

การโคลนยีนและการแสดงออกของโปรตีนซีรีน โปรตีเอสจากพิษงูเขียวหางไหม้
(Trimeresurus Albolabris)

นางสาวชวนชม มวลประสิทธิ์พร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF GREEN PIT VIPER
(*TRIMERESURUS ALBOLABRIS*) SERINE PROTEASE

Miss Chaunchom Maunpasitporn

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

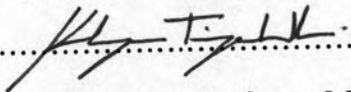
Chulalongkorn University

Academic Year 2006

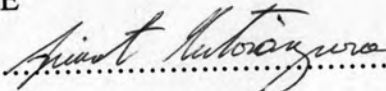
Copyright of Chulalongkorn University

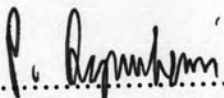
491003

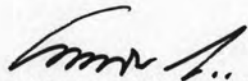
Thesis Title MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF GREEN PIT
VIPER (*TRIMERESURUS ALBOLABRIS*) SERINE PROTEASE
By Miss Chaunahom Maunpasitporn
Field of Study Biomedical Sciences
Thesis Advisor Associate Professor Ponlapat Rojnuckarin, M.D., Ph.D.

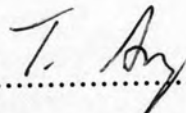
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree
.....  Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

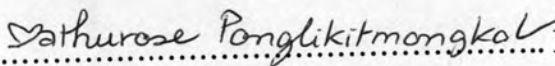
THESIS COMMITTEE

.....  Chairman
(Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

.....  Thesis Advisor
(Associate Professor Ponlapat Rojnuckarin, M.D., Ph.D.)

.....  Member
(Assistant Professor Tewin Tencomnao, Ph.D.)

.....  Member
(Assistant Professor Tipayanate Ariyapitipun, Ph.D.)

.....  Member
(Associate Professor Mathurose Ponglikitmongkol, Ph.D.)

ชวนชม มวลประสิทธิ์พร : การโคลนนิ่งและการแสดงออกของโปรตีนซีรีนโปรตีเอสจากพิษงูเขียวหางไหม้ (*Trimeresurus Albolabris*) (MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF GREEN PIT VIPER (*TRIMERESURUS ALBOLABRIS*) SERINE PROTEASE) อ. ที่ปรึกษา: รศ.นพ.พลภัทร โรจน์นครินทร์, 98 หน้า

งูครอบครัวViperidaeเป็นงูพิษที่พบว่าถูกกัดมากที่สุดในประเทศไทย ซึ่งอำนาจพิษจะทำลายระบบโลหิตเป็นหลัก งูเขียวหางไหม้ทองเหลือง (*Trimeresurus albolabris*) พบมากที่สุดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ซึ่งเป็นปัญหาทางการแพทย์และการรักษาอย่างมาก พิษของงูเขียวหางไหม้ทองเหลืองมีหลายชนิดที่มีศักยภาพในระบบการแข็งตัวของเลือด ซึ่งโปรตีนซีรีนโปรตีเอสมีผลต่อระบบ Thrombin clotting, Plasminogen activator, การย่อยไฟบริโนเจน (Fibrinogenolysis) และการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant) ผลการศึกษาลำดับกรดนิวคลีอิกและลำดับกรดอะมิโนของต่อมพิษงูเขียวหางไหม้ทองเหลือง โดยได้จากห้องสมุดซีดีเอ็นเอ (Primary cDNA library) จากต่อมพิษงูเขียวหางไหม้ทองเหลือง โปรตีนซีรีนโปรตีเอส ชนิดที่ย่อยไฟบริโนเจนคือ albofibrase ที่พบก่อนหน้านี้แล้วแต่ยังไม่มีลำดับกรดอะมิโนที่ครบถ้วนสมบูรณ์ เพื่อให้ได้ลำดับกรดอะมิโนที่ครบถ้วนสมบูรณ์โดยเทคนิค 5'-RACE แล้วทำการผลิตโปรตีน albofibrase ได้จากยีสต์ *Pichia pastoris* และแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะจากการเลี้ยงเซลล์ได้โปรตีนปริมาณ 0.658 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรตีน albofibrase มีขนาด 30 กิโลดาลตัน Albofibrase มีความสามารถกระตุ้น Plasminogen ให้มีการทำงานได้โดยความสามารถนี้คล้ายกับว่าเป็น Plasminogen activator Albofibrase มีความสามารถคล้าย Thrombin (Thrombin clotting) โดยมีค่า 0.016 unit/ml thrombin Albofibrase มีความสามารถในการย่อยไฟบริโนเจน (Fibrinogenolysis) ที่สายเอแอลฟา (A α -chain) โดยใช้เวลา 180 นาที Albofibrase มีความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant agent) มีผลให้เวลาของ Prothrombin Time (PT) and activated partial thromboplastin time(aPTT) มีค่ายาวนานกว่าในเลือดของคนปกติและสามารถแก้ไขค่าที่ยาวของ Prothrombin Time (PT) and activated partial thromboplastin time(PTT) โดยการใส่เซรุ่มพิษงูเขียวหางไหม้ ดังนั้น Albofibrase น่าจะพัฒนาเป็นยาตัวใหม่ที่น่ามาใช้รักษาโรคได้ในอนาคต เพราะสามารถแก้ฤทธิ์ได้โดยเซรุ่มต้านพิษงูเขียวหางไหม้ ซึ่งมีจำหน่ายในประเทศไทย

