



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาโครงสร้างของโปรติเอสของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก  
(**Structural analysis of two component protease from dengue virus**)

โดย ดร.ศรินทร์ จิมณรงค์

พฤษภาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาโครงสร้างของโปรติเอสของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก

**(Structural analysis of two component protease from dengue virus)**

ดร.ศรินทร์ ฉิมณรงค์

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180197

ชื่อโครงการ : การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก

(Structural analysis of two component protease from dengue virus)

ชื่อนักวิจัย : ดร. ศรีนทร์ นิมนรงค์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

(Dr. Sarin Chimnaronk, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University)

E-mail Address : mbscr@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

การเพิ่มปริมาณของไวรัสไข้เลือดออกสามารถเกิดขึ้นได้โดยอาศัยโปรตีนของโฮสต์เซลล์และไวรัส (NS2B-NS3 protease) โดยโปรตีนชนิดหลังมีบทบาทมากในการตัดโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจำลองตัวของไวรัส ดังนั้นกลไกดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการคัดค้นยาและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพต่อการต้านเชื้อไวรัสชนิดนี้ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาลักษณะโครงสร้างและปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเชิงซ้อน NS2B-NS3 protease เนื่องจากเป็นโปรตีนที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ (integral membrane protein) ซึ่งยากแก่การสังเคราะห์ คือโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จะมีการ folding ไม่ถูกต้อง ปริมาณน้อย และอาจไม่มี activity ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้พัฒนา expression vector ที่สามารถใช้ในการสร้าง integral membrane protein ในเซลล์ *E. coli* รวมถึงศึกษาลักษณะโครงสร้างและปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน NS2B-NS3 protease ที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ เบื้องต้นได้ทำการโคลนยีนมิสติก (Mistic), GS-linker, octahistidine และ thrombin cleavage site เข้าไปในบริเวณ multiple cloning site 1 (MCS1) ของ pETDuet<sup>™</sup>-1 vector โดยเวกเตอร์นี้มีชื่อว่า "pMHTD" จากนั้นจึงได้ทำการโคลนยีน NS2B-NS3 protease (wild type) เข้าไปใน MCS1 ของเวกเตอร์ชนิดนี้ ต่อมา NS2B-NS3 protease, A1E และ S135A ได้ถูกสร้างขึ้นโดยใช้เทคนิค site-directed mutagenesis การสังเคราะห์โปรตีนเชิงซ้อนพบว่าโปรตีน Mistic สามารถช่วยให้โปรตีนที่มีปริมาณมากอย่างเห็นได้ชัด จากนั้นโปรตีนถูกสกัดออกจากเยื่อหุ้มเซลล์โดยทดสอบกับ detergent หลากหลายชนิด และพบว่า Fos-choline-14 เป็น detergent ที่ดีที่สุด Mistic และโปรตีนเอสเชิงซ้อนถูกแยกออกจากกันอย่างง่ายดายโดยใช้ thrombin ตามด้วยการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Nickel affinity chromatography จาก SDS-PAGE ของ wild type และ A1E พบว่ามี band ของโปรตีนที่เด่นชัดเกิดขึ้นหลาย band แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งคู่ออกมาในหลายรูปแบบ โปรตีนเอสเชิงซ้อนนี้สามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นโดยใช้วิธี anion exchange ตามด้วย size exclusion chromatography การศึกษาลักษณะการ folding ของโปรตีนสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค circular dichroism พบว่าโปรตีนที่ทำการสร้างขึ้นนี้มีการ folding และรูปร่างส่วนใหญ่เป็น  $\alpha$ -helix และจากฐานข้อมูลที่บ่งชี้ว่า NS3 protease มีลักษณะรูปร่างส่วนใหญ่เป็น  $\beta$ -sheet ทำให้เราสามารถสันนิษฐานได้ว่า NS2B มีรูปร่างเป็น  $\alpha$ -helix เสียส่วนใหญ่ ที่น่าสนใจไปกว่านั้นจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี gel filtration ยังพบว่าโปรตีนเอสเชิงซ้อนนี้สามารถทำงานได้โดยการจัดรูปร่างเป็น trimer (trimerization) อีกด้วย จากงานวิจัยข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า pMHTD expression vector ที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการสังเคราะห์ NS2B-NS3 protease ได้จริงและมีปริมาณมาก อีกทั้งยังพบว่าโปรตีนเอสเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ขึ้นนี้มีการ folding ที่ถูกต้องและสามารถทำงานได้ รวมถึงข้อมูลที่น่าสนใจว่าโปรตีนชนิดนี้สามารถทำงานได้เมื่อประกอบกันเป็น trimer การพิสูจน์ข้อเท็จจริงเกี่ยวกับข้อสันนิษฐานเหล่านี้สามารถทำได้โดยศึกษาโครงสร้างของโปรตีนในเชิงลึกด้วยวิธีที่เรียกว่า X-ray crystallography ซึ่งผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะศึกษาและดำเนินการต่อไปในอนาคต

คำหลัก : โปรตีนเอสเชิงซ้อน (NS2B-NS3 protease), โปรตีนที่แทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์, pMHTD expression vector

## ABSTRACT

The maturation of the dengue virus (DV) in host cells requires both host cellular and viral proteases for the specific post-translational processing of the viral polyprotein. Of interest, a unique dengue NS2B-NS3 protease complex is responsible for the processing of several viral nonstructural proteins in the cytoplasmic region, and therefore, this protease complex has been considered as the primary target for the development of the antiviral drug or the vaccine. Unfortunately, the atomic structure and details of the reciprocal interaction of NS2B-NS3 complex are currently not available. This is ascribed to the fact that NS2B is a membrane-integral protein, and proved to be very difficult to be expressed and purified, giving an extremely low yield. In addition, the expressed recombinant often shows the misfolding property and does not possess the activity. In this study, we have developed a new vector for the expression of the membrane protein in *E. coli* cells, and for the first time, reported the successful overexpression of dengue NS2B-NS3 protease complex in *E. coli* membrane. The new constructed vector was designated as "pMHTD" vector derived by the insertion of the *Mistic* tag fused with two GS-linkers, an octahistidine tag, and a thrombin cleavage site into the multiple cloning site 1 (MCS1) of the pETDuet™-1 vector (Novagen). Three different constructs: the wild-type, A1E, and S135A proteases were cloned into the pMHTD vector. The results show an unbiased advantage of the *Mistic* tag in the overexpression of the membrane protein in *E. coli* cells. We further successfully extracted NS2B-NS3 protease from the membrane using a Fos-Choline-14 detergent, and purified the protein to homogeneity by combining the thrombin protease treatment, the nickel-affinity column, the anion exchange chromatography, and the gel filtration. The purified wild-type protease complex showed strong proteolytic activity which was absent in the S135A mutant. Moreover, the circular dichroism (CD) spectrum revealed the folding of the dengue protease complex in the membrane-like environment and suggested that NS2B is a  $\alpha$ -helical membrane protein. Unexpectedly, the gel filtration analysis implied that dengue NS2B-NS3 forms a trimeric structure in the membrane. Taken together, our developed pMHTD vector is a powerful tool for the study of the membrane protein, and we shows, for the first time, the overexpression, purification, and the oligomerization of the dengue NS2B-NS3 protease complex in the membrane environment, which is a good start point for the structural analysis using the x-ray crystallography in the near future.

**Keywords:** dengue NS2B-NS3 protease, membrane protein, pMHTD expression vector

## การศึกษาโครงสร้างของโปรติเอสของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก (Structural analysis of two component protease from dengue virus)

กระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้เลือดออกสามารถเกิดขึ้นได้โดยอาศัยกระบวนการ (processing) ของโปรติเอสของเซลล์เจ้าบ้านและตัวไวรัสเองในการตัดสาย polypeptide ของไวรัสไข้เลือดออกเป็นโปรตีนชนิดต่างๆ ซึ่งถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ โปรตีนโครงสร้าง (C, prM และ E) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และ NS5) โดยโปรตีนทั้งสองกลุ่มต่างมีบทบาทในการประกอบตัวเป็นไวรัสตัวใหม่ โปรติเอสของไวรัสไข้เลือดออก (NS2B–NS3 protease) มีบทบาทอย่างมากในการช่วยให้กลุ่มของโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างสามารถทำหน้าที่ (function) ได้ โดยการทำงานของโปรติเอสตัวนี้เริ่มขึ้นเมื่อโปรติเอสเชิงซ้อนตัดตัวเองก่อน จากนั้นจึงสามารถที่จะตัดโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างตัวอื่นต่อไป โปรตีนเหล่านี้ภายหลังจากที่โดนตัดแล้วจะมีหน้าที่ในการจำลองตัวของ genome ของไวรัสไข้เลือดออกซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอสายสายบวก (สายเดี่ยว) ที่มี 5'-CAP แต่ไม่มี poly A tail ที่ปลายด้าน 3' ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับโปรติเอสเชิงซ้อนนี้มากมาย เนื่องจากโปรติเอสเชิงซ้อนนี้เป็นเป้าหมายในการคิดค้นยาและวัคซีนสำหรับรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก แต่ทั้งหมดนั้นเป็นการศึกษาโดยการสร้างโปรตีนที่ผิดธรรมชาติขึ้นมาโดยใช้ส่วน hydrophilic region ของ NS2B ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 40 ตัวเชื่อมต่อกับ linker และ NS3 protease ซึ่งยังไม่มีใครเคยศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน NS2B ที่เป็น full-length กับ NS3 protease ทั้งคู่ที่แทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์มาก่อน ทั้งนี้เนื่องจากการจะศึกษา NS2B ซึ่งประพติตัวเป็น integral membrane protein นั้นยากแก่การสังเคราะห์ เพราะปัญหาที่ว่า membrane protein นั้นต้องการ signal peptide ที่จำเพาะในแต่ละเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีนชนิดนี้ซึ่งเป็น eukaryotic protein ในแบคทีเรีย *E. coli* อาจทำให้โปรตีนมีการ folding ที่ผิดเพี้ยนไป (misfolding) หรืออาจไม่มีการ folding ซึ่งทำให้ถูกย่อยสลายไป (degradation) โดยกลไกของเซลล์ ทำให้ได้โปรตีนที่มีปริมาณน้อยหรือบางครั้งโปรตีนที่สังเคราะห์ได้อาจมีปริมาณที่มากแต่ก็ส่งผลกระทบต่อเซลล์ คือทำให้เซลล์ตายได้ การแก้ปัญหาในในปัจจุบันอาจทำได้โดยใช้ vector ที่เป็น low copy number ทำให้มีการสร้างโปรตีนในปริมาณน้อย แต่เลือกที่จะขยายปริมาณของเซลล์ให้มากขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงการตายของเซลล์ในกรณีที่โปรตีนนั้นเป็นพิษ บางครั้งโปรตีนอาจถูกสร้างขึ้นในส่วนที่เป็น inclusion body ที่มีการ folding ผิดเพี้ยน และนักวิทยาศาสตร์หลายคนเลือกที่จะใช้การ denature โปรตีน แล้วตามด้วยการ refolding เข้ามาช่วยแต่การทำเช่นนี้ก็กลับประสบความสำเร็จน้อยมาก ปัญหาดังกล่าวจึงยังคงเป็นปัญหาที่พบอยู่จนทุกวันนี้

