

นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตและเตรียมให้บริสุทธิ์โปรตีน MSP₁₉ ของเชื้อพลาสมาเดียม โยอีเลียส ระยะเมโรซอยท์ ในรูปของ FLAG Fusion Protein จากยีสต์ แชนคาโรมายเซส เซรีวีเซีย

ศุภชัย ตักคิจจรภพ* , สาริต พิชยางกูร**, จักรกริช หิรัญเพชรรัตน์***

บทคัดย่อ

ความเป็นมา : MSP₁₉ เป็นโปรตีนส่วนปลายคาร์บอนของโปรตีน Merozoite surface protein-1 (MSP1) ซึ่งอยู่บนผิวของเมโรซอยท์ (เชื้อมาลาเรียระยะติดเชื้อในเลือด) มีน้ำหนักโมเลกุล 19 กิโลดาลตัน สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูและลิงให้ป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ MSP₁₉ ที่ใช้ในการทดลองดังกล่าวสร้างจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม ในรูปของ Glutathione-S-transferase (GST)-MSP₁₉ หรือ His₆-MSP₁₉ ตามลำดับ

วิธีการ : ผลิต FLAG-MSP₁₉ fusion protein จากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยมี FLAG peptide ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนแปดตัวเชื่อมต่อยู่ทางด้าน N-terminus ในการผลิต FLAG-MSP₁₉ จากเชื้อยีสต์ เริ่มแรกนำยีสต์ที่สร้าง FLAG-MSP₁₉ มาคัดเลือกเพื่อให้ได้โคลนที่สร้างโปรตีน FLAG-MSP₁₉ ปริมาณสูง แล้วทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพดีที่สุด และประหยัด การเตรียมให้บริสุทธิ์ทำโดยผ่าน Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column และทดสอบคุณสมบัติของ FLAG-MSP₁₉ ที่เตรียมได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และวิธี Western blot

ผลการทดลอง : ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์คือ 48 ชั่วโมง ปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ได้ < 30 มล. สามารถจับกับ gel ได้หมด แต่เมื่อใช้ 40 มล. พบว่าเตรียม FLAG-MSP₁₉ ได้ปริมาณมากกว่าและมีค่า % yield สูงกว่า ผลการทดสอบด้วย SDS-PAGE พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว และอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกับ His₆-MSP₁₉ และทำปฏิกิริยากับ Anti-His₆-MSP₁₉ serum, Anti-*P. yoelii* hyperimmune serum และ Mab 302 เมื่อทดสอบด้วย Western blot

สรุป : สามารถสร้าง MSP₁₉ ขึ้นในรูป FLAG-MSP₁₉ ซึ่งประกอบด้วยส่วนของแอนติเจนที่ถูกต้องเหมือนกับในธรรมชาติได้ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2543; 33: 161-71.

คำรหัส : มาลาเรีย, ออฟฟิโนโครมาโตกราฟี, MSP1, FLAG

* ฝ่ายวิจัยโรคติดเชื้อมะเร็งและโรคเขตร้อน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

** ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารบก ฝ่ายสหรัฐ กรุงเทพฯ

*** งานจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

Abstract : Production and Purification of the 19-kDa Carboxyl-terminal Fragment of *Plasmodium yoelii* Merozoite Surface Protein-1 (MSP1₁₉) as a FLAG Fusion Protein Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*

Sakkhachornphop S* , Pichyangkul S**, Hirunpetcharat C***

Background : The 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein-1 (MSP1₁₉), a leading malaria vaccine candidate, can induce protective immunity in mice and monkeys against challenge infection. The *Plasmodium yoelii* MSP1₁₉ can produce from *Escherichia coli* as a glutathione-S-transferase (GST)-MSP1₁₉ or from *Saccharomyces cerevisiae* as His6-MSP1₁₉.

Methods : MSP1₁₉ as a FLAG fusion protein (FLAG-MSP1₁₉) was produced from *S. cerevisiae*. The FLAG peptide composes of 8 amino acids and is linked to the N-terminus of MSP1₁₉. After selectively cloned FLAG-MSP1₁₉-expressed yeast, we optimized the conditions for production. The FLAG-MSP1₁₉ was purified by passing yeast-culture supernatant through an anti-FLAG M1 antibody agarose gel column and characterized by SDS-PAGE and Western blot.

Results : The optimal culture incubation time is 48 h. In passing through the anti-FLAG column, up to 30 mL of yeast culture supernatant of all FLAG-MSP1₁₉ bound to the gel. However, application of 40 mL of the supernatant gave more yield recovery after elution from the column. By SDS-PAGE, there was a single band with similar level as His₆-MSP1₁₉. By Western blot, FLAG-MSP1₁₉ reacted to anti-His₆-MSP1₁₉ serum, anti-*P. yoelii* hyperimmune serum, and Mab 302.

Conclusion : These results indicate that MSP1₁₉ can be constructed with a correct configuration in a form of FLAG-MSP1₁₉ fusion protein. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2000; 33: 161-71.

Key words: Malaria, affinity chromatography, MSP1, FLAG

* Division of Infectious and Tropical diseases, Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai.