สาขาวิชา_ชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา) ลายมือชื่อนิสิต ชวนชม มวลประสิทธิ์พร
ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา พลภัทร โรจน์นครินทร์

4689663520 : MAJOR OF BIOMEDICAL SCIENCES

KEY WORDS: *TRIMERESURUS ALBOLABRIS* / SERINE PROTEASE / ALBOFIBRASE

CHAUNCHOM MAUNPASITPORN : MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION
OF GREEN PIT VIPER (*TRIMERESURUS ALBOLABRIS*) SERINE PROTEASE.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PONLAPAT ROJNUCKARIN, 98pp.

Viper is common snake family for venomous snakebites in Thailand. The venom destroys maining blood coagulation. Green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) is the most common in Bangkok and boundary that have problem in medical and security. *T albolabris* venums are many kind proteins that have potential in blood coagulation. Serine protease have effect to thrombin clotting, plasminogen activator, fibrinogenolysis, anticoagulant agent and corrected anticoagulant. The study results of nucleic acid and amino acid from *T albolabris* primary cDNA library. Serine protease digest fibrinogen (albofibrase) that dase not full-length sequence. Using 5'-RACE method, the full length sequece of albofibrase was derived. Lbofibrase from *Pichia pastoris* was purified using affinity chromatography. The yield of albofibrase was 0.658 mg/liter of culture medium with molecular weight of approximately 30 kDa. Albofibrase could activate plasminogen (plasminogen activator albofibrase). Albofibrase have been thrombin clotting time at 0.058 unit thrombin. Albofibrase could digest fibrinogen at A α -chain (fibrinogenolysis) and 180 minutes time incubation. Albofibrase could inhibit blood coagulation (anti-coagulant agent), so prolong of prothrmbin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). Albofibrase could corrected time to normal PT and aPTT by green pit viper serum (corrected anti-coagulant). Suggesting that defibrination syndrome in patients is a combination of these enzymatic effects. Albofibrase is a novel serine protease has potentials to be therapeutic anti-thrombotic agent, fibrinogenolysis agent and anti-coagulant agent in the future.

Field of study Biomedical Sciences

Student's signature C. Maunpasitporn

Academic year 2006

Advisor's signature P. Rojnuckarin

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Ponlapat Rojnuckarin, M.D., Ph.D., for his kindness, guidance, supervision, invaluable advice and constant encouragement throughout his study in Chulalongkorn University. I am very grateful to M.D., Ph.D. Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D., Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D., Ph.D., Assistant Professor Tipyanate Ariyapatipun, Ph.D., Assistant Professor Tewin Tencomnao and Associate Professor, Maturus Ponglikidmongkol, Ph.D for their comments and serving in the thesis committee.

I am very grateful to Veterinarian Lawan chanhome, Dr., Arkom Sai-Ngam, Medtech (Medical science) Benjaporn Akkawat and Jumlong Juntiang.

I am very grateful to everybody of Hematology in Chulalongkorn hospital and all my friends in laboratory.

I am very grateful to Thai Research Fund (TRF) and Chulalongkorn University Fund.

Finally, I would like to deepest my mother and my family for their love, care, understanding and encouragement.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Background and Rationale	1
1.2 Research Questions.....	7
1.3 Objectives of the Study.....	7
1.4 Keywords.....	7
1.5 Conceptual Framework.....	8
1.6 Benefits and Applications.....	9
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	10
2.1 Serine protease, Albofibrase: Characteristics and Relationships.....	10
2.2 Effect of Native and Recombinant Serine protease on blood human coagulation and fibrinogenolysis.....	11
2.3 Production of Recombinant Albofibrase in <i>Pichia</i> Expression System	15

	Page
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	18
3.1 Materials	18
3.1.1 Obtaining cDNA library	18
3.1.2 Expression of Albofibrase in <i>Pichia pastoris</i>	22
3.1.3 Activity Assay.....	23
3.2 Methods.....	24
3.2.1 Obtaining cDNA library.....	24
3.2.2 Obtaining Full Length Serine protease /Albofibrase cDNA	29
3.2.3 Expression of Albofibrase in <i>Pichia pastoris</i>	32
3.2.4 Purification of Recombinant Proteins.....	35
3.2.5 Protein Detection.....	37
3.2.6 Quantitative Assay for Recombinant Proteins.....	38
3.2.7 Activity Assay.....	39
CHAPTER IV RESULTS	43
4.1 Obtaining cDNA library.....	43
4.2 Cloning of Full Length Serine protease/Albofibrase cDNA from Green Pit Viper.....	48
4.2.1 5'-RACE.....	48
4.2.2 Sequence Alignment and Computational Searching Analysis.....	51
4.3 Expression of Albofibrase in <i>Pichia pastoris</i>	61