### วัตถุประสงค์การวิจัย

1. พัฒนา expression vector ที่สามารถแก้ปัญหา protein misfolding, โปรตีนมีปริมาณน้อย และโปรตีนไม่สามารถทำงานได้ สำหรับผลิตโปรติเอสเชิงซ้อน NS2B–NS3 protease ที่แทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ในระบบของ *E. coli*
2. เพื่อผลิตโปรติเอสเชิงซ้อน [NS2B (full-length)–NS3 protease] ที่แทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์
3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมแก่การสกัดโปรตีนออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ และหาวิธีในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์
4. เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของโปรติเอสเชิงซ้อนที่ผลิตขึ้นในเยื่อหุ้มเซลล์

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

ผู้ทำวิจัยได้ทดลองโคลนยีน NS2B–NS3 protease (NS2B–NS3pro) เข้าไปใน pET-28a(+) ซึ่งเป็น vector ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนกันอย่างแพร่หลาย และทำการผลิตโปรติเอสเชิงซ้อนออกมาโดยอาศัย *E. coli* ซึ่งผลที่ได้พบว่าโปรตีนมี

ปริมาณน้อยมาก และไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนา expression vector ที่สามารถใช้ในการผลิต integral membrane protein ได้ขึ้นมา ดังนี้

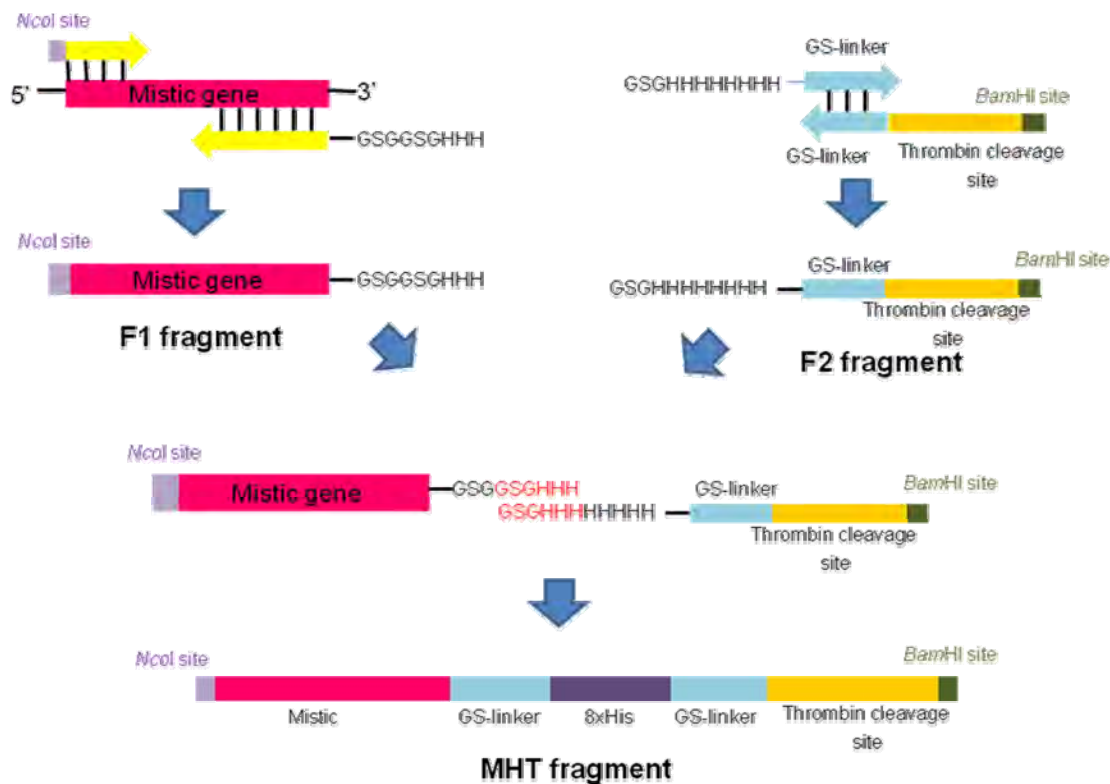
#### การสร้าง expression vector สำหรับผลิตโปรติเอสเชิงซ้อน NS2B–NS3 protease

เนื่องจากโปรติเอสเชิงซ้อนชนิดนี้ประพติตัวเป็น integral membrane protein ซึ่งคุณลักษณะเฉพาะของโปรตีนชนิดนี้ต้องการ signal peptide ที่สามารถจับกันอย่างจำเพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งในที่นี้คือ *E. coli* ซึ่งจะมีผลกับลักษณะการ folding และการทำงานของโปรตีน เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวผู้ทำวิจัยจึงเลือกใช้ Mistic ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็ก (13 kDa) ที่ได้มาจาก *Bacillus subtilis* และมีคุณสมบัติที่สามารถพาโปรตีนที่เราสนใจให้เข้าไปแทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ได้แม้ปราศจาก signal peptide อีกทั้งโปรตีนชนิดนี้ยังมี stability สูงอีกด้วย นอกจากนี้ผู้ทำวิจัยยังได้ผสมผสานชิ้นส่วนของยีนอื่นเข้าไปเพื่อให้สะดวกแก่การแยก Mistic ออกจาก NS2B–NS3 protease และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

เริ่มแรกยีน Mistic ถูกเพิ่มปริมาณโดยอาศัย primer ที่มีความจำเพาะและมีชิ้นส่วนของ *NcoI* restriction site กับ GS-linker บริเวณปลาย 5' เราจะเรียกชิ้นส่วน (fragment) ของยีนนี้ว่า “F1” ต่อมา fragment ที่ 2 ได้ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นโดยอาศัยส่วนของ GS-linker complementary sequence ของยีน 2 fragment ที่มีความจำเพาะซึ่งกันและกัน เราจะเรียกส่วนของ fragment นี้ว่า “F2” (รายละเอียดของ primer ที่ใช้แสดงอยู่ในตารางที่ 1) ท้ายที่สุด F1 และ F2 ถูกนำมาเชื่อมต่อกันและเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นโดยอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า PCR ligation fragment สุดท้ายนี้ถูกเรียกว่า “MHT” ซึ่งประกอบไปด้วย *NcoI* และ *BamHI* restriction site, Mistic, GS-linker, octahistidine (His<sub>6</sub>), GS-linker และ thrombin cleavage site (รูปที่ 1) จากนั้น fragment MHT ได้ถูกโคลนเข้าไปที่บริเวณ multiple cloning site 1 (MSC1) ของเวกเตอร์ pETDuet™-1 โดยอาศัยเอนไซม์ *NcoI* และ *BamHI* เราเรียก recombinant plasmid ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้ว่า “pMHTD expression vector”

ตารางที่ 1 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ fragment F1 และ F2 (ตำแหน่งของ restriction site และ overlapping sequence แสดงเป็นตัวอักษรตัวหนาและตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้)

| Primer   | Sequence (5' to 3')                                         | Length (bp) |
|----------|-------------------------------------------------------------|-------------|
| MistFw   | CATG <b>ACCATGGG</b> CTTTTGTACATTTTTTGAAAAACATC             | 38          |
| MistRV1R | <u>GGTGATGATGTCCAGAACCTCCAGAGCCTTCTTTTTCTCCTTCTTCAGATAC</u> | 52          |
| MistRV2F | <u>GGTTCTGGACATCATCACCATCATCATCACCGGTTCTAGCGGATTAG</u>      | 49          |
| MistRV3R | TGAC <b>GGATCCT</b> GGCTAGATCCGCGTGGCACTAATCCGCTAGAACCGTGG  | 49          |



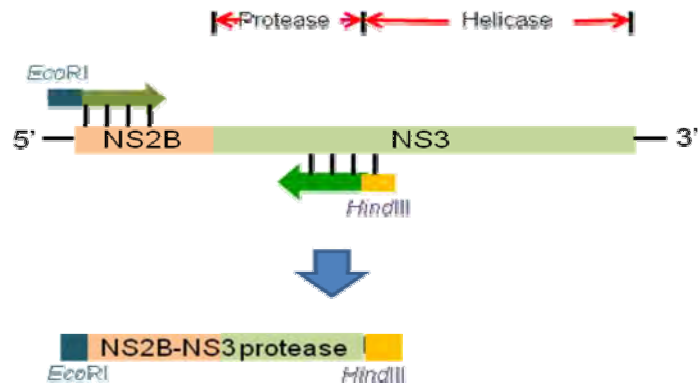
รูปที่ 1 การเพิ่มปริมาณ fragment F1, F2 และ MHT

#### การเพิ่มปริมาณโปรตีนเชิงซ้อน NS2B–NS3 protease

ยีน NS2B–NS3pro (wild type) ถูกเพิ่มปริมาณโดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะและมีชิ้นส่วนของ *EcoRI* และ *HindIII* restriction site (รูปที่ 2 และตารางที่ 2) จากนั้นยีนนี้ถูกโคลนเข้าไปที่ MCS1 ของ pMHTD expression vector และ transform เข้าสู่ JM109 competent cell ซึ่งแต่ละโคลนจะถูกคัดแยกโดยอาศัย double restriction digestion ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ท้ายที่สุดโคลนที่ผ่านการคัดเลือกถูกยืนยันผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย DNA sequencing แบบอัตโนมัติ

ตารางที่ 2 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน NS2B–NS3 protease (wild type) (ตำแหน่งของ restriction site และ overlapping sequence แสดงเป็นตัวอักษรตัวหนา)

| Primer   | Sequence (5' to 3')                          | Length (bp) |
|----------|----------------------------------------------|-------------|
| NS2B3PFW | GATC <b>GAATTC</b> GTGGCCATTAAATGAGGCTATCATG | 35          |
| NS2B3PRV | ATCG <b>AAGCTT</b> ATCGGAAAATGTCATCTTCGATCTC | 35          |



รูปที่ 2 การเพิ่มปริมาณยีน NS2B-NS3pro (wild type)

