DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE HEMOLYTIC ACTIVITY ASSAY FOR RECOMBINANT PORE-FORMING FRAGMENT OF *Bordetella pertussis* CyaA TOXIN

SUWISA KAEWPHAN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN PHARMACY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงเชิงปริมาณสำหรับโปรตีนสารพิษรีคอมบิแนนท์ CyaA จากเชื้อ *Bordetella pertussis* ส่วนที่ทำหน้าที่สร้างรู (DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE HEMOLYTIC ACTIVITY ASSAY FOR RECOMBINANT PORE-FORMING FRAGMENT OF *Bordetella pertussis* CyaA TOXIN)

สุวิสา แก้วพันธ์ 4836156 PYBC/M

ภ.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จงรักษ์ กิตติวรการ, DOCTEUR du MNHN (BIOLOGIE CELLULAIRE et MOLECULAIRE), วิชัย เอกทักษิณ, M.D. Ph.D., ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), มัลลิกา ชมนาวัง, Ph.D. (MICROBIOLOGY)

บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษรีคอมบิแนนท์ CyaA ส่วนที่ทำหน้าที่สร้างรู จากเชื้อ *Bordetella pertussis* (CyaA-PF) เป็นโปรตีนที่ทอนจากโปรตีน CyaA ที่พบในธรรมชาติ ถูกผลิตขึ้นเพื่อเป็นอุปกรณ์ในการศึกษาฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงของโปรตีนในธรรมชาติ ในการศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อหาปริมาณ CyaA-PF ผ่านการประเมินฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดง การวิเคราะห์ทำโดยนำเม็ดเลือดแดงจากแกะหมายเลข 107 ของสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งแขวนลอยในบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 หน่วย ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มกับ 100 ไมโครลิตรของตัวอย่างสารละลายโปรตีนสกัดหยาบ เวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37°C ในบัฟเฟอร์ RBC [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl และ 2 mM $CaCl_2$] กำหนดให้ 1 หน่วยฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนสารพิษที่ใช้สลายเม็ดเลือดแดงปริมาณ 40% ภายใต้สภาวะควบคุมข้างต้น

ในระหว่างการศึกษาพบว่า ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแกะของ CyaA-PF นั้นไม่คงที่ ภายใต้สภาวะที่ควบคุม โดยเม็ดเลือดแดงจากแกะแต่ละตัวตอบสนองในระดับแตกต่างกัน จากการศึกษาเม็ดเลือดแดงจากแกะ 4 ตัวที่ตอบสนองต่างกันนี้ ไม่สามารถสังเกตความแตกต่างขององค์ประกอบของโปรตีนเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงโดยใช้ SDS-PAGE และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความเปราะของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงและการตอบสนองต่อฤทธิ์สลายเม็ดเลือด ที่สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r_s) เท่ากับ 0.300, ระดับนัยสำคัญ (*p*-value) เท่ากับ 0.683 ดังนั้นองค์ประกอบของโปรตีนเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงหรือความแกร่งของเม็ดเลือดแดงไม่น่าจะเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างในการตอบสนองที่สังเกตเห็น

66 หน้า

DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE HEMOLYTIC ACTIVITY ASSAY FOR RECOMBINANT PORE-FORMING FRAGMENT OF *Bordetella pertussis* CyaA TOXIN

SUWISA KAEWPHAN 4836156 PYBC/M

M.Sc. in Pharm. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISOR : JONGRAK KITTIWORAKARN, DOCTEUR du MNHN (BIOLOGIE CELLULAIRE et MOLECULAIRE), WICHAI EKATAKSIN, M.D. Ph.D., CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), MULLIKA T. CHOMNAWANG, Ph.D. (MICROBIOLOGY)

ABSTRACT

The recombinant pore-forming fragment of *Bordetella pertussis* CyaA (CyaA-PF) is a truncated form of native *Bordetella pertussis* CyaA. The protein was produced as tool to study the hemolytic activity of the native toxin. In this study, a quantitative assay to determine the amount of active CyaA-PF through its hemolytic activity was developed. The assay was performed by incubating 900 µl of 2.0 A_{600} of sheep erythrocyte suspension of sheep #107 obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, with 100 µl of various concentrations of crude protein sample for 2 hours at 37°C, under RBC buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl and 2 mM $CaCl_2$]. One unit hemolytic activity corresponds to the amount of CyaA-PF that causes 40% hemolysis under the defined conditions.

During this study, discrepancy of hemolytic activity of CyaA-PF in sheep erythrocyte was also observed. Under well-controlled conditions, sheep erythrocytes from individual sheep responded variably to the recombinant toxin. Among the erythrocytes from four individual sheep with different responses, no difference in membrane protein composition could be observed by SDS-PAGE. There was also no correlation between erythrocyte membrane fragility and the hemolytic response, correlation coefficient (r_s) 0.300 (*p*-value 0.683). Thus the membrane protein and membrane integrity were possibly not the factors which contributed to the observed discrepancy.

KEY WORDS : QUANTITATIVE ANALYSIS/ HEMOLYTIC ACTIVITY/ *Bordetella pertussis* CyaA/ SHEEP ERYTHROCYTES

66 pp.