

การแสดงออกของโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส- โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *Plasmodium falciparum* โดยใช้ระบบการแสดงออก pGEX

Expression of Dihydrofolate Synthase-Folylpolyglutamate Synthase from *Plasmodium falciparum* Using pGEX System

ธงชัย พยุงวงษ์ และสุกัลยา อุทัยดา

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์*

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย
ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Tongchai Payungwong and Sugunya Utaida

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Chairat Uthaipibull*

National Center For Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand Science Park,
Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Klong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทส (dihydrofolate synthase - folylpolyglutamate synthase) เป็นเอนไซม์ในวิถีโฟเลตซึ่งเป็นวิถีสำคัญในการสังเคราะห์สารพันธุกรรมของมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* และเป็นเอนไซม์สำคัญที่จะนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนายาต้านมาลาเรีย ดังนั้นการแสดงออกและผลิตเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* จึงมีความจำเป็นเพื่อใช้ในการศึกษาและพัฒนายาให้สามารถจับกับเอนไซม์ได้อย่างจำเพาะ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถทำให้มีการสร้างเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้ แต่พบปัญหาคือโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยใช้ระบบ pGEX เพื่อทำการแสดงออกเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* เชื่อมต่อกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase) ใน *E. coli* BL21(DE3) โดยกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนด้วยการใช้สูตรอาหารกระตุ้นการแสดงออกอัตโนมัติ ZYM-5052 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปกระตุ้นต่อที่อุณหภูมิ 18 องศา

เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้โปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* เชื่อมต่อกับกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอร์สที่มีขนาดประมาณ 87 กิโลดาลตัน ในส่วนละลายน้ำ และสามารถทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นได้ด้วย glutathione sepharose 4 fast flow resin เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาพัฒนายาต้านมาลาเรียต่อไปได้

คำสำคัญ : มาลาเรีย; *Plasmodium falciparum*; ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทส; การแสดงออกของโปรตีน

Abstract

Dihydrofolate synthase-folylpolyglutamate synthase (DHFS-FPGS) is one of the enzymes in folate biosynthesis pathway, which is important for genetic material synthesis in malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Due to its important function in the pathway, the enzyme is considered to be one of the candidates as new drug targets. Therefore, expression and production of *P. falciparum* DHFS-FPGS enzyme is crucial for use in specific inhibitor-target binding during the process of drug discovery and development. Previous studies by other research groups showed that *P. falciparum* DHFS-FPGS could be expressed in *Escherichia coli* but most of the expressed proteins were in the form of insoluble fraction. In this study, we used pGEX expression system to express Glutathione S-transferase (GST)-fusion DHFS-FPGS protein in *E. coli* BL21 (DE3). The GST-fusion DHFS-FPGS protein, at the size of approximately 87 kilodaltons, could be induced as a soluble form, using autoexpression system by culturing the bacteria in ZYM-5052 media at 37 °C for 12 hours followed by 18 °C for another 24 hours. When purified using glutathione Sepharose 4 Fast Flow resin, the protein could be further used for antimalarial drug development.

Keywords: *Plasmodium falciparum*; dihydrofolate synthase-folylpolyglutamate synthase; protein expression

1. คำนำ

โรคมาลาเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกิดจาก *Plasmodium falciparum* เป็นปัญหาที่ร้ายแรงต่อสุขภาพของมนุษย์ในประเทศเขตร้อนชื้น มีผู้ป่วยในแต่ละปีประมาณ 100-200 ล้านคน และตายปีละประมาณ 655,000 คน (WHO, 2011) นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียได้มีการพัฒนาจนสามารถดื้อยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ ไพริเมธาซีน (pyrimethamine) คลอโรควิน (chloroquine) ซัลฟาดอกซิน (sulfadoxine) และล่าสุดมีรายงานการพบการดื้อยา

รักษาโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อดีที่สุดในปัจจุบัน คือ อาร์เทมิซินิน (artemisinin) (Dondorp et al., 2009) ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนายาใหม่เพื่อต่อสู้กับเชื้อดื้อยาเหล่านี้ โดยกระบวนการหนึ่งในการพัฒนายาใหม่คือการค้นหาเป้าหมายยาใหม่ที่มีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของมาลาเรีย เพื่อใช้ในการพัฒนารักษาโรคมาลาเรียต่อไป

ยาด้านโฟเลต (antifolate drugs) เป็นยาที่ใช้ยับยั้งเอนไซม์ในเมแทบอลิซึมของการ

สังเคราะห์โฟเลต และได้นำมาใช้ในการรักษามาลาเรีย โดยมียาที่ใช้กันอยู่คือยาซัลฟาดอกซิน ซึ่งเป็นยาที่มีเป้าหมายอยู่ที่เอนไซม์ไดไฮโดรเทอโรเอทซินเทส (dihydropteroate synthase, DHPS) (Triglia *et al.*, 1997) และยาไพริเมธามีนที่มีเป้าหมายอยู่ที่เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส (dihydrofolate reductase, DHFR) (Sirawaraporn, 1998) ซึ่งการยับยั้งเอนไซม์ในเมแทบอลิซึมของการสังเคราะห์โฟเลตจะมีผลทำให้เชื้อไม่สามารถสร้างสารพันธุกรรมได้และทำให้เชื้อตาย จึงทำให้เมแทบอลิซึมของการสังเคราะห์โฟเลตโดยเฉพาะเอนไซม์ไดไฮโดรเทอโรเอทซินเทสและเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสนั้นเป็นเป้าหมายของการพัฒนายาตัวใหม่ นอกจากนี้ในเมแทบอลิซึมของการสังเคราะห์โฟเลตนั้นยังมีเอนไซม์อื่นที่อยู่ระหว่างการศึกษาศักยภาพการเป็นเป้าหมาย (Muller *et al.*, 2009; Muller and Hyde, 2013)

เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทส (dihydrofolate synthase-folylpolyglutamate synthase) ของ *P. falciparum* เป็นเอนไซม์สองหน้าที่ (bi-functional enzyme) คือ ไดไฮโดรโฟเลตซินเทสและโพลีกลูตาเมตซินเทส (Salcedo *et al.*, 2001) โดยเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทสทำหน้าที่ในการเปลี่ยนไดไฮโดรเทอโรเอท (dihydropteroate) ให้ได้ไดไฮโดรโฟเลต (dihydrofolate) โดยการเติมกรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) และอาศัยเอทีพี (ATP) เป็นโคแฟกเตอร์ สำหรับเอนไซม์โพลีกลูตาเมตซินเทส อาศัยโคแฟกเตอร์เหมือนกับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส คือ เอทีพี แต่สารตั้งต้นคือกรดอะมิโนกลูตามิกและเตตราไฮโดรโฟเลต (tetrahydrofolate) ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นเตตราไฮโดรโฟเลตที่ต่อกับสาย กลูตาเมต การเติมสายกลูตาเมตเข้าไปในเตตราไฮโดรโฟเลต ใน *P. falciparum* จะเติมกลูตาเมตเข้าไปทั้งหมด 5 ตัว