### การสร้างโปรติเอสเชิงซ้อน NS2B-NS3 protease (A1E และ S135A)

หลังจากที่ได้สร้าง NS2B-NS3 protease (wild type) ขึ้นมา mutant อีกสองตัว (A1E และ S135A) ได้ถูกสร้างขึ้นโดยใช้เทคนิค site-directed mutagenesis ซึ่ง primer ที่ใช้จะมีบริเวณที่ overlap กันและจำเพาะกับชิ้นส่วนที่จะ mutate หลังจากทำการสร้างและเพิ่มปริมาณของ mutant plasmid แล้วนั้นต่อไป plasmid เหล่านี้ได้ถูก transform เข้าสู่ JM109 competent cell และยืนยันผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย DNA sequencing

ตารางที่ 3 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการสร้าง NS2B-NS3 protease (A1E และ S135A) (ตำแหน่งของ overlapping sequence แสดงเป็นตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้)

| Primer    | Sequence (5' to 3')              | Length (bp) |
|-----------|----------------------------------|-------------|
| NS3PA1EFW | <u>GAAACAACGGGAAGGAGTATTGTGG</u> | 25          |
| NS3PA1ERV | <u>CAATACTCCTTCCCGTTGTTTCTTC</u> | 25          |

### การสังเคราะห์โปรติเอสเชิงซ้อน NS2B-NS3 protease

#### 1. การหาสภาวะที่เหมาะสมแก่การผลิตโปรตีน

หลังจากได้โคลนของ NS2B-NS3 protease (wild type, A1E และ S135A) แล้วขั้นตอนต่อไปคือการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอันดับแรกคือ สภาวะที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน, ความเข้มข้นของ IPTG, อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ ซึ่งตัวแปรเหล่านี้ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก, ชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน และกลุ่มที่สอง, ความเข้มข้นของ IPTG, อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ การศึกษาดังกล่าวมักทำในระดับเล็ก (small scale) เพื่อไม่เป็นการสิ้นเปลืองสาร การศึกษาว่าเซลล์เจ้าบ้านชนิดใดที่เหมาะสม pMHTD-NS2B-NS3pro (wild type) ถูก transform เข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ BL21 (DE3), C41 (DE3) และ C43 (DE3) จากนั้นเซลล์ถูกเลี้ยงให้เป็นเซลล์เริ่มต้นที่จะใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี ampicillin 100 µg/ml และ 1% กลูโคส ต่อมาเซลล์ถูกนำมาใช้ในการสร้าง

โปรตีนโดยนำ 1% ของเซลล์เริ่มต้นมาเลี้ยงในอาหารลักษณะเช่นเดียวกับเบื่องต้นและเลี้ยงจนกระทั่ง  $OD_{600} = 0.6$  การกระตุ้นเซลล์ทำโดยเติม IPTG 200  $\mu M$  และเลี้ยงต่อที่ 25°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เซลล์ถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ โปรตีนทั้งหมด (total protein fraction) และส่วนที่จะนำไป sonicate เซลล์ทั้งสองส่วนถูกเก็บโดยปั่นเหวี่ยงที่ 6000 g, 37°C เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนเซลล์ที่ได้ถูกละลายด้วย lysis buffer จากนั้นนำส่วนที่แบ่งไว้สำหรับ sonicate มาทำการ sonicate แล้วปั่นแยกโปรตีนที่ความเร็วสูงด้วย ultracentrifugation ที่ 100,000 g, 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการกระทำดังกล่าวทำให้ได้โปรตีน 2 ส่วน คือ soluble และ insoluble protein สุดท้ายผลของการสังเคราะห์โปรตีนสามารถทำได้โดยการนำ total, soluble และ insoluble protein มาวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE

การศึกษาผลของความเข้มข้นของ IPTG, อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นของ IPTG เป็น 10, 200 และ 500  $\mu M$  สำหรับเวลาที่ใช้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิซึ่งอุณหภูมิที่ใช้มีดังนี้ 18 °C, 25°C และ 37°C ทั้งนี้เวลาที่ใช้จะเป็นข้ามคืน, 6 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ

## 2. การสังเคราะห์โปรตีน NS2B-NS3 protease

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมแก่การสังเคราะห์โปรตีนแล้ว การผลิต NS2B-NS3 protease (wild type, A1E และ S135A) สามารถทำได้จากการใช้ BL21(DE3)+pRARE2 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน รวมถึงการกระตุ้นเซลล์โดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 100  $\mu M$  และการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ 25 °C ท้ายที่สุดผลของการผลิตโปรตีนสามารถวิเคราะห์ได้ด้วย 12% SDS-PAGE

### การยืนยันผลของการสังเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี western blot

เราสามารถยืนยันผลของโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ว่าเป็นโปรตีนที่เราต้องการหรือไม่โดยใช้เทคนิค western blot ในที่นี้แอนติบอดีที่ใช้ คือ แอนติบอดีที่จำเพาะกับ His tag และ NS3 หลังจากการทำ 12 % SDS-PAGE แล้วเจลจะถูก blot กับ membrane ที่ 20 โวลต์ 75 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแผ่น membrane ถูก block ด้วย 5% skim milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย 1XPBS+Tween 2-3 รอบๆละ 5 นาที เมื่อล้างแผ่น membrane สะอาดแล้วแอนติบอดีตัวแรกที่จำเพาะกับ His tag หรือ NS3 จะถูกเติม และผสมเข้าด้วยกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น membrane ด้วย 1XPBS+Tween อีก 2-3 รอบ ตามด้วยเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่จำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรกแล้วทิ้งไว้อีก 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น membrane ด้วย 1XPBS+Tween อีก 2-3 รอบ สุดท้ายเราสามารถวิเคราะห์ผลได้ด้วยการเติมซับสเตรตลงไปใน membrane รอจนเห็น band ของโปรตีน แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่แผ่น membrane ลงในน้ำ deionized ปริมาณมากๆ

### การสกัด membrane protein ออกจากเยื่อหุ้มเซลล์

การใช้ Mistic ช่วยทำให้ NS2B-NS3 protease สามารถแทรกตัวเข้าไปอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งปกติแล้วการศึกษาในขั้นตอนต่างๆจะทำได้เมื่อโปรตีนอยู่ในสารละลายเท่านั้น ดังนั้นการสกัดโปรตีนออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย detergent จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจาก membrane protein แต่ละชนิดไม่สามารถสกัดได้ด้วย detergent ชนิดเดียวกัน การหา detergent ที่เหมาะสมแก่โปรตีนชนิดนั้นๆ ทำได้โดยการเติม detergent ความเข้มข้น 1-2 % (สำหรับการทดลองนี้ได้ใช้ detergent 17 ชนิด ดังตารางที่ 4) ลงในสารละลายโปรตีนส่วนที่เป็น insoluble ผสมให้เข้ากันที่ 4 °C ข้ามคืน โปรตีนแต่ละส่วนถูกทำให้แยกออกจากกันด้วยเทคนิค ultracentrifugation ที่ 100,000g, 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้ 12% SDS-PAGE และ western blot

#### การขจัด MHT protein ออกจาก NS2B–NS3 protease

จากการออกแบบลักษณะของ pMHTD-NS2B-NS3pro ที่ได้ใส่ส่วนของ thrombin cleavage site แทรกลงไประหว่าง Mystic และ NS2B–NS3pro ทำให้ภายหลังจากที่โปรตีนถูกสร้างขึ้นแล้วสามารถแยกออกจากกันได้ด้วย thrombin protease เบื้องต้นการทดลองเพื่อหาปริมาณของ thrombin ที่เหมาะสมกับโปรตีนถูกทำขึ้นโดยการเติม thrombin (1, 3, 5, 7 และ 10 ยูนิต) ลงในโปรตีนที่มีปริมาณเท่ากับ 100 ไมโครกรัม แล้วผสมให้เข้ากันที่ 4 °C ข้ามคืน ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลได้โดยใช้ 12% SDS-PAGE และ western blot

ตารางที่ 4 รายละเอียดของ detergent ที่ใช้ในการสกัด NS2B–NS3 protease

|    | Detergent                       | Type       | Concentration | CMC     |
|----|---------------------------------|------------|---------------|---------|
| 1  | Triton X-100                    | non-ionic  | 1%            | 0.0150% |
| 2  | Tween 20                        | non-ionic  | 1%            | 0.0072% |
| 3  | Tergitol NP-10                  | non-ionic  | 1%            | 0.0040% |
| 4  | LDAO                            | non-ionic  | 1%            | 0.0230% |
| 5  | n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside | non-ionic  | 1%            | 0.0087% |
| 6  | n-Decyl- $\beta$ -D-maltoside   | non-ionic  | 1%            | 0.0870% |
| 7  | n-Undecyl- $\beta$ -D-maltoside | non-ionic  | 1%            | 0.0290% |
| 8  | n-Octyl- $\beta$ -D-glucoside   | non-ionic  | 2%            | 0.5300% |
| 9  | n-Nonyl- $\beta$ -D-glucoside   | non-ionic  | 2%            | 0.2000% |
| 10 | Sucrose monolaurate             | non-ionic  | 1%            | 0.0100% |
| 11 | C12E8                           | non-ionic  | 1%            | 0.0059% |
| 12 | CTAB                            | cationic   | 1%            | 0.0360% |
| 13 | Sodium cholate                  | anionic    | 2%            | 0.4100% |
| 14 | CHAPS                           | zwitterion | 2%            | 0.4900% |
| 15 | Fos-choline-10                  | zwitterion | 1%            | 0.3500% |
| 16 | Fos-choline-12                  | zwitterion | 1%            | 0.0470% |
| 17 | Fos-choline-14                  | zwitterion | 1%            | 0.0051% |
| 18 | MilliQ water                    | -          | -             | -       |

## การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในงานวิจัยชิ้นนี้ประกอบด้วย 3 วิธี คือ Nickel ion affinity, Anion exchange และ Size exclusion chromatography ซึ่งแต่ละวิธีถูกนำมาใช้ร่วมกัน เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงสุด โดยแต่ละขั้นตอนมีวิธีการดังนี้

### 1. Nickel ion affinity chromatography

โปรตีนทั้งก่อนและหลังการขจัด MHT ออกจาก NS2B-NS3pro ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้เพื่อดึงเอาโปรตีนที่ไม่มี His-tag ออก เริ่มแรก Hi-Trap<sup>®</sup> หรือ His-Trap<sup>®</sup> column ถูกล้างด้วย washed buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 25 mM imidazole, 10% glycerol and 0.25% w/v Fos-choline-14) ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ จากนั้นจะเติมโปรตีนลงในคอลัมน์ โปรตีนที่ไหลผ่านคอลัมน์ออกมา เราจะเรียกว่า flow through fraction ต่อมา washed buffer 20 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ถูกเติมลงในคอลัมน์เพื่อล้างโปรตีนและสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ต้องการออก เราเรียก fraction นี้ว่า washed fraction โปรตีนที่จับอยู่กับ nickel ion ในคอลัมน์สามารถถูกชะออกมาได้ด้วย elution fraction (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 250 mM imidazole, 10% glycerol and 0.25% w/v Fos-choline-14) 5 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ เราเรียก fraction นี้ว่า elution fraction ท้ายที่สุดคอลัมน์จะถูกล้างเพื่อนำสิ่งที่ยังคงติดค้างอยู่ด้วย elution buffer อีก 2 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ ซึ่งผลของการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยใช้ 12% SDS-PAGE