** Department of Immunology, US. Armed Forces Research Institute of Medical Science, Bangkok.

*** Department of Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University, Bangkok.

บทนำ

MSP1 เป็นโปรตีนอยู่บนผิวของเมอโรซอยท์ (Merozoite) มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 190–230 กิโลดาลตัน แล้วแต่ชนิดของพลาสโมเดียม MSP1 สร้างขึ้นในระหว่างที่เชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดง ในขณะที่เมอโรซอยท์กำลังหลุดจากเม็ดเลือดแดงเอนไซม์จะตัด MSP1 ให้เป็นโปรตีนชิ้นเล็ก ๆ มีชื่อเรียกตามน้ำหนักโมเลกุลดังนี้ MSP1₈₃, MSP1₃₀, MSP1₃₈ และ MSP1₄₂ ซึ่ง MSP1₄₂ จะถูกตัดด้วยเอนไซม์อีกครั้งขณะที่เมอโรซอยท์จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงอันใหม่ เป็น MSP1₃₃ และ MSP1₁₉ สำหรับโปรตีน MSP1₁₉ เท่านั้นที่ยังเกาะติดกับผิวเมอโรซอยท์ ส่วนโปรตีนท่อนอื่น ๆ จะถูกสลัดออกไป¹ ลำดับกรดอะมิโนของ MSP1₁₉ ของเชื้อมาลาเรียต่างสายพันธุ์ (Strain) มีความเหมือนกันมาก (High conserved) อย่างเชื้อ *P. falciparum* มีการดอะมิโนเพียง 7 ตัวเท่านั้น ใน 120 ตัวที่ไม่เหมือนกัน^{2,3}

การศึกษาภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย โดยการกระตุ้นด้วยโปรตีน MSP1₁₉ ทั้งในหนูทดลองและลิงพบว่า MSP1₁₉ สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย *P. yoeli*⁴⁻⁶ และ *P. falciparum*⁷ ได้ตามลำดับ MSP1₁₉ ที่ใช้ในการทดลองดังกล่าวเตรียมโดยวิธีพันธุวิศวกรรมจาก *E. coli* รูปของ Glutathione-S-transferase (GST)-MSP1₁₉ และจากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในรูปของ His₆-tagged MSP1₁₉^{7,8} การป้องกันของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นอาศัยแอนติบอดีเป็นหลัก จากการทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้หนูทดลองปกติด้วย MSP1₁₉ พบว่าหนูสร้างแอนติบอดีต่อ MSP1₁₉ ได้สูงมาก และเมื่อกำจัด CD4⁺ T cells ของหนูพบว่าหนูยังคงป้องกันการติดเชื้อได้ และหนู B cell knockout mice ซึ่งไม่มี B cells ในร่างกาย เมื่อนัดด้วย MSP1₁₉ ไม่สามารถ

ป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้⁶ นอกจากนี้ การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย CD4⁺ T cell epitope peptides หรือ การถ่าย CD4⁺ T cells ที่จำเพาะกับ MSP1₁₉ ให้กับหนูที่ไม่มีภูมิคุ้มกันมาก่อน ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้⁹

ในการศึกษานี้ได้สร้างยีสต์ที่สร้าง MSP1₁₉ ออกมาในรูป FLAG-MSP1₁₉ fusion protein โดยใช้ N-terminal yeast FLAG expression kit โดย *S. cerevisiae* ได้ออกแบบมาสำหรับการเชื่อมต่อ FLAG peptide เข้ากับโปรตีนที่ต้องการ (ในที่นี้คือ MSP1₁₉) ทางด้าน N-terminus และได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ดังกล่าวเพื่อให้ยีสต์สามารถสร้าง FLAG-MSP1₁₉ fusion protein ออกมาอย่างมีประสิทธิภาพ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก FLAG-MSP1₁₉ จากน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ให้บริสุทธิ์

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. การคัดเลือกโคลนของยีสต์ที่ผลิต MSP1₁₉ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง

ยีสต์ที่สร้าง FLAG-MSP1₁₉ fusion protein สร้างขึ้นที่สถาบัน Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia โดยใช้ N-Terminal Yeast FLAG Expression kit (Scientific Imaging System, Kodak)¹⁰ ตามวิธีการที่ระบุไว้ นำยีสต์ที่ได้มาเลี้ยงแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD agar (ประกอบด้วย 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose และ 2% agar) ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 2–3 วัน จากนั้นเลือกมา 10 โคโลนี เลี้ยงใน YPD liquid medium (ประกอบด้วย 1% yeast extract, 2% peptone, และ 2% dextrose) ที่ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเขย่าที่ 250 รอบต่อนาทีด้วยเครื่อง Orbital incubator shaker (GYROMAX™ 732R Amerex

Instruments Inc.) หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ (Culture supernatant) ไปปั่นที่ 5,000 g 30 นาที แล้วทดสอบหาปริมาณ MSP1₁₉ ที่ยีสต์สร้างขึ้น โดยวิธี ELISA จากนั้นเลือกโคลนที่สร้าง MSP1₁₉ ได้ดีมาเลี้ยงแยกเชื้อต่อบน YPD agar อีกครั้งที่ 30°C เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำเชื้อจากเลี้ยง 10 โคลนี ไปเลี้ยงใน YPEM (ประกอบด้วย 1% dextrose, 3% glycerol, 1% yeast extract, และ 2% peptone) ที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเขย่า 250 รอบต่อ นาที เมื่อครบเวลาเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไปตรวจหา FLAG peptide และ MSP1₁₉ โดยทำปฏิกิริยากับ Anti-FLAG M1 mAb และ Anti-MSP1₁₉ serum โดยวิธี ELISA

ในการทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง เชื้อยีสต์ นำเชื้อยีสต์เลี้ยงใน YPEM ที่ 28°C เป็น เวลา 24 ชั่วโมงและเขย่า 250 รอบต่อ นาที จากนั้นถ่ายลงใน YPHSM (1% dextrose, 3% glycerol, 1% yeast extract, และ 8% peptone) ความเข้มข้น 5% yeast culture และเลี้ยงที่ 28°C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อ ครบเวลานำไปปั่นที่ 5,000 g 30 นาที (SORVALL, DUPONT instruments) นำไปทดสอบหาปริมาณ MSP1₁₉ โดยวิธี ELISA และทดสอบหาปริมาณ กลูโคส ความเป็นกรด-ด่าง และหาปริมาณโปรตีน โดย Labstix® (BAYER)

2. การทดสอบหาปริมาณ MSP1₁₉ และ FLAG peptide ในน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์โดยวิธี ELISA

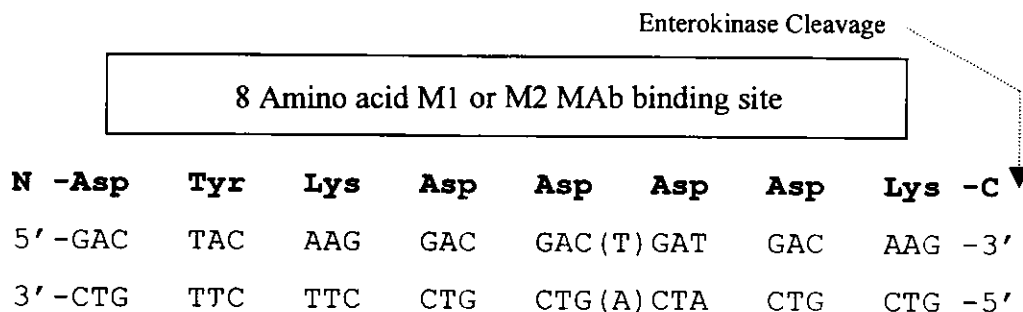
นำน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ต่าง ๆ ก่อนนำมาใส่ในหลุมของ ELISA plate (Maxisorp™ immunoplat, NUNC) หลุมละ 100 µL ที่ 4°C หนึ่งคืน ล้างด้วย 0.05% Tween20/PBS 4 ครั้ง เติมด้วย 1%BSA/ PBS หลุมละ 200 µL ที่ 37°C 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเอา Blocking

solution ออก แล้วเติม Anti-MSP1₁₉ serum เจือ จาง 1/1,000 หรือ Anti-FLAG M1 MAb เจือจาง 1/4,000 หลุมละ 100 µL ตั้งไว้ที่ 37°C 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้าง 4 ครั้ง แล้วเติม HRP-conjugated goat anti-mouse Igs (Organon Teknika Corp Biotel, Holland.) เจือจาง 1/3,000 หลุมละ 100 µL ตั้งไว้ที่ 30°C 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้าง 4 ครั้ง แล้วเติม OPD substrate solution หลุมละ 100 µL ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N H₂SO₄ หลุมละ 50 µL อ่าน ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง CERES UV900 Hdi (Biotek Instruments Inc.) สำหรับการหา FLAG peptide ใช้วิธีการเดียวกัน ยกเว้นใช้ Blocking solution เป็น 1% BSA/TBS/ Ca และ Washing solution เป็น 0.05% Tween20/ TBS/Ca

3. การเตรียม MSP1₁₉ ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column

นำน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ไป Dialyse ใน 0.85% NaCl (Normal saline) ที่ 4°C อย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อกำจัด Phosphate ซึ่งมีอยู่ในอาหารเลี้ยงยีสต์ จากนั้น กรองด้วยแผ่นกรอง ขนาด 0.22 µm เติม 10x TBS/ Ca (0.5 M Tris pH 7.4, 1.5 M NaCl, 100 mM CaCl₂) ลงไป 1 ส่วนรวมกับ 9 ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ ยีสต์ จากนั้นเตรียม Anti-FLAG M1 antibody gel column โดยปั่นล้างที่ 750 g 2 นาที (KUBOTA 5200) ด้วย 0.1M glycine HCl pH 3.5 อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตร Gel จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วย TBS (50 mM Tris pH7.4 , 0.15 M NaCl) อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตร Gel จำนวน 3 ครั้ง เมื่อล้างเสร็จนำมาผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตรต่างๆ คือ 10, 20, 30 และ 40 mL วาง บนเครื่องโยก (Model VRN-200) ที่อุณหภูมิ 4°C

