

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ หมายเลข MRG4880092
ชื่อโครงการ การศึกษากลุ่มยาที่มีผลยับยั้งโดยตรงต่อเอนไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรสของเชื้อ
 มาเลเรีย
ชื่อนักวิจัย ดร. สุธารทิพย์ เรืองประภาวุฒิ หมวดวิชาชีวเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์
 การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
E-mail address: sutarnthip@hotmail.com
ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

จากการสืบค้นหายีนคาร์โบนิค แอนไฮเดรส (CA) สายยาวของของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (PfCA 2) ในฐานข้อมูลมาเลเรีย โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับเบสของยีน PfCA 2 อยู่บนโครโมโซมที่ 11 เมื่อเพิ่มปริมาณยีนจาก gDNA โดยวิธี PCR พบมีความยาว ~1.25 กิโลเบส และทำการโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิด pTOPO รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีน CA ของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA2) ใน *Escherichia coli* *E. coli* (Top10 strain) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PfCA 2 เหมือนกับในฐานข้อมูล GeneBank มีจำนวนกรดอะมิโน 418 ตัว เอนไซม์ที่สกัดได้จาก recombinant PfCA มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 ± 1 กิโลดัลตันเมื่อนำมาแยกโดยวิธี SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) และสามารถตรวจสอบโปรตีนโดยอาศัย Western blot โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์น้อยแต่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในภาวะที่มี Zn^{2+} และถูกยับยั้งได้โดย acetazolamide เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีน PfCA 2 โดยอาศัยพลาสมิด pET 160/GW/D-TOPO ใน *E. coli* (BL21 strain) แต่พบว่าโปรตีนที่ได้ยังมีปริมาณและความบริสุทธิ์น้อย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการแสดงออกของยีน PfCA 2 ที่เหมาะสมต่อไปเพื่อให้ได้โปรตีนในปริมาณที่มากเพียงพอต่อการนำไปศึกษาหาความสามารถในการทดสอบฤทธิ์ของยาในกลุ่ม aromatic sulfonamides เพื่อใช้เป็นแนวทางในการค้นหาตัวใหม่ในการรักษาโรคมาเลเรียให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด

Keywords : Malaria, *Plasmodium falciparum*, Drug target, Carbonic anhydrase, Acetazolamide

Abstract

Project code : MRG4880092
Project Title : Malarial carbonic anhydrase as drug target
Investigator : Sutarnthip Ruengprapavut, Unit of Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Paholyothin Rd., Patumthani 12000; Thailand.
E-mail address: sutarnthip@hotmail.com
Project Period: 2 years

The full-length of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase (PfCA 2) gene, located on chromosome 11 of *P. falciparum*, was amplified by using PCR from genomic DNA. The PfCA 2 amplified fragment was ~1.25 kb in length and then cloned into pTOPO expression vector in *Escherichia coli* (Top10 strain). The nucleotide sequence of PfCA 2 gene is identical to the nucleotide sequence in the genome of *P. falciparum* in GeneBank database. The single ORF encoded 418 amino acid residues for PfCA 2. The recombinant protein, containing N-terminal hexahistidine tag, in the IPTG-induced *Escherichia coli* supernatant was purified by using Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid agarose-affinity chromatographic column. The enzyme had a molecular mass of $\sim 45 \pm 1$ kDa as assessed by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) and it was also confirmed by Western blot using anti-His antibody. These results suggest that the recombinant enzyme obtained in this study was the full-length of *P. falciparum* carbonic anhydrase (PfCA 2). The recombinant protein preparation was not pure and displayed an active enzyme in the presence of Zn^{2+} . The enzyme activity was inhibited by acetazolamide, a known inhibitor. In order to increase the amounts of recombinant protein, the other expression system was tried, by cloning PfCA 2 gene into pET 160/GW/D-TOPO expression vector in *E. coli* (BL21 strain). However the yield and purity of recombinant protein from the latest system showed the same as former system. Therefore the suitable expression systems for producing higher expression level of recombinant enzyme must be tried further.

Keywords- Malaria, *Plasmodium falciparum*, Drug target, carbonic anhydrase