### 2. Size exclusion chromatography

หลังจากที่ NS2B-NS3pro ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel ion affinity chromatography แล้วโปรตีนจะถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นด้วยเทคนิค size exclusion chromatography โดยผู้วิจัยเลือกใช้ Superdex 200 HR 10/30 gel filtration column (24 ml column volume) ก่อนที่โปรตีนจะถูกเติมลงไป คอลัมน์ถูกล้างด้วย gel filtration buffer (25 mM HEPES pH 7.6, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT and 0.1% Fos-choline-14) 2 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ NS2B-NS3pro และโปรตีนอื่นที่ปลอมปนอยู่สามารถถูกชะออกมาตามขนาดของแต่ละโมเลกุลด้วย gel filtration buffer (โมเลกุลใหญ่ถูกชะออกมาก่อนโมเลกุลขนาดเล็ก) ซึ่งผลของการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยใช้ 12% SDS-PAGE สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้สามารถบอกเราถึงขนาดของโปรตีนที่สนใจได้เมื่อใช้ standard protein ที่รู้ขนาดที่แน่นอนมาแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ buffer ชนิดเดียวกันกับตัวอย่าง

### 3. Anion exchange chromatography

งานวิจัยชิ้นนี้เลือกใช้ RESOURCE<sup>™</sup> Q column ซึ่งเป็นคอลัมน์สำหรับการทำ anion exchange เริ่มแรกคอลัมน์ถูกล้างด้วย buffer B (25 mM HEPES pH 7.0, 1 M NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT and 0.1% Fos-choline-14) 20 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ โปรตีนถูกเติมลงในคอลัมน์และถูกชะออกมาตามความเข้มข้นของเกลือที่เกิดจากการผสมกัน (gradient) ของ buffer A (25 mM HEPES pH 7.0, 25 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT and 0.1% Fos-choline-14) และ B ซึ่งผลของการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยใช้ 12% SDS-PAGE

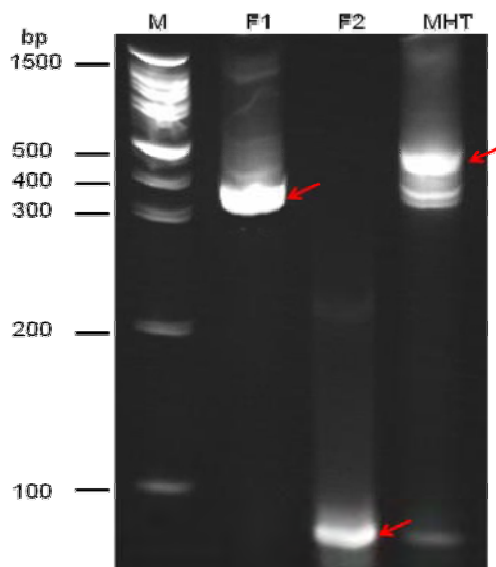
## การหาโครงสร้างทุติยภูมิของ NS2B-NS3 protease โดยใช้เทคนิค circular dichroism (CD)

NS2B-NS3pro ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วสามารถนำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างทุติยภูมิได้โดยใช้เทคนิค circular dichroism (CD) เริ่มแรกโปรตีนถูกปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.5 mg/ml และใส่ลงใน cuvette เฉพาะที่ใช้สำหรับเครื่องที่ใช้ทำ CD ปริมาตร 25  $\mu$ l แล้ววัดการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น (UV) 190 และ 250 นาโนเมตรเทียบกับโปรตีนที่รู้โครงสร้างเป็นอย่างดีแล้ว ซึ่ง ณ ที่นี้ผู้ทำวิจัยเลือกใช้ BSA

### ผลและวิจารณ์ผลการทำวิจัย

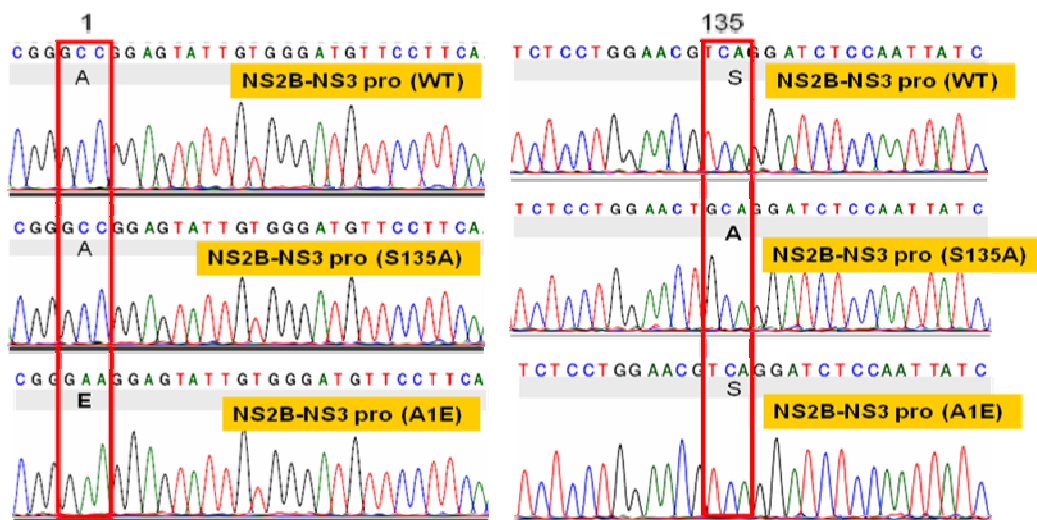
จากปัญหาที่การสังเคราะห์ integral membrane protein ของ eukaryote ใน *E. coli* ทำได้ยาก เนื่องจากโปรตีนต้องการ signal peptide ที่จำเพาะต่อระบบของ *E. coli* เอง การที่ไม่มีสิ่งดังกล่าวจึงทำให้โปรตีนมีการ folding ที่ไม่ถูกต้อง มีปริมาณน้อย และท้ายที่สุดคือไม่สามารถทำงาน (function) ได้ ดังที่ผู้ทำวิจัยได้ทดลองสังเคราะห์ NS2B-NS3 protease โดยใช้ pET-28a(+) เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ผู้วิจัยจึงได้พัฒนา expression vector สำหรับผลิตโปรตีนเชิงซ้อน NS2B-NS3 protease ขึ้นมา โดยอาศัยองค์ประกอบของ Mistic ร่วมกับ GS-linker, His8 และ thrombin cleavage site เริ่มแรกการสร้าง expression vector จะต้องทำการเพิ่มปริมาณของ 3 fragment, F1, F2 และ MHT ขึ้นมา (รูปที่ 3) แล้วโคลนส่วนของ MHT fragment เข้าไปในที่ MSC1 ของ pETDuet™-1 vector ซึ่ง recombinant plasmid ที่สร้างขึ้นใหม่นี้ถูกเรียกว่า “pMHTD expression vector” (รูปที่ 4) คุณสมบัติของ vector มีหลายประการ ดังนี้

1. เป็น vector ที่สามารถใช้ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนสองชนิดได้ เนื่องจากมี MCS และ T7 lac promoter 2 ตำแหน่ง แต่มี T7 terminator เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้นที่บริเวณ MCS2
2. หลังจากที่มีการตัดต่อยีนเข้าไปใน vector แล้ว transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 เซลล์ที่มี recombinant plasmid เหล่านี้สามารถถูกคัดกรองได้ด้วย ampicillin เนื่องจาก pMHTD มียีนที่ดื้อต่อยา ampicillin
3. สามารถใช้ในการสังเคราะห์ membrane protein ได้เนื่องจากมี Mistic และ Mistic สามารถแยกออกจากโปรตีนที่สนใจได้ด้วย thrombin protease เนื่องจากใน vector มีตำแหน่งของ thrombin cleavage site
4. โปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้เบื้องต้น ด้วยวิธี Nickel ion affinity chromatography เนื่องจากโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมี His<sub>8</sub> เชื่อมติดอยู่



รูปที่ 3 การเพิ่มปริมาณของ F1, F2 และ MHT fragments (ขนาดของ F1, F2 และ F3 เท่ากับ 368, 78 และ 428 bp ตามลำดับ)

งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษากลไกและลักษณะของโปรติเอสเชิงซ้อน NS2B-NS3 protease ดังนั้นยีนของ NS2B-NS3 protease (wild type) จึงถูกเพิ่มปริมาณขึ้นและโคลนเข้าสู่ pMHTD expression vector เมื่อผ่านการยืนยันผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย DNA sequencing แล้ว mutant อีกสองตัว คือ A1E และ S135A ได้ถูกสร้างขึ้นด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis แล้วทำการยืนยันผลเช่นเดียวกับ wild type เมื่อเปรียบเทียบผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง wild type, A1E และ S135A พบว่า mutant clone ทั้งสองมีลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปตามที่ต้องการ คือ กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Alanine เป็น Glutamic acid ที่ตำแหน่งที่ 1 ของ NS3 protease ใน A1E สำหรับ S135A พบว่ากรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Serine เป็น Alanine ที่ตำแหน่ง 135 ของ NS3 protease (รูปที่ 5)