FLAG Marker Peptide



รูปที่ 1 ลักษณะและองค์ประกอบของ FLAG peptide

เป็นเวลาหนึ่งคืนและปั่นล้างด้วย TBS/Ca อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตรเจล จำนวน 3 ครั้ง ที่ 750 g 2 นาที แล้วผสมเจลที่ล้างแล้วใน TBS/Ca 5 mL บรรจุลงใน Column ปลอ่ยให้ Buffer ไหลอย่างอิสระ จากนั้นเติม 0.1M glycine HCl pH 3.5 ลงใน Column และเก็บสารละลายที่ไหลผ่าน Column ออกมาในหลอดทดลอง 6 หลอด ๆ ละ 1 mL ซึ่งมี 1 M Tris pH 8.0 อยู่ 1-2 หยดเพื่อปรับ pH ของสารละลายที่ผ่านออกมาให้เป็นกลาง เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วล้างเจลด้วย TBS อย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตรเจล จำนวน 3 ครั้ง แล้วเก็บรักษาเจล ไว้ใน 0.02% NaN_3 /TBS แล้วทดสอบหาปริมาณ MSP₁₉ ที่ได้โดยวิธี ELISA และคำนวณค่า % Recovery

4. การทดสอบความบริสุทธิ์ของ MSP₁₉ โดยวิธี SDS-PAGE และ Western Blot

การทดสอบความบริสุทธิ์ของ MSP₁₉ ที่เตรียมขึ้นเองเปรียบเทียบกับ His₆-tagged MSP₁₉ ที่ผลิตขึ้นจากห้องปฏิบัติการของ David Kaslow⁸ โดยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งใช้ 12.5 % running acrylamide gel และ 5% stacking acrylamide gel นำโปรตีนผสมกับ

5x SDS buffer และต้มในน้ำเดือด 5 นาทีก่อนหยอดลงบนเจล ที่ประกอบกับเครื่องเรียบร้อยแล้วใน Chamber บนและล่างใส่ Electrophoresis buffer pH 8.3 (Tris 3.03 g, Glycine 14.4 g, SDS 1.0 g และน้ำกลั่น 1,000 mL) แล้วปลอ่ยกระแสไฟฟ้าผ่านในช่วงแรก 120 โวลท์ ในช่วงที่โปรตีนวิ่งใน Stacking gel เมื่อโปรตีนเคลื่อนเข้าสู่ Running gel ปรับกระแสไฟฟ้าเป็น 200 โวลท์ จนกระทั่งโปรตีนวิ่งไปถึงปลายด้านล่างของเจล จึงปิดกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจล มาทำ Blotting เพื่อถ่ายโปรตีนลงบนแผ่น Nitrocellulose นำส่วนหนึ่งนำไปย้อมโปรตีนด้วย 0.1% Amido black และอีกส่วนหนึ่งที่เหมือนกันนำไปทำ Western blot

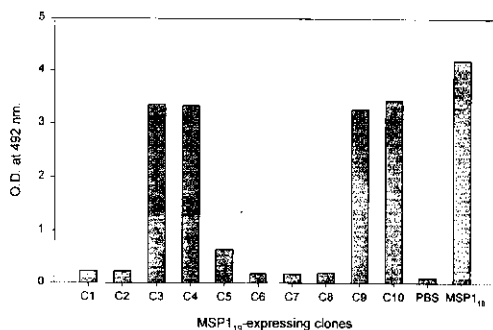
ในการทำ Western blot เริ่มจากนำ Nitrocellulose ที่ Blot protein เรียบร้อยแล้ว Block ด้วย 5% skim milk 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 0.05% Tween20/PBS แล้วเติมแอนติบอดีต่าง ๆ คือ Anti- MSP₁₉ serum⁶ ความเข้มข้น 1/200, Anti- *P. yoelii* YM hyperimmune serum¹¹ ความเข้มข้น 1/200 และ Mab 302 (Anti- MSP₁₉ mAb)¹² ความเข้มข้น 10 µg/mL เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ครบเวลาล้างด้วย Buffer แล้วเติม HRP-conjugated goat anti-mouse Igs ที่ความ

เข้มข้น 1/300 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม DAB substrate solution 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่น Nitrocellulose ด้วยน้ำกลั่น