(Krungkrai *et al.*, 1989; Wang *et al.* 2004) การเติมสายกลูตาเมตเข้าสู่เตตราไฮโดรโฟเลตของเอนไซม์โพลีกลูตาเมตซินเทสมีความสำคัญเพราะกลูตาเมตตัวแรกที่อยู่ในโฟเลตหรือเตตราไฮโดรโฟเลตเป็นตัวสำคัญที่ทำให้โฟเลตเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างออร์แกนเนลล์ หรือเข้าออกเซลล์ ซึ่งอาจทำให้ปริมาณโฟเลตภายในเซลล์ลดลงได้ ดังนั้นการเติมสายกลูตาเมตจะช่วยให้โฟเลตไม่ถูกแลกเปลี่ยนระหว่างออร์แกนเนลล์หรือเข้าออกเซลล์ได้โดยง่าย นอกจากนี้การเติมสายกลูตาเมตเข้าสู่เตตราไฮโดรโฟเลตยังช่วยให้เอนไซม์ที่อยู่ในวัฏจักรไธมิดิเลต (thymidylate cycle) สามารถจับกับโฟเลตได้ดีขึ้น (McGuire, 1984) เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* นั้นเมื่อเปรียบกับเอนไซม์ของมนุษย์พบว่ามีความแตกต่างกันเพราะในมนุษย์จะมีเพียงเอนไซม์โพลีกลูตาเมตซินเทส (Salcedo *et al.*, 2001) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์นี้มีความสำคัญต่อ *Escherichia coli* (Pyne and Bongnar, 1992) นอกจากนี้การนำเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียและยีสต์สายพันธุ์ที่ขาดยีนนี้ สามารถช่วยให้ทั้งแบคทีเรียและยีสต์มีชีวิตรอดได้ (Salcedo *et al.*, 2001) ดังนั้นเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสจึงเป็นเอนไซม์สำคัญที่จะนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนายาได้

เพื่อใช้ในการศึกษาและพัฒนายาให้สามารถจับกับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสได้อย่างจำเพาะและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นั้น จำเป็นต้องแสดงออกและผลิตเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ให้ได้ ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถแสดงออกเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทส

ของ *P. falciparum* ใน *E. coli* ได้ แต่พบปัญหาคือ โปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble protein) (Coetzee, 2003; Human, 2007) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการแสดงออก เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ใน *E. coli* โดยให้ เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสเชื่อมต่อกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase) ซึ่งสามารถ ช่วยให้เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสที่เชื่อมอยู่นั้นอยู่ในรูปที่สามารถ ละลายน้ำได้มากขึ้น (Smith and Johnson, 1988) และทำให้สามารถนำไปสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย พลาสมิดและ สารเคมีที่ใช้

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α สำหรับการสร้างพลาสมิด และ สายพันธุ์ BL21 (DE3) สำหรับการแสดงออก โปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทส พลาสมิดเริ่มต้นที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ pGEX-4T-1 (GE Healthcare Life Sciences) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Xho*I และ Gibson Assembly® master mix ใช้จาก New England Biolabs ซิตีเอ็นเอ (cDNA) ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 ได้จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

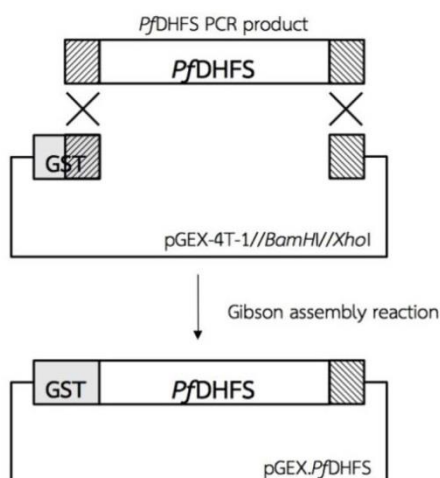
2.2 การสร้างพลาสมิดเพื่อใช้ในการแสดงออกเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทส

ยีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

(polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ pGEX-*Pf*DHFS forward และ pGEX-*Pf*DHFS reverse (ลำดับเบสดังที่แสดงในตารางที่ 1) และใช้ซิตีเอ็นเอ (cDNA) ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 ซึ่งได้จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) เป็นสายแม่แบบ โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ (1) initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที (2) denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (3) annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที (4) extension ที่ 60 องศาเซลเซียส 2 นาที ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 ทั้งหมด 30 รอบและจบด้วย final extension ที่ 60 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำความสะอาดชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *Pf*DHFS ที่ได้โดย QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) และนำชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *Pf*DHFS เข้าสู่พลาสมิด pGEX-4T-1 ที่ตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I โดยใช้เทคนิค Gibson assembly (Gibson et al., 2009) ซึ่งเป็นการผสมชิ้นยีนที่ต้องการกับพลาสมิดที่ถูกตัดแต่งในตำแหน่งที่ต้องการให้ชิ้นยีนเข้ากับสารละลาย Gibson assembly master mix ซึ่งมีเอนไซม์ T5 exonuclease (ทำหน้าที่ตัดย่อยด้าน 5' ของ ดีเอ็นเอ) Phusion DNA polymerase (สร้างสาย ดีเอ็นเอ) และ *Taq* DNA ligase (ต่อสายดีเอ็นเอ) ผสมอยู่ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock และทำการคัดเลือก *E. coli* ที่มีได้พลาสมิด pGEX-*Pf*DHFS (รูปที่ 1) บนอาหาร Luria Bertani (LB) ที่มีแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร) บ่มค้างคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลำดับเบสของยีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสและความถูกต้องของการเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pGEX-4T-1 ได้รับการยืนยันความถูกต้องด้วยการตรวจสอบลำดับเบส (BioDesign Co., Ltd.)

ตารางที่ 1 โพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum*

โพรเมอร์	ลำดับเบส
pGEX. <i>Pf</i> DHFS forward	5'-CCGCGTGGATCCCCGGAATTCATGGAAAAAATCAAAATGATAAAAGTAAC-3'
pGEX. <i>Pf</i> DHFS reverse	5'-GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTAAACAAGAGATGTTTCATTC-3'



รูปที่ 1 การสร้างพลาสมิด pGEX.*Pf*DHFS เพื่อใช้ในการแสดงออกเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *Pf*DHFS ถูกนำเข้าสู่พลาสมิด pGEX-4T-1 ที่ตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I โดยใช้เทคนิค Gibson assembly ได้พลาสมิด pGEX.*Pf*DHFS (GST = กลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรส)

2.3 การแสดงออกโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* โดยพลาสมิด pGEX.*Pf*DHFS

ถ่ายพลาสมิด pGEX.*Pf*DHFS เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อใช้ในการแสดงออกโปรตีน โดยสภาวะที่ใช้ในการแสดงออกมีดังนี้

2.3.1 แบบใช้ IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) เป็นตัวกระตุ้นการ

แสดงออก ทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX.*Pf*DHFS หรือ พลาสมิดดั้งเดิม pGEX-4T-1 ในอาหารเลี้ยง LB ที่มีแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ *E. coli* ที่เลี้ยงได้มาเจือจาง 20 เท่าในอาหารเลี้ยง LB ที่มีแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นำไปเลี้ยงต่อที่ 37 องศาเซลเซียสโดยเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ที่ 0.8 จึงเติม IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อ โดยแบ่งการเพาะเลี้ยงเป็น 2 อุณหภูมิคือที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กับที่ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเขย่าที่ความเร็วรอบเท่าเดิม

2.3.2 แบบชักนำการแสดงออกอัตโนมัติ (autoinduction) โดยอ้างอิงวิธีการจาก Studier (2005) ทำการเพาะเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX.*Pf*DHFS ในอาหารเลี้ยง LB ที่มีแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ *E. coli* ที่ได้มาเจือจางให้เหลือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ZYM-5052 (Studier, 2005) เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน นำไปเพาะเลี้ยง โดยแบ่งการเพาะเลี้ยงเป็น 3 รูปแบบ คือ แบบที่ 1 เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบบที่ 2 เลี้ยงที่ 18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแบบที่ 3 เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้น

นำไปเลี้ยงต่อที่ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็วรอบเท่าเดิม

2.4 การสกัดและทำให้โปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีลโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* บริสุทธิ์เบื้องต้น