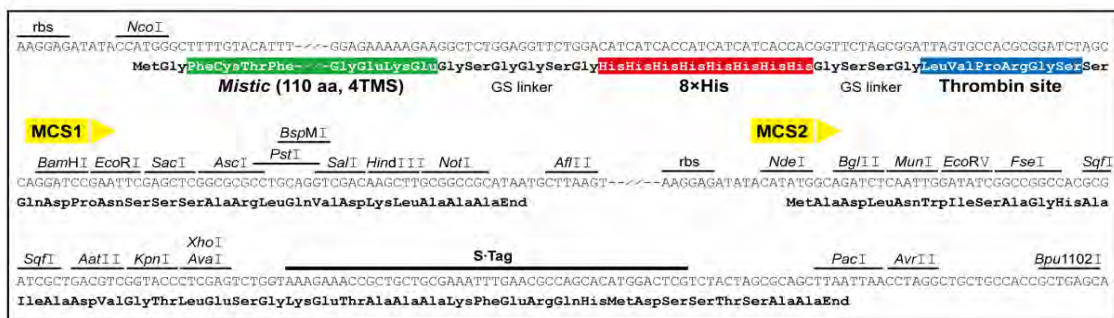
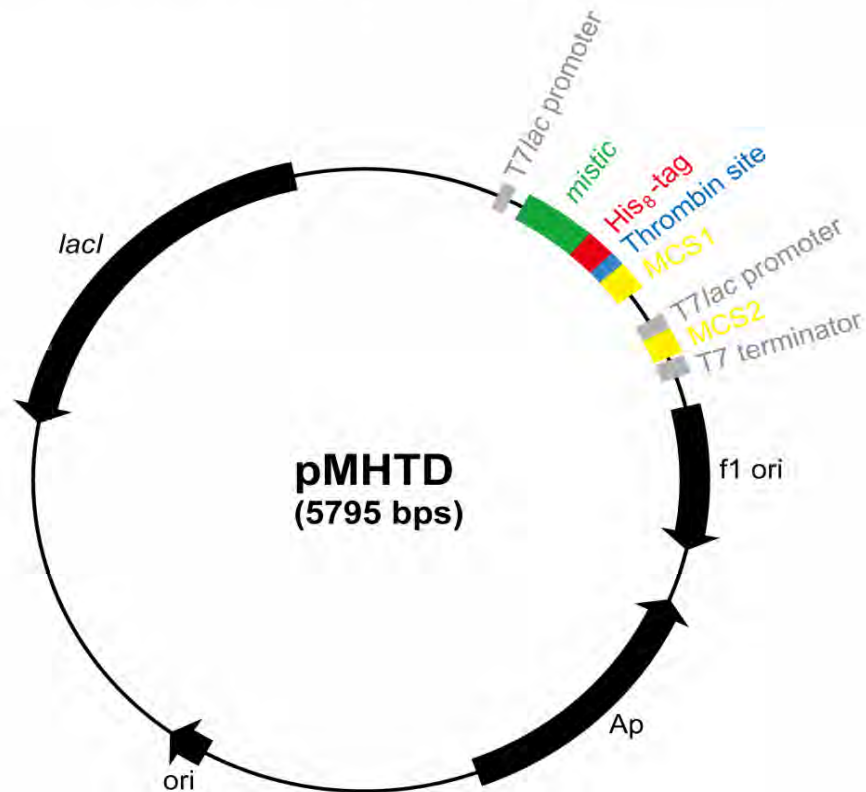


รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนของ NS2B-NS3 protease (A1E และ S135A)

pMHTD-NS2B-NS3pro recombinant plasmid ถูกนำไปใช้สังเคราะห์โปรตีนโดยเริ่มแรกมีการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับทั้งชนิดของเซลล์ ความเข้มข้นของ IPTG อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้น จากผลการทดลองพบว่า NS2B-NS3 protease ถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ในทุกสภาวะ ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะดังต่อไปนี้ ความเข้มข้น IPTG, อุณหภูมิ, เวลา และชนิดของเซลล์ที่ใช้ คือ 100  $\mu$ M (เป็นความเข้มข้นที่นิยมใช้ในระบบของ pET vector), 25  $^{\circ}$ C (เพื่อให้เซลล์โตเร็วเกินไป), 6 ชั่วโมง และ BL21(DE3)+pRARE2 เพื่อป้องกันปัญหาการหยุดสร้างโปรตีนเนื่องจากขาด codon ใน *E. coli* (รูปที่ 6) จากผลการทดลองพบว่าโปรตีน MHT-NS2B-NS3 protease ซึ่งมีขนาด 50 kDa ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน insoluble fraction โดยได้โปรตีนปริมาณมากอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนหลังจากการใช้ expression vector ที่ใช้กันโดยทั่วไปกับของที่เราพัฒนาขึ้น (pMHTD) ได้ผลลัพธ์ที่ไปในแนวทางเดียวกันกับข้างต้น คือ ปริมาณของโปรตีนที่ได้จากการใช้ pMHTD expression vector มีปริมาณมากกว่าประมาณ 10 เท่า ซึ่งโปรติเอสเชิงซ้อนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นได้รับการยืนยันผลด้วยเทคนิค western blot ที่ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ His-tag แล้วปรากฏว่าเป็นโปรตีนที่ต้องการ (รูปที่ 7) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า pMHTD expression vector ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นนั้นสามารถนำมาใช้ในการผลิต NS2B-NS3 protease ซึ่งจัดเป็น integral membrane protein ชนิดหนึ่งได้จริง และนี่ถือเป็นความสำเร็จครั้งแรกที่โปรติเอสเชิงซ้อนชนิดนี้ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้น รวมถึงมีปริมาณพอใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

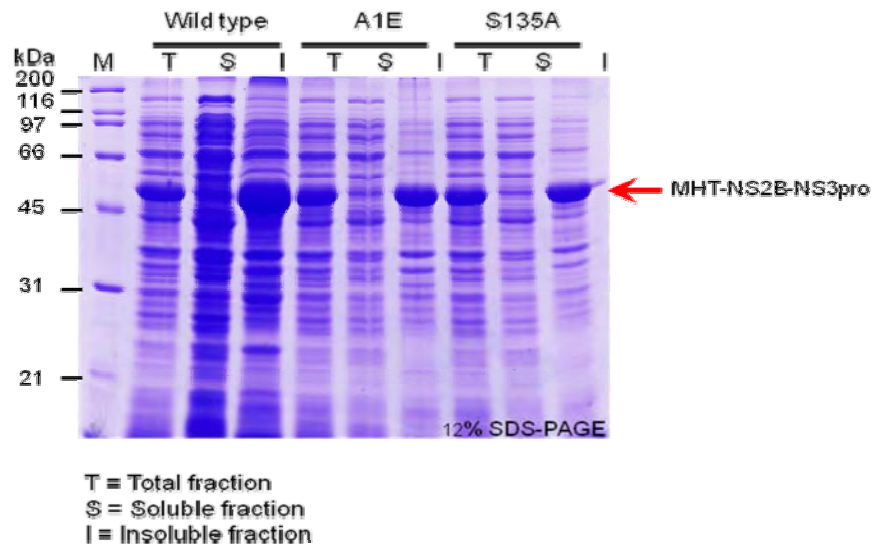
จากหลักฐานนี้ยังสามารถสรุปได้อีกว่า vector ชนิดนี้จะสามารถใช้ในการสังเคราะห์ membrane protein ตัวอื่นได้อีกด้วย

## pMHTD vector for integral membrane protein expression

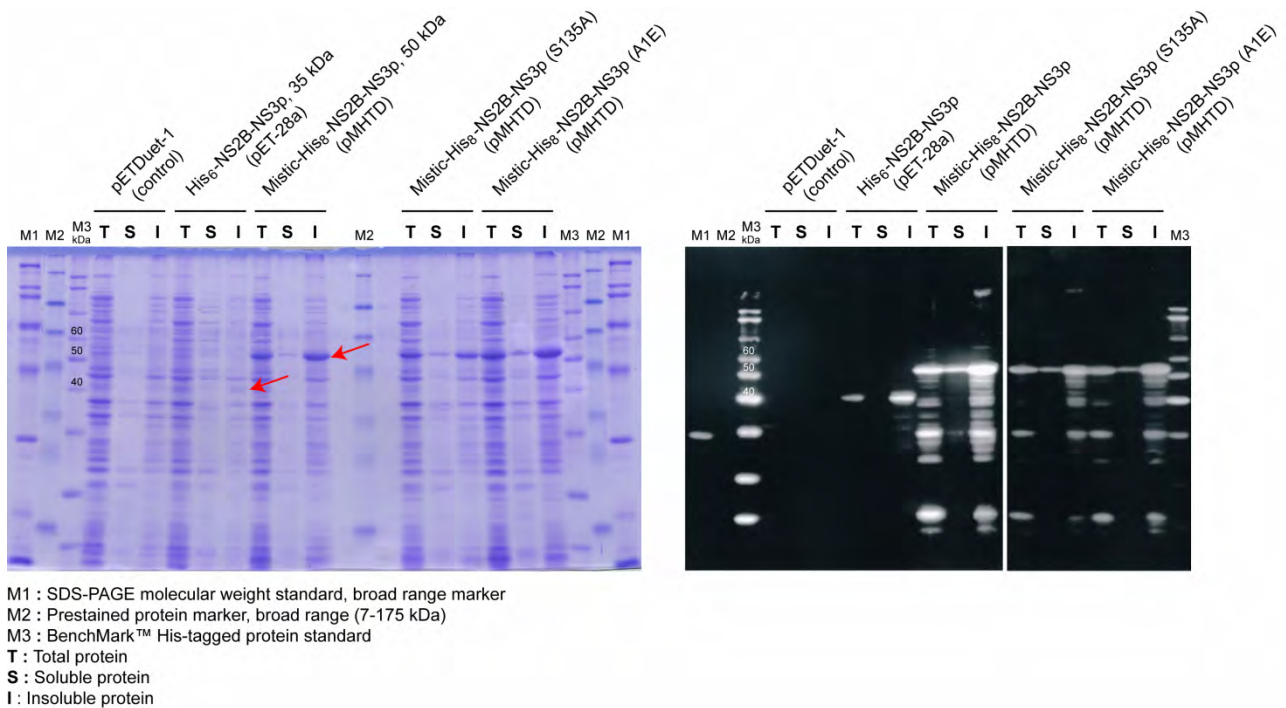


\*Reference: NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression. (2005) *Science* **307**, 1317-21.