ผลการทดลอง

1. ผลการคัดเลือกโคลนของยีสต์ที่ผลิต MSP1₁₉

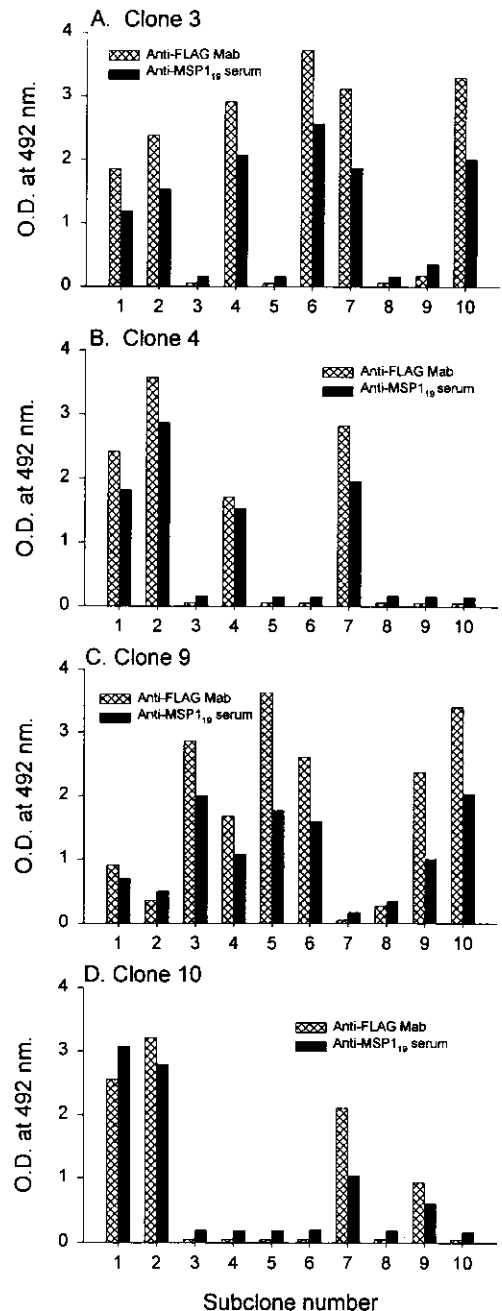
เมื่อเริ่มแรกได้นำยีสต์มาเลี้ยงบน Agar plate และนำโคลนที่ขึ้นไปเลี้ยงใน YPD broth แล้วนำ supernatant ที่ได้มาหาระดับ MSP1₁₉ ด้วยวิธี ELISA พบว่า 4 ใน 10 โคลนที่สร้าง MSP1₁₉ ได้ในระดับที่สูง คือ โคลน C3, C4, C9 และ C10 (รูปที่ 2) เพื่อให้ได้โคลนที่มีความถาวรในการสร้าง MSP1₁₉ จึงนำโคลนที่ได้ดังกล่าวไปแยกเลี้ยงต่อ พบว่า มีจำนวน 6/10, 4/10, 5/10 และ 3/10 โคลนย่อยจากโคลน C3, C4, C9 และ C10 ตามลำดับที่สร้าง MSP1₁₉ ได้สูงเมื่อใช้เกณฑ์ค่าการดูดกลืนแสง > 0.5 (รูปที่ 3) ในการเตรียม MSP1₁₉ จึงเลือกใช้โคลนที่ 3 โคลนย่อยที่ 6 (ซึ่งเรียกว่าโคลน 3.6) เนื่องจากสร้าง MSP1₁₉ ได้ปริมาณสูง



รูปที่ 2 ระดับการสร้าง FLAG-MSP1₁₉ ของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่แยกคัดเลือกจำนวน 10 โคลน

2. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ผลิต MSP1₁₉

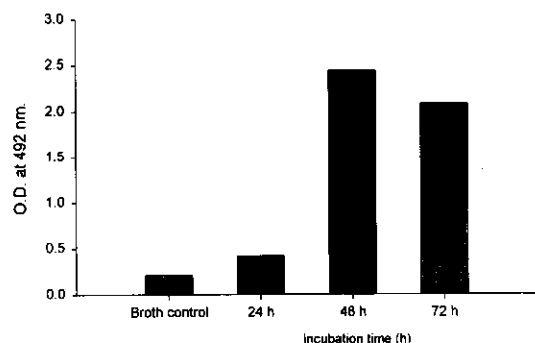
ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์ใน YPHSM broth ที่อุณหภูมิ 28 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อ



รูปที่ 3 ระดับการสร้าง FLAG-MSP1₁₉ ของยีสต์ *S. cerevisiae* จากโคลน C3, C4, C9 และ C10

นาที่ แล้วเก็บ Supernatant ที่ระยะเวลาต่าง ๆ คือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาทดสอบหาปริมาณ MSP1₁₉ ที่สร้างขึ้น พบว่า การเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมงให้ผลการสร้าง MSP1₁₉ ออกมาปริมาณมากที่สุด (รูปที่ 4) โดยมีสภาพความ

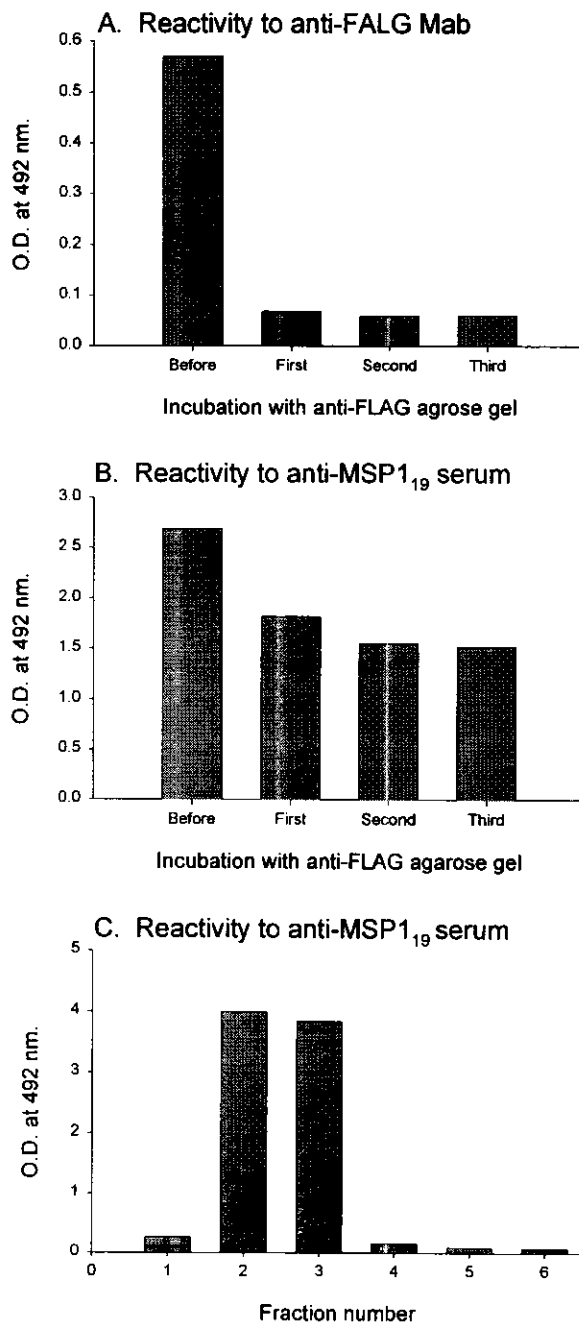
เป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อยังเป็นกลาง และ ปริมาณกลูโคสถูกใช้หมด