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงและกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนแล้วไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายด้วยสารละลายไลซิส (lysis buffer) (20 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol, 50 mM KCl, 20 % glycerol) จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเสียงความถี่สูง (sonication) แบ่งสารละลายเซลล์บางส่วนเพื่อใช้เป็นตัวอย่างของโปรตีนทั้งหมด ส่วนที่เหลือนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกส่วนใสกับตะกอนออกจากกัน แบ่งส่วนใสบางส่วนเพื่อใช้เป็นตัวอย่างของโปรตีนในส่วนละลายน้ำ ส่วนที่เหลือมาสกัดโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีลโพลีกลูตาเมตซินเทสด้วยการเติม glutathione sepharose 4 fast flow resin ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ผสมทุก 2-3 นาที แล้วล้างด้วยสารละลายไลซิส 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบโปรตีนต่อไป ส่วนของตะกอนที่ได้ นำไปล้างด้วยสารละลายไลซิสอีก 4 ครั้ง และละลายในสารละลายไลซิส จากนั้นวัดความเข้มข้นโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) ตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดนำมาตรวจสอบการแสดงออกโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีลโพลีกลูตาเมตซินเทสด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Shapiro *et al.*, 1967)

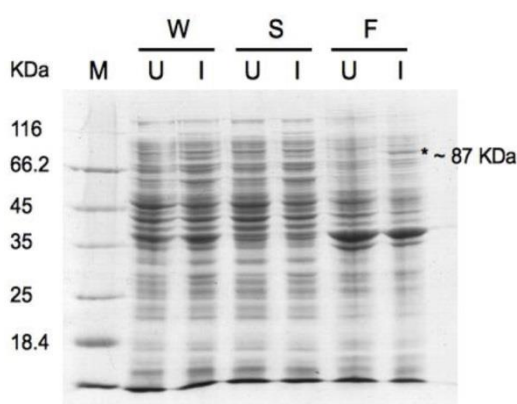
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การแสดงออกโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีลโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* โดยใช้ IPTG เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออก

จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ พบว่า เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีลโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* แต่พบปัญหาคือโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ โดยในงานวิจัยที่ผ่านมาใช้น้ำโปรตีนที่เชื่อมกับฮิสทีดีน 6 ตัว (histidine tag) ซึ่งอาจมีส่วนทำให้โปรตีนอยู่ในส่วนไม่ละลายน้ำได้ (Coetzee, 2003; Human, 2007; Wang *et al.*, 2010) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้ทดลองแสดงออกโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีลโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* โดยใช้ระบบแสดงออก pGEX ซึ่งโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีลโพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* จะเชื่อมต่อกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรส เพื่อช่วยให้โปรตีนที่สร้างขึ้นมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นได้ (Smith and Johnson, 1988) โดยกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสจะเชื่อมอยู่ทางด้านหมู่อะมิโน (N-terminus)

ในช่วงแรกได้กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าได้แถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 87 กิโลดาลตัน (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นขนาดที่คาดการณ์ของโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีลโพลีกลูตาเมตซินเทสที่เชื่อมกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสจากการคำนวณโดยโปรแกรม compute pi/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/) ที่ขนาด 86.73 กิโลดาลตัน ในขณะที่ถ้าไม่กระตุ้นด้วย IPTG ก็จะได้โปรตีนขนาด 87 กิโลดาลตัน นี้ อย่างไรก็ตาม

ตามจากรูปที่ 2 นั้น จะพบว่าโปรตีนขนาดประมาณ 87 กิโลดาลตัน ที่ได้เกือบทั้งหมดนั้นแสดงออกอยู่ในส่วนโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากเซลล์ (whole protein, W) หรือในส่วนของตะกอนหรือส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (F) แต่ไม่พบโปรตีนในส่วนที่ละลายน้ำ (soluble fraction, S) ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Coetzee (2003) Human (2007) และ Wang *et al.* (2010) ซึ่งศึกษาในระบบการแสดงออก pET ที่ได้โปรตีนในส่วนไม่ละลายน้ำเป็นส่วนมาก