รูปที่ 4 แสดงลักษณะและองค์ประกอบของ pMHTD expression vector (Mistic ถูกแสดงในแถบสีเขียว, His8 tag ถูกแสดงในแถบสีแดง, และ thrombin cleavage site ถูกแสดงในแถบสีฟ้า)

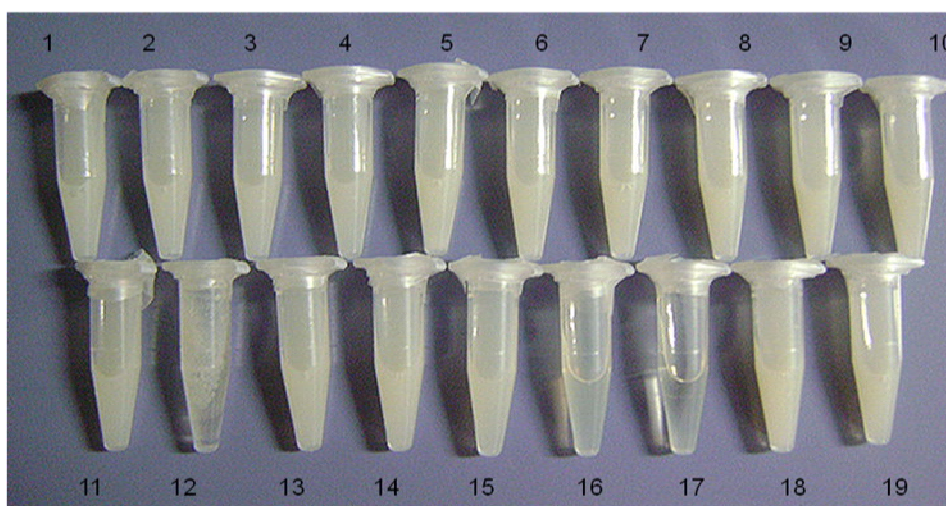


รูปที่ 6 การสังเคราะห์โปรตีนเชิงซ้อน NS2B-NS3 protease (wild type, A1E และ S135A) หลังจากให้น้ำโปรตีนในแต่ละ fraction มาวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE จะพบ MHT-NS2B-NS3 protease ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 50 kDa



รูปที่ 7 การเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนเชิงซ้อนที่ถูกสร้างขึ้นโดยใช้ expression vector (pET-28a) ที่ใช้ทั่วไปกับ expression vector ที่ถูกพัฒนาขึ้น (pMHTD) โดยสามารถวิเคราะห์ผลได้โดยใช้ 12% SDS-PAGE (ซ้าย) และโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นสามารถยืนยันผลได้ด้วย western blot ซึ่งใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ His tag

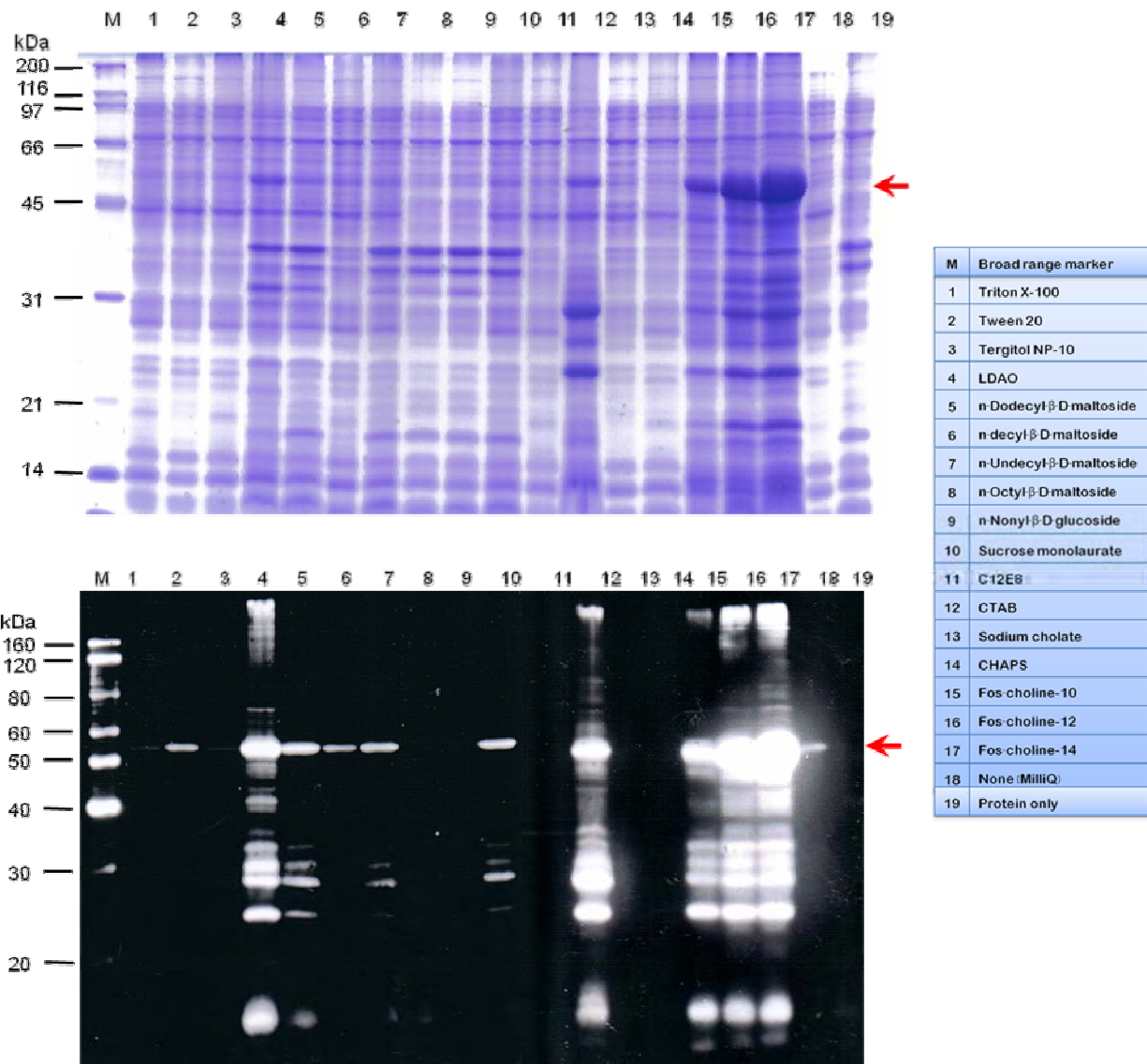
สำหรับการศึกษา integral membrane protein สิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงคือ สภาวะที่เหมาะสมแก่การสกัดโปรตีนออกจากเยื่อหุ้มเซลล์โดยการใช้ detergent และนี่ถือเป็นจุดที่สำคัญมากเพราะ membrane protein แต่ละชนิดสามารถถูกสกัดได้ด้วย detergent ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมจึงทำได้ยากเนื่องจาก detergent มีค่อนข้างมาก รวมถึงบางตัวมีราคาแพง ซึ่งถือได้ว่าการค่อนข้างต้องใช้ทุนสูงมาก สำหรับงานวิจัยชิ้นนี้ได้ใช้ detergent 17 ชนิดในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ผลของการทดสอบสามารถพิจารณาได้คร่าวๆจากลักษณะของสารละลายโปรตีนซึ่งหาก detergent ชนิดใดสามารถสกัดโปรตีนออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ สารละลายโปรตีนจะมีความใสเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนก่อนถูกสกัด จากรูปที่ 8 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า CTAB, Fos-choline-12 และ Fos-choline-14 สามารถสกัดโปรตีนออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้



| M  | Broad range marker            |
|----|-------------------------------|
| 1  | Triton X-100                  |
| 2  | Tween 20                      |
| 3  | Tergitol NP-10                |
| 4  | LDAO                          |
| 5  | n Dodecyl $\beta$ D maltoside |
| 6  | n decyl $\beta$ D maltoside   |
| 7  | n Undecyl $\beta$ D maltoside |
| 8  | n Octyl $\beta$ D maltoside   |
| 9  | n Nonyl $\beta$ D glucoside   |
| 10 | Sucrose monolaurate           |
| 11 | C12E8                         |
| 12 | CTAB                          |
| 13 | Sodium cholate                |
| 14 | CHAPS                         |
| 15 | Fos choline-10                |
| 16 | Fos choline-12                |
| 17 | Fos choline-14                |
| 18 | None (MilliQ)                 |
| 19 | Protein only                  |

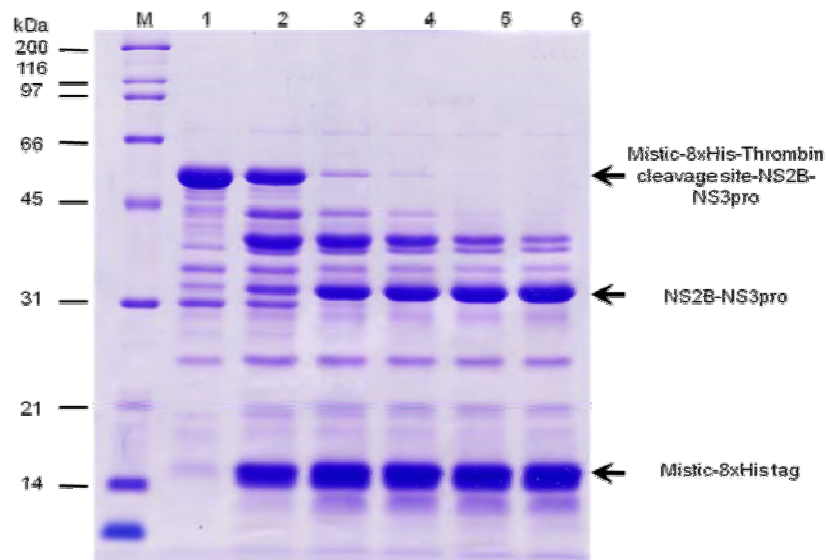
รูปที่ 8 ลักษณะของโปรตีนเชิงซ้อน NS2B-NS3pro หลังจากที่ถูกสกัดออกจากเยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้ detergent ชนิดต่างๆ

สำหรับการวิเคราะห์และการยืนยันความสามารถในการสกัดโปรตีนของ detergent แต่ละชนิดทำได้ด้วยเทคนิค 12% SDS-PAGE และ western blot ซึ่งจะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ His-tag โดยโปรตีนที่ถูกสกัดจะหลุดจากเยื่อหุ้มเซลล์ออกมาสู่ aqueous phase (detergent solubilizing fraction) จากรูปที่ 9 (บน) จะเห็นว่า LDAO, CTAB, Fos-choline-10, Fos-choline-12 และ Fos-choline-14 สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ และจากรูป 9 (ล่าง) พบว่า Fos-choline-14 เป็น detergent ที่ดีที่สุด เพราะสามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ปริมาณมากที่สุด ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้ detergent ตัวนี้ในการสกัดโปรตีนต่อไป