รูปที่ 4 การผลิต FLAG-MSP1₁₉ ของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลาต่างๆ

3. ผลการแยก MSP1₁₉ ให้บริสุทธิ์ด้วย Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column

เพื่อทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการแยก MSP1₁₉ ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column จึงนำ Supernatant ที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ข้างต้นปริมาณ 10 mL มา Incubate กับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel ปริมาตร 1 mL ค้างคืนที่ 4°C เก็บ Supernatant ที่ได้ไปผ่านเจล อีก 2 ครั้งใน Column โดยตรง Supernatants ที่เก็บไว้บางส่วนก่อนผ่าน Column (Pre-application) เมื่อผ่าน Column ครั้งที่หนึ่ง (Post first application) เมื่อผ่าน Column ครั้งที่สอง (Post second application) และเมื่อผ่าน Column ครั้งที่สาม (Post third application) นำไปตรวจหา MSP1₁₉ และ FLAG peptide โดยวิธี ELISA (รูปที่ 5) ผลปรากฏว่า MSP1₁₉ ใน Culture supernatant เมื่อผ่าน Column เพียงครั้งเดียวก็ถูกจับได้หมด (รูปที่ 5A และ B) ซึ่งจะเห็นว่าตรวจไม่พบ FLAG peptide และปริมาณ MSP1₁₉ ลดลงอย่างมาก อย่างไรก็ตามยังคงตรวจพบ MSP1₁₉ ใน Culture supernatant เมื่อผ่าน



รูปที่ 5 ผลการจับ FLAG-MSP1₁₉ เมื่อผ่านน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ใน anti-FLAG M1 antibody gel column

Column ครั้งที่ 1, 2 และ 3 อีกทั้งยังมีระดับใกล้เคียงกัน (รูปที่ 5B) แสดงว่า ใน Culture supernatant มี MSP1₁₉ อิสระที่สร้างจากยีสต์ด้วย หลังจากล้าง Column เอาส่วนที่ไม่จับกับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel ออก

หมดแล้ว จึง Elute เอา FLAG-MSP1₁₉ fusion protein ที่จับกับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel ออกด้วย Glycine buffer pH 3.0 และเก็บ 6 fraction ปริมาณ Fraction ละ 1 mL ผลปรากฏว่า โปรตีน FLAG-MSP1₁₉ จะหลุดออกมาใน Fraction ที่ 2 และ 3 (รูปที่ 5C)

จากการทดสอบใช้ Culture supernatant

ในปริมาตรต่างๆ คือ 10, 20, 30 และ 40 mL ในการ Incubate กับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel พบว่า การใช้ Culture supernatant ปริมาตร 40 mL สามารถแยก FLAG-MSP1₁₉ ได้ดีที่สุดโดยมีค่าปริมาณโปรตีนดังกล่าว และค่า % yield สูงสุด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาตรของ Yeast culture supernatant ต่อค่าปริมาณ MSP1₁₉ และ % yield ในการแยก MSP1₁₉ ให้บริสุทธิ์

ปริมาตรของ Yeast culture supernatant	ปริมาณ MSP1 ₁₉ ที่ตรวจพบ (μg)			% Yield of MSP1 ₁₉
	ก่อนผ่าน Column	หลังผ่าน Column	หลัง Elution	
10 mL	43.5	0.0	16.5	38.0
20 mL	45.8	0.0	35.3	77.1
30 mL	74.1	0.0	58.4	78.8
40 mL	157.2	7.2	147.5	93.8

