสดงออกโปรตีนจับจำเพาะต่อโลหะสังกะสีบนผิวเซลล์ ร่วมกับโปรตีนเรืองแสงสีเขียวภายในเซลล์ได้ถูกสร้างขึ้น เซลล์ดังกว่ามีความสามารถในการจับกับโลหะเพิ่มขึ้น 60 เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ความสามารถในการจับกับโลหะนี้มีผลกระทบต่อการนำโลหะเข้าสู่เซลล์ ดังจะเห็นได้จากการลดลงของการเรืองแสงของซึ่งแสดงออกโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ในขณะเดียวกัน การรักษาสมดุลของโลหะภายในเซลล์โดยการแสดงออกโปรตีนลูกผสมซึ่งมีความสามารถในการจับจำเพาะกับโลหะ และเรืองแสงสีเขียว ทำให้เซลล์เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เพิ่มมากขึ้น ผลการศึกษานี้ บ่งบอกถึงบทบาทของการจับกับโลหะของโปรตีนลูกผสม ต่อการการนำเข้าโลหะของเซลล์แบคทีเรีย

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในนำโปรตีนลูกผสมไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ อาทิ การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยา และการศึกษาปรากฏการณ์ในระดับเซลล์ เป็นต้น

143 หน้า ISBN 974-04-7356-3

GENETIC EXPRESSION OF TAGGING PROTEINS FOR IMMUNOLOGICAL APPLICATONS AND BIOLOGICAL STUDIES

YANEENART SUWANWONG 4336813 MTMT/D
Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: VIRAPONG PRACHAYASITTIKUL (Ph.D.),
CHARTCHALERM ISARANKURA NA AYUDHYA (Ph.D.),
SRISURANG TANTIMAVANICH (Ph.D.), POJANEE SRIMANOTE (Ph.D.)

ABSTRACT

This thesis describes engineering of chimeric antibody-binding proteins possessing fluorescent or enzymatic activity as immunotaggers. The chimeric proteins were constructed by genetic in-frame fusion of genes encoding Fc-binding motif (Z-domain) to the green fluorescent protein (GFPuv) or *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb). Five chimeric antibody-binding green fluorescent proteins were constructed by fusion of an Fc-binding motif to either N- or C- terminus of GFPuv. All chimeric proteins (ZZGFP, GFPZ, GFPZZ, H6GFPZ, and H6GFPZZ) were expressed in *E. coli* and were able to purified using IgG-Sepharose column. Two of five carried a hexa-histidine tag at the N-terminus to assist not only protein purification using IMAC but also protein immobilization on the solid support via metal coordination. Chimeric proteins containing GFP at the N-terminus provided 10 times higher yield than chimeric protein containing GFP at the C-terminus. The binding affinity of chimeric proteins toward immobilized IgG was determined by surface plasmon resonance (SPR) analysis resulting in K_A = 6.7, 81.1, 2.4, and 60.3 ($x10^7$ M^{-1}) for GFPZ, GFPZZ, H6GFPZ and H6GFPZZ, respectively. Chimeric antibody-binding green fluorescent proteins were applied in indirect immunofluorescent assay for detection of *Leptospira* antibodies and anti-nuclear antibodies. The results demonstrated a strong fluorescent signal of chimeric proteins comparable to that of the FITC-labeled antibody. Moreover, GFPZZ and H6GFPZZ provided more intense signals than GFPZ and H6GFPZ. In parallel, the chimeric Ab-binding VHbs providing peroxidase-like activity were constructed. The purified ZVHb and ZZVHb exhibited strong IgG-binding capacity up to K_A = 9.7 and 49.1 (x 10^7 M^{-1}) for ZVHb and ZZVHb, respectively. The peroxidase activity of ZVHb and ZZVHb was assayed to be 3.9 and 1.5 units/mg, respectively. More importantly, the detection limit obtained after maximization was at 250 ng, approximately 5-times higher than that of the horse-radish peroxidase.

To gain further understanding of the role of chimeric GFPs in biological systems, the chimeric metal-binding GFP was used as an indicator to study the effect of a metal-binding motif on metal mobility in *E. coli*. Engineered cells co-expressing with a zinc-binding motif on the outer membrane and intracellular His6GFPuv were constucted. The engineered cells displayed 60 fold higher binding capability to zinc ions than those of the control cells. This high affinity was proven to influence the influx of metal ions into the cells in which a decline of fluorescent intensity of GFP could readily be detected. Meanwhile, balancing of metal homeostasis due to the presence of cytoplasmic His6GFP enhanced the fluorescent emission. This implies the significant role of an intracellular chelating effect by chimeric protein on metal intaking of bacterial cells.

All these findings support the high potential of using the chimeric proteins in various kinds of application such as immunodiagnosis and cell event study.

KEY WORDS: CHIMERIC GREEN FLUORESCENT PROTEIN/ ANTIBODY-BINDING PROTEIN/ *VITREOSCILLA* HEMOGLOBIN/ METAL MOBILITY/ FLUORESCENT IMMUNOASSAY
143 P. ISBN 974-04-7356-3