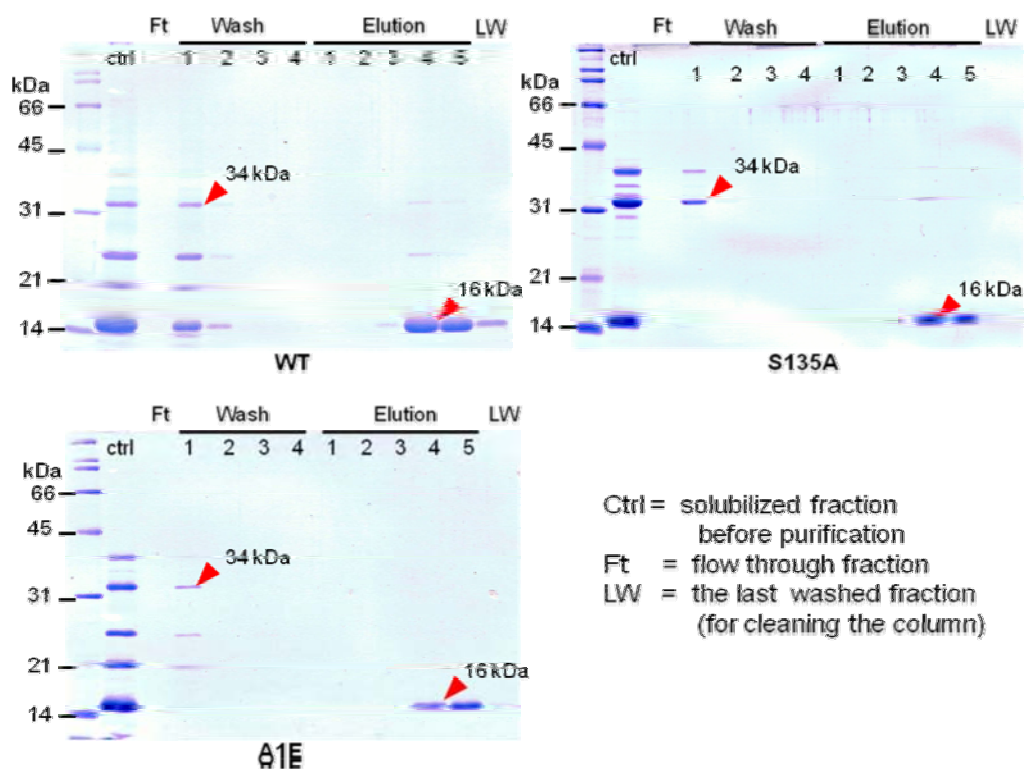


รูปที่ 9 การวิเคราะห์ความสามารถของ detergent แต่ละชนิดในการสกัดโปรตีนออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย 12% SDS-PAGE (บน) และผลถูกยืนยันด้วย western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ His-tag (ล่าง)

หลังจากที่โปรตีนถูกสกัดออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนที่ปราศจาก His tag จะถูกกำจัดออกก่อนการแยก Mistic ออกจาก NS2B-NS3 protease ด้วย Nickel ion affinity chromatography เพื่อช่วยให้ thrombin protease ทำงานได้ดีขึ้น การทำงานของ thrombin นั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของโปรตีน ทำให้จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาณของโปรตีนที่คงที่ คือ 100  $\mu$ g แล้วค่อยๆปรับระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1 จนถึง 10 ยูนิต (รูปที่ 10) ผลการทดสอบพบว่า thrombin protease ปริมาณ 10 ยูนิต เหมาะสมแก่การใช้แยก Mistic ออกจาก NS2B-NS3 protease เนื่องจากโปรตีน MHT-NS2B-NS3pro ถูกแยกออกเป็น Mistic และ NS2B-NS3 protease ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนของ Mistic ถูกกำจัดได้โดยการทำ Nickel ion affinity chromatography ซ้ำอีกรอบ ซึ่ง NS2B-NS3 protease จะไม่จับกับ Nickel ion ในคอลัมน์ จึงหลุดออก



รูปที่ 10 การหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ thrombin protease ที่สามารถใช้แยก Mistic ออกจาก NS2B-NS3 protease เมื่อใช้ทดสอบกับโปรตีนปริมาณ 100 µg



รูปที่ 11 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Nickel ion affinity chromatography ภายหลังจากการแยกโปรตีนด้วย thrombin protease (thrombin treatment) (NS2B-NS3 protease มีขนาด 34 kDa และ MHT มีขนาด 16 kDa)

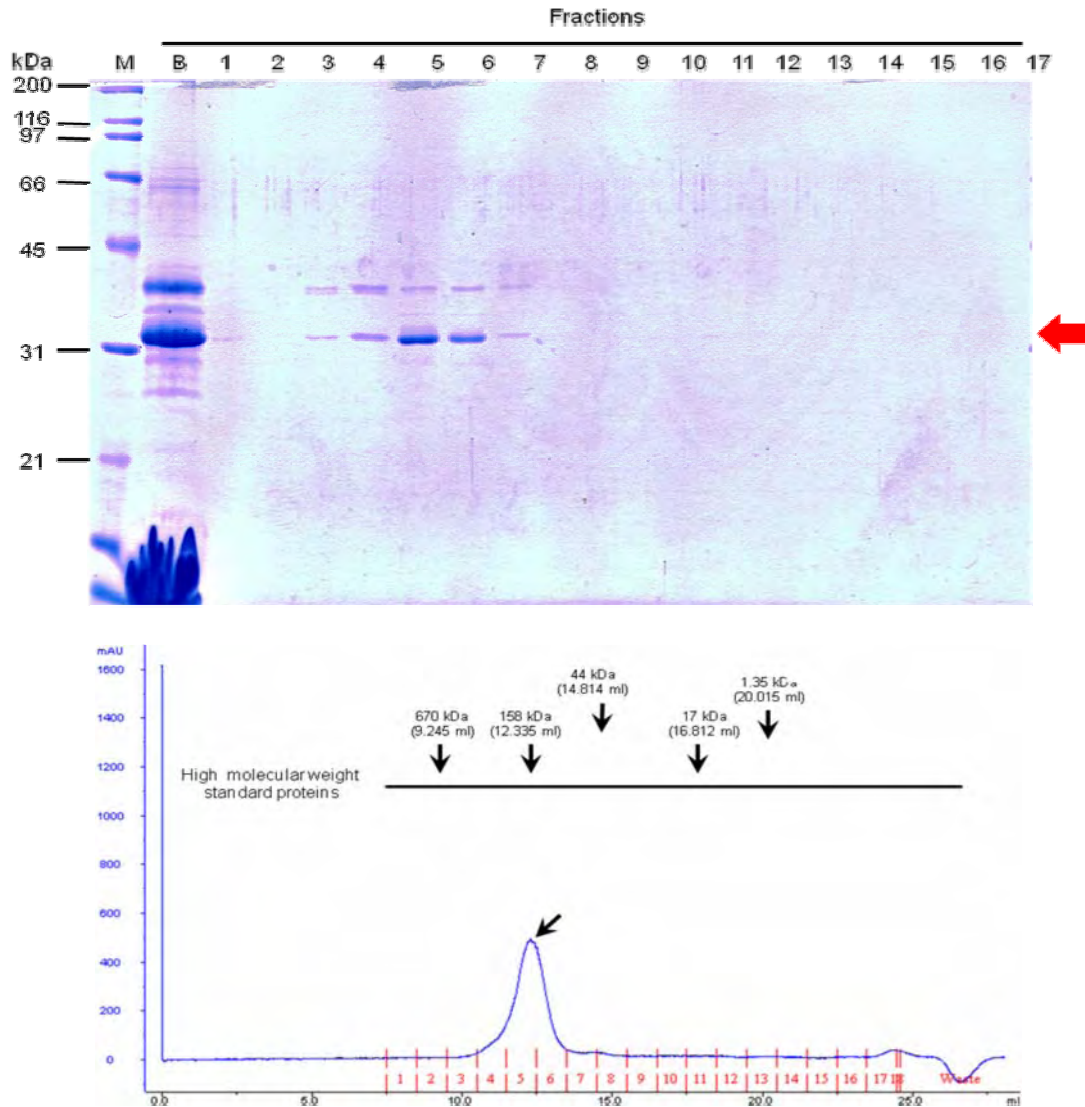
มาอยู่ใน flow through fraction ในขณะที่ Mistic ที่มี His<sub>6</sub> จะอยู่ในคอลัมน์ (รูปที่ 11) ดังรูปจะเห็นได้ว่า NS2B–NS3 protease ถูกแยกออกจาก Mistic ได้อย่างสมบูรณ์ และที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือ พบ intense band หลายๆ band ทั้งใน WT และ A1E นั้นหมายความว่าโปรตีนทั้งคู่ต่างมี activity แต่ใน A1E จะมีน้อยกว่า ในขณะที่ S135A ไม่มี activity ซึ่งเป็นไปตามรายงานการศึกษาที่มีมา ทำให้สรุปได้ว่าโปรติเอสเชิงซ้อน NS2B–NS3 protease ที่ผู้วิจัยได้สังเคราะห์ขึ้นนั้นมีการ folding ที่ถูกต้องและสามารถทำงานได้ (มี activity)

ต่อมาโปรติเอสเชิงซ้อนถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคที่แยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล โดยโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถเข้าไปอยู่ในช่องว่างของเม็ด bead ที่บรรจุอยู่ภายในคอลัมน์นี้จะหลุดออกมาจากคอลัมน์ก่อนโมเลกุลขนาดเล็ก จากรูปที่ 12 จะเห็นว่า NS2B–NS3 protease (34 kDa) ถูกแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นได้ในระดับหนึ่ง เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรมจะพบว่าโปรติเอสเชิงซ้อนหลุดออกมาหลังจากที่ล้างด้วย gel filtration buffer ไปประมาณ 12.335 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ standard protein ที่รู้ขนาดที่แน่นอนแล้วพบว่าโปรตีนจะมีขนาดประมาณ 158 kDa และเมื่อคำนวณหาขนาดที่แท้จริงของโปรตีนจะเห็นว่าขนาดของโปรตีนที่เห็นเกิดจากการจัดเรียงตัวของ NS2B–NS3 protease 3 โมเลกุล (trimer) ซึ่งเป็นการค้นพบที่สำคัญซึ่งยังไม่มีผู้ใดค้นพบมาก่อน