รูปที่ 2 การแสดงออกของโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ที่เชื่อมกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรส โดยการกระตุ้นด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (M = unstained protein molecular weight marker, W = โปรตีนทั้งหมด, S = โปรตีนในส่วนที่ละลายน้ำ, F = โปรตีนในส่วนของตะกอนไม่ละลายน้ำ, U = ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG, I = ถูกกระตุ้นด้วย IPTG, KDa = กิโลดาลตัน)

เพื่อให้ได้โปรตีนในรูปละลายน้ำได้สำหรับนำไปสกัดบริสุทธิ์และใช้ในการศึกษาต่อไป ผู้วิจัยจึงทำการลดอุณหภูมิในระหว่างการกระตุ้น

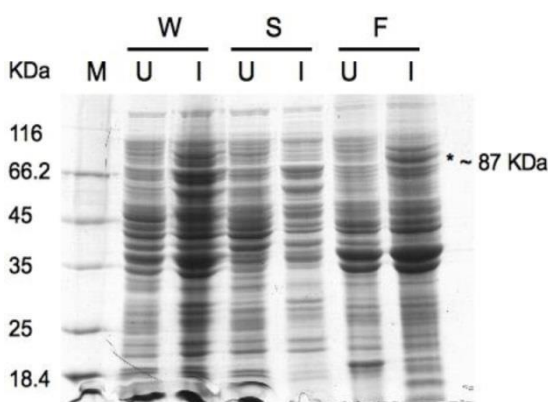
การแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ *E. coli* เจริญเติบโตและสร้างโปรตีนในรูปแบบละลายน้ำมากขึ้น แต่ผลการทดลองพบว่าการกระตุ้นการแสดงออกที่อุณหภูมิต่ำดังกล่าวไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสที่เชื่อมกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสเลย ทั้งในส่วนของโปรตีนทั้งหมด หรือส่วนละลายน้ำ หรือส่วนของตะกอน (ไม่แสดงผล)

เพื่อเป็นการยืนยันว่าผลการทดลองที่ได้ข้างต้นไม่ได้เป็นผลมาจากระบบการทดลองที่ไม่ดี ผู้วิจัยจึงได้ทดลองกระตุ้นการแสดงออกของกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสในพลาสมิดตั้งต้น pGEX-4T-1 โดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสได้ ซึ่งมีขนาด 25 กิโลดาลตัน และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย glutathione sepharose 4 fast flow resin ก็ได้โปรตีนที่ประมาณ 25 กิโลดาลตัน (ไม่แสดงผล)

3.2 การแสดงออกโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* โดยใช้ระบบการแสดงออกอัตโนมัติ (autoinduction)

จากการศึกษาของ Human (2007) พบว่าการกระตุ้นการแสดงออกอัตโนมัติ สามารถช่วยให้โปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* มีการแสดงออกที่มากกว่าการกระตุ้นด้วย IPTG แต่โปรตีนที่ได้ยังคงอยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นเพื่อปรับปรุงการแสดงออกของโปรตีน ผู้วิจัยได้ทำการปรับระบบการกระตุ้นการแสดงออกโปรตีนจากการเติม IPTG มาเป็นระบบการแสดงออกอัตโนมัติด้วยสูตรอาหาร ZYM-5052 (Studier, 2005) ซึ่งเมื่อทำการเลี้ยง *E.*

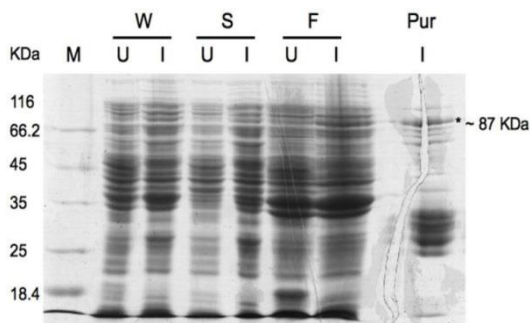
coli ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีฟอสฟอริลกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ที่เชื่อมกับกลูตาไรโอนเอส-ทรานสเฟอเรสเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3) แต่โปรตีนขนาดประมาณ 87 กิโลดาลตันที่ได้เกือบทั้งหมดยังอยู่ในส่วนโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากเซลล์ และในส่วนของตะกอนหรือส่วนโปรตีนที่ไม่ละลาย ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนในส่วนละลายน้ำ เมื่อทำการเลี้ยง *E. coli* และกระตุ้นที่ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบการแสดงออกของโปรตีนในส่วนละลายน้ำเช่นกัน แต่ปริมาณที่ได้น้อยกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส (ไม่แสดงผล)