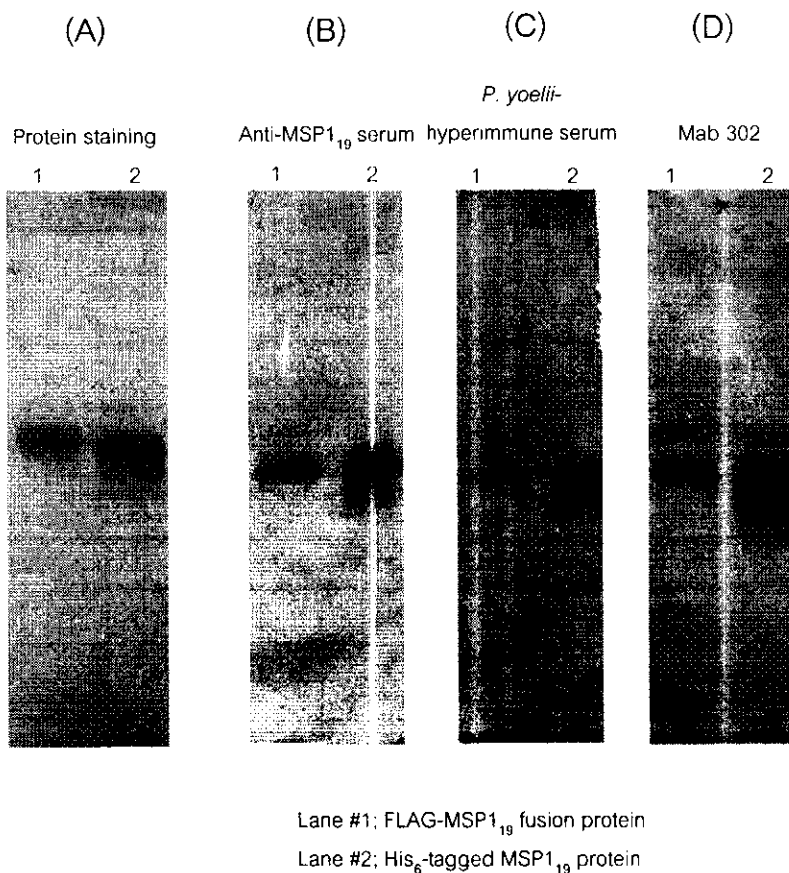
4. การทดสอบความบริสุทธิ์ และการเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ MSP1₁₉

FLAG-MSP1₁₉ ที่เตรียมได้จากการผ่าน Anti-FLAG M1 antibody agarose gel column นำมาทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับ Anti-MSP1₁₉ serum ซึ่งได้จากหนูที่ฉีดด้วย His₆-MSP1₁₉ กับ anti-*P. yoelii* hyperimmune serum ซึ่งได้จากหนูที่ ติดเชื้อ *P. yoelii* และรักษาด้วยยา¹¹ และกับ Mab 302¹² โดยวิธี Western blot ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE มีแถบโปรตีนเกิดขึ้นเพียงแถบเดียว (รูปที่ 6) แสดงว่าโปรตีนที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์สูง จากการทดสอบด้วยวิธี Western blot เกิดแถบโปรตีนให้เห็นแถบเดียวเช่นกันกับแอนติบอดีทั้งสามชนิดแสดงให้เห็นว่า MSP1₁₉ ที่เตรียมได้จากยีสต์ในรูป FLAG-MSP1₁₉ fusion protein มีโครงสร้างที่เหมือน

กับในธรรมชาติและประกอบด้วย Antigenic determinants เหมือนกับ His₆-MSP1₁₉ และที่มีในธรรมชาติด้วย

วิจารณ์

ในการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า MSP1₁₉ สามารถเตรียมขึ้นในรูปของ Recombinant protein จากยีสต์ *S. cerevisiae* ในรูปของ FLAG fusion protein (FLAG-MSP1₁₉) นั่นคือมี FLAG peptide เชื่อมต่อกับ MSP1₁₉ ทางปลายด้าน Amino FLAG peptide นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 8 ตัวคือ Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญที่สามารถจับกับ Anti-FLAG M1 (IgG2b) หรือ Anti-FLAG M2 (IgG1) monoclonal antibody ได้ ซึ่งมีประโยชน์ในขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ (Affinity purification) โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ต้องการผลิต และการตรวจหา



รูปที่ 6 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของ FLAG-MSP₁₉ โดยวิธี SDS-PAGE และการทำปฏิกิริยากับ Anti-MSP₁₉ antibodies โดยวิธี Western blot

FLAG fusion proteins ด้วยวิธีการทางภูมิคุ้มกัน (Immunological detection) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์อื่น ๆ ได้แก่ FLAG peptide สามารถตัดออกได้ด้วย Enterokinase ทำให้สามารถเตรียมโปรตีนที่ต้องการโดยไม่มี FLAG peptide ติดอยู่ได้ โดยโปรตีนดังกล่าวยังคงมีโครงสร้างเหมือนเดิม เป็นต้น

การเลี้ยง Recombinant yeast ให้ได้ผลผลิตที่ดีมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องมีการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง การศึกษานี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPHSM ซึ่งประกอบด้วย Dextrose, Glycerol, Yeast extract, Peptone และ Calcium chloride ซึ่งให้ผลดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ YPEM ซึ่งไม่มี Calcium chloride

และมีปริมาณ Peptone น้อยกว่า 4 เท่า¹⁰ นอกจากนี้ยังพบว่าการเลือกใช้ Peptone ก็มีผลต่อการผลิตที่ได้ด้วย กล่าวคือ การใช้ Water peptone ซึ่งมี Phosphate buffer อยู่ด้วยจะได้ผลผลิตที่ดีกว่า (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ในด้านเทคนิคการเลี้ยงได้แสดงให้เห็นว่า การเลี้ยงเชื้อยีสต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่ 28°C โดยเขย่า 250 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณผลผลิตของ MSP₁₉ มากที่สุด (รูปที่ 4) และในช่วงเวลาดังกล่าวน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ยังอยู่ในสภาวะที่เป็นกลางเหมาะสมกับสภาพโปรตีนอีกด้วย

