

Abstract

Project Code : MRG4880107

Project Title : Structure-function relationship study of acyltransferase (CyaC) from *Bordetella pertussis* using cell-free protein synthesis

Investigator : Suang Rungpragayphan, Ph.D., Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

E-mail Address : suang@su.ac.th

Project Period : June 2005 – May 2007

CyaC is an acyltransferase needed for activation of the adenylate cyclase toxin CyaA in *Bordetella pertussis*. Despite the rapidly increasing knowledge about the *B. pertussis*, the exact molecular mechanisms of the acylation and structural-function relationship of the CyaC are largely unknown to date. Our research group is interested in elucidating the structure and function of the CyaC. In this research, we investigated the possibility of expression the CyaC in vitro using a cell-free protein synthesis system called in vitro coupled transcription/ translation. The CyaC protein encoding gene was obtained by PCR amplification of the *B. pertussis* genome, and cloned into a plasmid vector suitable for in vitro coupled transcription/ translation. The constructed plasmid was tested as the DNA template for cell-free protein synthesis and the results showed that CyaC was expressed as soluble protein when there was no DTT present in the in vitro coupled transcription/ translation system. One limitation of applying the cell-free protein synthesis in research is how to detect expressed protein. One of the most sensitive methods is using radioisotope-labeled amino acid. However, it requires special facilities and well trained personnel. To overcome this limitation, we appended a histidine tag to CyaC protein by recombinant DNA technology. However, the histidine tag system did not provide good result. Therefore, we attempted to produce antibody fragments that bind the CyaC using phage display technology. Pre-made antibody-phage display libraries, Tomlinson I and J, were panned and anti-CyaC scFvs with high affinity were obtained. Those anti-CyaC-scFvs are not only useful for CyaC detection, but also for therapeutic use if needed.

Keywords : Cell-free protein synthesis, in vitro coupled transcription/ translation, CyaC, phage display, single-chain variable fragment

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4880107

ชื่อโครงการ : การศึกษาความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างและหน้าที่ของเอ็นไซม์เอซิลทรานสเฟอเรสจากเชื้อก่อโรคไทรนโดยอาศัยกระบวนการชีวสังเคราะห์โปรตีนที่ไม่ใช้เซลล์

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.สรวง รุ่งประกายพรรณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

E-mail Address : suang@su.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : มิถุนายน 2548 – พฤษภาคม 2550

CyaC เป็นเอ็นไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่เติมหมู่เอซิลให้สารพิษ CyaA ในเชื้อก่อโรคไทรน แม้ความรู้และวิทยาการเกี่ยวกับเชื้อไทรนจะก้าวหน้าไปมาก แต่โครงสร้างและกลไกการทำงานของเอ็นไซม์ CyaC นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด กลุ่มวิจัยของเราจึงมีความสนใจศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของเอ็นไซม์ CyaC ในงานวิจัยชิ้นนี้ทางกลุ่มวิจัยได้ศึกษาและทดสอบความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้ระบบการสังเคราะห์โปรตีนในหลอดทดลองโดยไม่ใช้เซลล์ชนิดควบคุมการถอดรหัสและแปลรหัสเพื่อการสังเคราะห์เอ็นไซม์ CyaC โดยเริ่มด้วยการโคลนยีนของ CyaC จากเชื้อไทรนที่แยกได้ในประเทศไทยเข้าสู่พลาสมิดที่เป็นเวกเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนในหลอดทดลอง โดยไม่ใช้เซลล์ชนิดควบคุมการถอดรหัสและแปลรหัส เมื่อนำพลาสมิดที่ได้มาทำการทดสอบพบว่าเราสามารถสังเคราะห์เอ็นไซม์ CyaC ได้ด้วยระบบการสังเคราะห์โปรตีนในหลอดทดลองโดยไม่ใช้เซลล์ชนิดควบคุมการถอดรหัสและแปลรหัส อย่างไรก็ตาม เราพบว่าปริมาณของ DTT ในปฏิกิริยาจะมีผลต่อการละลายของเอ็นไซม์ CyaC ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ข้อจำกัดหนึ่งของการศึกษาการสังเคราะห์โปรตีนในหลอดทดลองโดยไม่ใช้เซลล์คือ ทำอย่างไรจึงจะตรวจสอบโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ วิธีที่มีความไวสูงสุดคือการติดฉลากกรดอะมิโนด้วยสารกัมมันตรังสี อย่างไรก็ตามการใช้สารกัมมันตภาพรังสีต้องอาศัยห้องและเครื่องมือจำเพาะและบุคลากรที่ได้รับการอบรมพิเศษเพื่อป้องกันอันตราย เพื่อแก้ปัญหานี้เราได้ทดสอบการติด histidine-tag เข้ากับเอ็นไซม์ CyaC เพื่อใช้สำหรับการติดตามการสังเคราะห์เอ็นไซม์ CyaC อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบแล้วพบว่าวิธีนี้ไม่ได้ผลที่ดี เราจึงได้ทำการพัฒนาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอ็นไซม์ CyaC ด้วยเทคนิคฟาจดิสเพลย์ โดยทำการคัดเลือกแอนติบอดีจากไลบรารี Tomlinson I และ J ได้แอนติบอดีที่มีสัมพันธภาพสูงต่อเอ็นไซม์ CyaC แอนติบอดีที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาวิจัยเอ็นไซม์ CyaC และสามารถนำไปพัฒนาเพื่อการรักษาโรคไทรนอีกด้วย

คำสำคัญ: Cell-free protein synthesis, in vitro coupled transcription/ translation, CyaC, phage display, single-chain variable fragment