รูปที่ 3 การแสดงออกของโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีฟอสฟอริลกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ที่เชื่อมกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยระบบกระตุ้นการแสดงออกอัตโนมัติ (M = unstained protein molecular weight marker, W = โปรตีนทั้งหมด, S = โปรตีนในส่วนที่ละลายน้ำ, F = โปรตีนในส่วนของตะกอนไม่ละลายน้ำ, U = ไม่ถูกกระตุ้น, I = ถูกกระตุ้น, KDa = กิโลดาลตัน)

จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 3 ซึ่งแสดงปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยง *E. coli* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารกระตุ้นการแสดงออกอัตโนมัติ ผู้วิจัยจึงได้ทำการเลี้ยง *E. coli* ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสูตรอาหารกระตุ้นการแสดงออกอัตโนมัติเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้โปรตีนแสดงออกในเบื่องต้น จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โปรตีนในส่วนละลายน้ำมากขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 4 พบโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีฟอสฟอริลกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ที่เชื่อมกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสขนาด 87 กิโลดาลตัน ในส่วนโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากเซลล์ ในส่วนของตะกอนหรือส่วนโปรตีนที่ไม่ละลาย และพบบางส่วนในส่วนละลายน้ำ และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย glutathione sepharose 4 fast flow resin (รูปที่ 4 แถว pur) พบขนาดโปรตีนที่ประมาณ 87 กิโลดาลตัน อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าระบบการแสดงออก pGEX ร่วมกับการกระตุ้นการแสดงออกแบบอัตโนมัติสามารถที่จะผลิตโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีฟอสฟอริลกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ที่เชื่อมกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสให้อยู่ในส่วนละลายน้ำได้ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นแถบโปรตีนขนาดระหว่าง 25-35 กิโลดาลตัน แสดงขึ้นมาหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย glutathione sepharose 4 fast flow resin โปรตีนเหล่านั้นจะเป็นโปรตีนจาก *E. coli* ที่ถูกกระตุ้นและอาจสามารถจับกับ glutathione sepharose 4 fast flow resin หรืออาจเป็นโปรตีนกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสเองที่ถูกตัดออกมา ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเลี้ยง *E. coli* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนมาเลี้ยงต่อที่ 18 องศาเซลเซียส จึงทำให้โปรตีนที่ไม่เสถียรถูกตัดและได้โปรตีนขนาดเล็กนี้มา อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้เป็นการ

ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในเบื้องต้น ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องมีขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อให้ได้โปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* สำหรับการนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 4 การแสดงออกของโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* ที่เชื่อมกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรส โดยระบบกระตุ้นการแสดงออกอัตโนมัติที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมงต่อด้วยที่ 18 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (M = unstained protein molecular weight marker, W = โปรตีนทั้งหมด, S = โปรตีนในส่วนที่ละลายน้ำ, F = โปรตีนในส่วนของตะกอนไม่ละลายน้ำ, U = ไม่ถูกกระตุ้น, I = ถูกกระตุ้น, Pur = โปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย glutathione sepharose 4 fast flow resin, KDa = กิโลดาลตัน)

4. สรุป

พลาสมิด pGEX.PDHFS ที่มียีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* เชื่อมต่อกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสถูกสร้างขึ้นและนำไปแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ได้โปรตีนขนาดประมาณ 87