การแยก FLAG-MSP₁₉ ให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์มีข้อสำคัญที่ควรระวังคือ ก่อนการเตรียม MSP₁₉ ให้บริสุทธิ์จะต้องนำน้ำเลี้ยงเชื้อไป Dialyse ใน 0.85% NaCl เพื่อกำจัด Phos-

phate ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจเกิดตะกอนของ Calcium phosphate ในขั้นตอนการทำ Affinity chromatography โดยใช้ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel ซึ่งจะมี CaCl_2 อยู่ใน Buffer ด้วย ในการทำ Dialysis ยังช่วยลดความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ลงไปได้มาก ก่อนที่จะนำไปผ่าน Affinity column สำหรับเตรียม MSP1₁₉ ให้บริสุทธิ์ และข้อสำคัญอีกประการหนึ่งคือ ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง FLAG กับ Anti-FLAG antibody ต้องอยู่ในสภาวะที่มี Calcium chloride อย่างน้อย 1 mM

การศึกษานี้ได้ทดสอบหาปริมาณของน้ำเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Anti-FLAG M1 antibody agarose gel 1 มล. พบว่าสามารถใช้ น้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ได้ถึง 40 มล. ต่อ เจล 1 มล. (ตารางที่ 1) ซึ่งในปริมาตรนี้มี FLAG-MSP1₁₉ เหลือเพียงเล็กน้อยหลังจาก Incubate กับ เจล และให้ FLAG-MSP1₁₉ ในปริมาณที่สูงเมื่อถูก Elute จาก เจล นั่นคือ มีค่า Protein recovery สูง

คำถามที่สำคัญเมื่อได้โปรตีน FLAG-MSP1₁₉ ก็คือโปรตีนดังกล่าวมีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด และมีคุณสมบัติเหมือนกับที่มีอยู่ในธรรมชาติหรือไม่ ได้ทดสอบเปรียบเทียบกับ MSP1₁₉ ที่เตรียมในรูป His₆-tagged MSP1₁₉ ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในหนูทดลอง พบว่าโปรตีนทั้งสองมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก และปรากฏเพียงแถบเดียวหลังจากผ่าน Affinity column FLAG-MSP1₁₉ ที่เตรียมได้สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ Anti-MSP1₁₉ serum⁶, Anti-*P. yoelii* YM hyperimmune serum¹¹ และ Anti-MSP1₁₉ mAb (Mab 302)¹² แสดงว่าโปรตีนดังกล่าวมีโครงสร้างและคุณสมบัติของแอนติเจนเหมือนกับ MSP1₁₉ ของตัวเชื้อที่อยู่ในธรรมชาติ

การศึกษานี้ได้ให้ข้อมูลที่สำคัญในการเตรียม

MSP1₁₉ ที่เหมาะสมและพิสูจน์ทราบถึงคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของโปรตีนดังกล่าวที่สร้างออกมาในรูป FLAG-MSP1₁₉ ในอันที่จะนำโปรตีนดังกล่าวไปใช้ในการศึกษาภูมิคุ้มกัน และการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจาก UNDP/ World Bank/ WHO special Program

บรรณานุกรม

1. Blackman MJ, Holder AA. Secondary processing of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by calcium-dependent membrane-bound serine protease shedding of MSP1₃₃ as a noncovalent associated complex with other fragments of MSP1. Mol Biochem Parasitol 1992; 50: 307-16.
2. Miller LH, Robert T, Shahabuddin M, McCutchan TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). Mol Biochem Parasitol 1993; 59: 1-14.
3. Jongwutiwes S, Tanabe K, Kanbara H. Sequence conversion in the C-terminal part of the precursor to the major merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. 1993; 59: 95-100.
4. Daly TM, Long CA. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* 17XNL merozoite surface protein-1 induces a protective

- immune response in mice. *Infect Immun* 1993; 61: 2462-7.
5. Ling IT, Ogun SA, Holder AA. Immunization against malaria with recombinant protein. *Parasite Immunol* 1994; 16: 63-7.
 6. Hirunpetcharat C, Tian JH, Kaslow DC, *et al.* Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1₁₉) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells. *J Immunol* 1997; 159: 3400-11.
 7. Kumar S, Yadava A, Keister DB, *et al.* Immunogenicity and *in vivo* efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys. *Mol Med* 1995; 1: 325-32.
 8. Tian JH, Miller LH, Kaslow DC, *et al.* Genetic regulation of protective immune response in congenic strains of mice vaccinated with a subunit malaria vaccine. *J Immunol* 1996; 157: 1176- 83.
 9. Tian JH, Good MF, Hirunpetcharat C, *et al.* Definition of T cell epitopes within the 19 Kda carboxylterminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 (MSP1₁₉) and their roles in immunity in malaria. *Parasite Immunol* 1998; 20: 263-78.
 10. User Manual. Yeast N-terminal FLAG expression system for expression, detection and purification of extracellular proteins in *S. cerevisiae*. Kodak Scientific Imaging Systems.
 11. Freeman RR, Palish CR. *Plasmodium yoelii*: antibody and the maintenance of immunity in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 1981; 52: -18-24.
 12. Majarian WR, Daly TM, Weidanz WP, Long CA. Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. *J Immunol* 1984; 132: 3131-37.