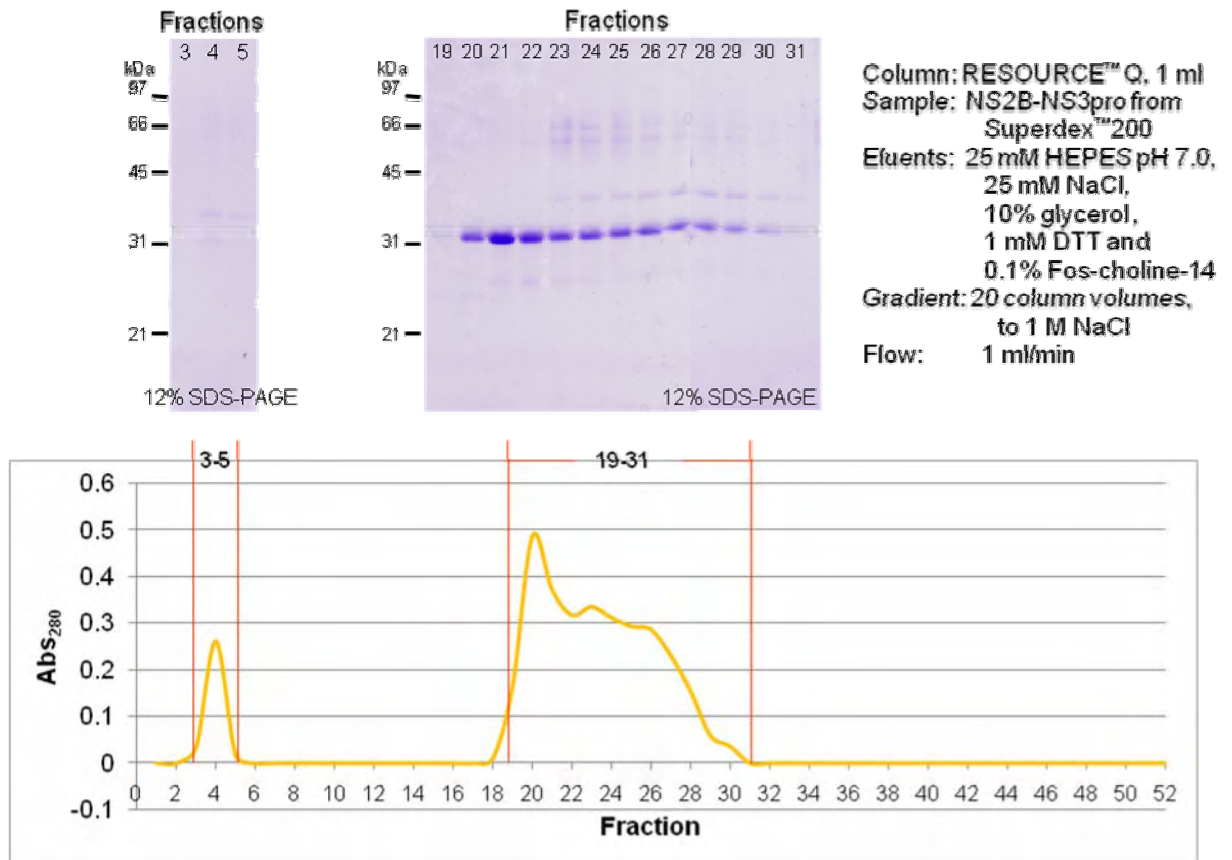
$$\begin{aligned} \text{ขนาดของโปรตีน NS2B–NS3 protease} - \text{ขนาดของ micelle ที่เกิดจาก Fos-choline-14} &= 158 - 47 \text{ kDa} \\ &= 111 \text{ kDa} \\ &\approx 34 \text{ kDa (NS2B–NS3pro)} \times 3 \text{ molecules} \end{aligned}$$

แต่เนื่องจากโปรตีนยังมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติได้ จึงจำเป็นที่จะต้องทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นกว่านี้ด้วยเทคนิค Anion exchange chromatography (รูปที่ 13) จากผลที่ได้จะเห็นว่าโปรตีน fraction เบอร์ 20, 21 และ 22 มีความบริสุทธิ์อย่างมาก ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปได้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าหลังจากการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Nickel affinity แล้ว Size exclusion และ Anion exchange chromatography สามารถช่วยให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

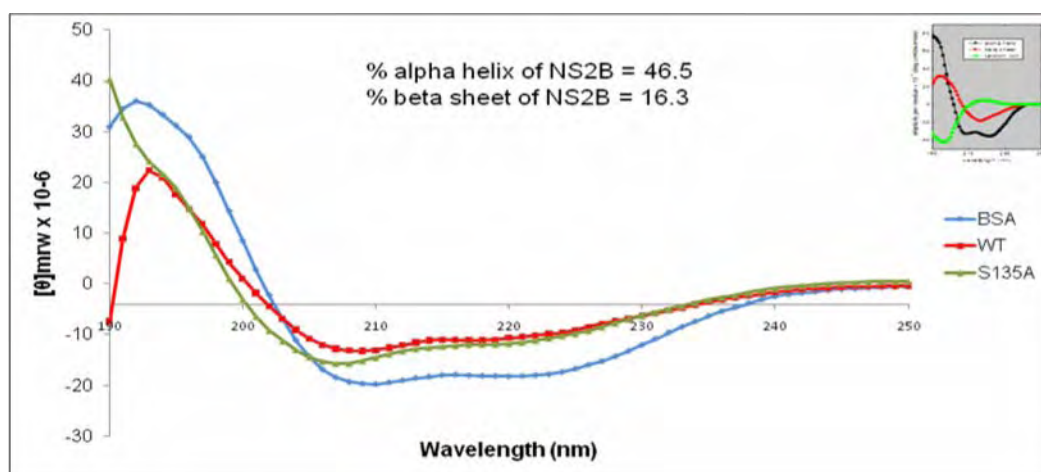
NS2B–NS3 protease ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ถูกนำมาทดสอบต่อการหาโครงสร้างทุติยภูมิของ NS2B–NS3 protease โดยใช้เทคนิค circular dichroism (CD) (รูปที่ 14) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการ folding ระหว่าง NS2B–NS3 protease (wild type และ S135A) และ BSA ที่รู้แล้วว่าการจัดรูปร่างเป็นแบบ  $\alpha$ -helix พบว่าส่วนใหญ่แล้วโปรติเอสเชิงซ้อนจะมีรูปแบบที่ประกอบด้วย  $\alpha$ -helix มากกว่า  $\beta$ -sheet ซึ่งยืนยันได้จากการคำนวณ จากงานวิจัยที่เคยรายงานมาเบื้องต้นทำให้ผู้วิจัยทราบว่าโครงสร้างส่วนใหญ่ของ NS3 protease เป็น  $\beta$ -sheet ดังนั้นอิทธิพลที่เกิดขึ้นจากการทำ CD จึงมาจากโปรตีน NS2B ทั้งนี้จึงสรุปได้ว่าโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน NS2B เป็น  $\alpha$ -helix อีกทั้งการทดลองในขั้นตอนนี้ยังแสดงให้เห็นไปในทางเดียวกันกับผลที่ได้จากการทำ Nickel ion affinity chromatography ภายหลังจาก thrombin treatment อีกด้วยว่าโปรติเอสเชิงซ้อนมีการ folding ที่ถูกต้องและสามารถทำงานได้



รูปที่ 12 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Size exclusion chromatography บน; ผลจากการวิเคราะห์โปรตีนในแต่ละ fraction ด้วย 12% SDS-PAGE (M คือ marker และ B คือ NS2B-NS3 protease หลังจาก Nickel ion affinity chromatography)ล่าง; โครมาโตแกรมแสดงค่าการดูดกลืน UV 280 nm เทียบกับ standard protein



รูปที่ 13 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Anion exchange chromatography บน; การวิเคราะห์หิวเคราะห์โปรตีนในแต่ละ fraction ด้วย 12% SDS-PAGE ล่าง; โครมาโตแกรมแสดงค่าการดูดกลืน UV 280 nm



รูปที่ 14 การหาโครงสร้างทุติยภูมิของ NS2B-NS3 protease (wild type และ S135A) โดยใช้เทคนิค circular dichroism (CD)

## สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

1. pMHTD expression vector ที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการสังเคราะห์ NS2B–NS3 protease ซึ่งจัดเป็น integral membrane protein ได้จริง และได้ปริมาณมากที่ใน insoluble fraction ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Mistic สามารถช่วยให้โปรตีนแทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ได้ รวมถึง pMHTD มีแนวโน้มที่จะใช้ในการสังเคราะห์ membrane protein ตัวอื่นได้อีกด้วย
2. Fos-choline-14 เป็น detergent ที่ดีที่สุดในการสกัด NS2B–NS3 protease ออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์
3. Mistic สามารถแยกออกจาก NS2B–NS3 protease ได้อย่างง่ายดายโดยใช้ thrombin protease โดยอัตราส่วนระหว่าง thrombin และโปรตีน คือ thrombin 10 ยูนิตต่อโปรตีน 100 ไมโครกรัม
4. การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์สามารถทำได้โดยเริ่มจากการทำ Nickel affinity ตามด้วย Size exclusion และ Anion exchange chromatography หรือ Anion exchange และ Size exclusion chromatography
5. NS2B–NS3 protease ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้มีการ folding ที่ถูกต้องโดยส่วนใหญ่เป็น  $\alpha$ -helix ซึ่งเป็นอิทธิพลของโปรตีน NS2B อีกทั้งโปรตีนนั้นยังสามารถทำงานได้ (มี activity) ที่สามารถสังเกตได้จากการวิเคราะห์โปรตีนแต่ละ fraction ที่ผ่านการทำ Nickel ion affinity chromatography ภายหลังจากการทำ thrombin treatment ด้วย 12% SDS-PAGE และจากผลของการทำ Size exclusion chromatography (gel filtration) เป็นการระบุครั้งแรกว่า NS2B–NS3 protease มีการจัดรูปแบบเป็น trimer

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (หากยังไม่มี ให้ระบุชื่อเรื่องและชื่อวารสารนานาชาติที่คาดว่าจะตีพิมพ์ได้ และจะตีพิมพ์ได้เมื่อใด)

เนื่องจากผู้วิจัยมีแนวคิดจะเพิ่มปริมาณและระดับคุณภาพของงานให้มากขึ้น เพื่อสามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในนิตยสารวิทยาศาสตร์ระดับนานาชาติที่มีค่า impact factor ที่สูงขึ้นได้ ดังนั้นงานวิจัยจึงยังคงดำเนินการอยู่อย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน และผู้วิจัยคาดว่าจะตีพิมพ์ผลงานวิจัยในหัวข้อ :

“High-level expression of the intact dengue protease complex in the membrane-embedded form in *E. coli*”

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : *Prot. Expr. Purif.* มี Impact Factor 1.336 หรือ

*FEMS Microbiol Lett.*, มี Impact factor 1.840

ช่วงเวลาที่จะตีพิมพ์ : กรกฎาคม 2010 – สิงหาคม 2010

## กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

(1) ผลงานอื่นๆ เช่น การไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

- Poster presentation at Joint Symposium of JENESYS Program 2008, Hokkaido University, Sapporo, Japan on May 12-13, 2008

- Poster presentation at 35<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, Chonburi, Thailand on October 15-17, 2009

- Oral presentation “Overexpression of the intact membrane integral dengue viral (NS2B-NS3) protease complex” at 11<sup>th</sup> Graduate research conference, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand on February 12, 2010 and won very good awards in oral presentation

(2) การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ

The cloning of the dengue protease was assisted by Dr. Gerd Katzenmeier (IMG, Mahidol) who is one of the professional in the field of the dengue viral protease. Dr. Katzenmeier will also help me in the measurement of the protease activity using the fluorescent peptide.

The ultimate goal of the project is to solve the 3D structure of the dengue protease NS2B-NS3 complex, and this future work will be performed as a joint research with Prof. Isao Tanaka (Hokkaido University, Japan). Prof. Tanaka's lab is one of the most famous labs in X-ray crystallography in Japan, and was one of the nine centers of the structural genomic project in Japan. The collaboration will provide me the access to the synchrotron in Japan, and their skill of protein crystallization and structure determination will be greatly helpful to the project.