กิโลดาลตัน เมื่อกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้สูตรอาหารกระตุ้นการแสดงออกอัตโนมัติ ZYM-5052 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปกระตุ้นต่อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้โปรตีนไดไฮโดรโฟเลตซินเทส-โพลีกลูตาเมตซินเทสของ *P. falciparum* เชื่อมต่อกับกลูตาไรโอน เอส-ทรานสเฟอเรสในส่วนละลายน้ำและสามารถทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นได้ด้วย glutathione sepharose 4 fast flow resin

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากฝ่ายบริหารจัดการคลัสเตอร์และโปรแกรมวิจัยสำนักบริหารจัดการคลัสเตอร์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (รหัสโครงการ P1010506 และ P1100673)

6. เอกสารอ้างอิง

- Bradford, M.M., 1976, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Coetzee, L., 2003, *Plasmodium falciparum* dihydrofolate synthase-folypolyglutamate synthase (DHFS-FPGS): Gene synthesis and recombinant expression, M.S. thesis, University of Pretoria, Pretoria.
- Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Arie, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An,

- S.S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N.P., Lindegardh, N., Socheat, D. and White, N.J., 2009, Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria, N. Engl. J. Med. 361: 455-467.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison III, C.A. and Smith, H.O., 2009, Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases, Nat. Methods 6: 343-345.
- Human, E., 2007, Kinetic analysis of a recombinantly expressed *Plasmodium falciparum* dihydrofolate synthase-folypolyglutamate synthase, M.S. thesis, University of Pretoria, Pretoria.
- Krungkrai, J., Webster, H.K. and Yuthavong, Y., 1989, *De novo* and salvage biosynthesis of pteroylpentaglutamates in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, Mol. Biochem. Parasitol. 32: 25-37.
- McGuire, J.J. and Coward, J.K., 1984, Chemistry and biochemistry of folates, pp. 135-190, In Blakley, R.L. and Benkovic S.J. (Eds.), Folates and Pterins, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Muller, I.B., Hyde, J.E., and Wrenger, C., 2009, Vitamin B metabolism in *Plasmodium falciparum* as a source of drug targets, Trends Parasitol. 26: 35-43.
- Muller, I.B. and Hyde, J.E., 2013, Folate metabolism in human malaria parasites-75 years on, Mol. Biochem. Parasitol. 188: 63-77.
- Pyne, C. and Bognar, A.L., 1992, Replacement of the *folC* gene, encoding folypolyglutamate synthetase-dihydrofolate synthetase in *Escherichia coli*, with genes mutagenized *in vitro*, J. Bacteriol. 174: 1750-1759.
- Salcedo, E., Cortese, J.F., Plowe, C.V., Sim, P.F.G. and Hyde, J.E., 2001, A bifunctional dihydrofolate synthetase-folypolyglutamate synthetase in *Plasmodium falciparum* identified by functional complementation in yeast and bacteria, Mol. Biochem. Parasitol. 112: 239-252.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E. and Maizel, J.V. Jr., 1967, Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 815-820.
- Sirawaraporn, W., 1998, Dihydrofolate reductase and antifolate resistance in malaria, Drug Resist Updates 1: 397-406.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S., 1988, Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase, Gene 67: 31-40.
- Studier, F.W., 2005, Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expr. Purif. 41: 207-234.
- Triglia, T., Menting, J.G.T., Wilson, C. and Cowman, A.F., 1997, Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 13944-13949.

Wang, P., Wang, Q., Aspinall, T.V., Sim P.F. and Hyde, J.E., 2004, Transfection studies to explore essential folate metabolism and antifolate drug synergy in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, Mol. Microbiol. 51: 1425-1438.

Wang, P., Wang, Q., Yang, Y., Coward, J.K., Nzila, A., Sim, F.G. and Hyde, J.E., 2010,

Characterisation of the bifunctional dihydrofolate synthase-folypolyglutamate synthase from *Plasmodium falciparum*: A potential novel target for antimalarial antifolate inhibition, Mol. Biochem. Parasitol. 172: 41-51.

World Health Organization, 2011, World Malaria Report 2011, WHO: Geneva, Switzerland.