	Page
4.3.1 Amplification of Albofibrase by PCR.....	61
4.3.2 Ligation of Albofibrase into pGEM [®] T-vector and Transformation of <i>E. coli</i> , JM109.....	62
4.3.3 Ligation of Albofibrase into pPICZ α A and Transformation of <i>E. coli</i> , JM109.....	63
4.3.4 Transformation of Recombinant pPICZ α A into <i>Pichia pastoris</i> , X-33.....	64
4.3.5 Expression of Recombinant <i>Pichia pastoris</i> , X-33 and Protein Purification.....	66
4.3.6 Quantitative Assay of Purified Recombinant Protein.....	68
4.3.7 Albofibrase activity on human blood coagulation and fibrinogenolysis.....	69
 CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSION	 77
 REFERENCES.....	 81
 APPENDIX.....	 88
 BIOGRAPHY	 98

LIST OF TABLES

	Page
Table 1 Oligonucleotides primers and their descriptions.....	20
Table 2 Unique clones from primary library of <i>T.albolabris</i>	47
Table 3 Four serine proteases from <i>T.albolabris</i> compared with <i>T.stejnegeri</i>	55
Table 4 Standard thrombin unit and thrombin clotting time.....	69
Table 5 Plasminogen activator activity of u-PA using various concentrations.....	70
Table 6 Plasminogen activator activity of albofibrase using various concentrations.	72
Table 7 Anti-coagulant activity of albofibrase represented in INR and aPTT	
Ratio compared with normal control at varies incubation time.....	72
Table 8 Normal human plasma and 2.3 nM albofibrase were co-incubated GPV...	
Antivenom at various concentrations.....	74
Table 9 Normal human plasma and 2.3 nM albofibrase were incubated.....	
GPV venom in vary concentrations.....	76

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1 Blood coagulation cascade.....	6
Figure 2 Crossed-eye stereo view ribbon representation of the crystallographic 3D structure of TSV-PA.....	16
Figure 3 The fractions of cDNA on a 5% nondenaturing acrylamide gel	44
Figure 4 Ethidium bromide plate assay for cDNA concentration.....	45
Figure 5 Bacteriophage plaques formation of <i>T.albolabris</i> library.....	45
Figure 6 Digestion of recombinant plasmids from <i>T.albolabris</i> library	46
Figure 7 Partial cDNA of 067 serine protease was a 3'-untranslated region..... of a serine protease.....	49
Figure 8 The First 5'-RACE PCR product of serine protease.....	50
Figure 9 The colonies of recombinant serine protease cDNA.....	50
Figure 10 The <i>EcoR</i> I digestion of recombinant plasmid clones containing..... serine protease inserts.....	51
Figure 11 Partial sequence of the first 5'-RACE PCR product termed..... 061 serine protease.....	52
Figure 12 Distribution of 104 Blast hits of the query sequence of 061..... Serine protease.....	52
Figure 13 Homology searching results of 061 serine.....	53
Figure 14 Second 5'-RACE PCR product of serine proteases.....	54
Figure 15 The <i>EcoRI</i> digested clones of plasmids containing inserts.....	55
Figure 16 The four serine proteases from <i>T. albolabris</i> were aligned:..... GPV-TL1 and GPV-TL2 (thrombin-like enzymes),..... albofibrase (fibrinogenolytic enzyme) and.....	

GPV-PA (plasminogen activator).....	56
Figure 17 Complete cDNA and deduced amino acid sequences.....	
of snake venom serine protease (albofibrase).....	
from <i>Trimeresurus albolabris</i>	57
Figure 18 PCR product of albofibrase	58
Figure 19 Albofibrase cDNA was transformed into <i>E. coli</i> ,.....	
JM 109. The transformants were selected.....	
by a blue-white system.....	59
Figure 20 Albofibrase - transformed plasmid that represented.....	
the presence of inserts.....	60
Figure 21 Electrophoresis of cut pPICZ α A.....	61
Figure 22 Recombinant albofibrase in <i>Pichia pastoris</i> , X-33, on YPDS.....	62
Figure 23 PCR analysis of <i>Pichia</i> integrants.....	63
Figure 24 Coomassie-stained SDS-PAGE showed.....	
albofibrase protein expression.....	64
Figure 25 Western blot analysis of pooled fractions of albofibrase.....	65
Figure 26 Standard curve of protein concentrations fitted by linear regression....	65
Figure 27 Standard logarithmic curve of thrombin unit.....	
versus thrombin clotting time.....	67
Figure 28 Fibrinogenolytic activity of serine protease (albofibrase).....	
from <i>T. albolabris</i> on A α -, B β - and γ -chain of fibrinogen.....	67
Figure 29 Plasminogen activation by Albofibrase.....	68
Figure 30 Comparison anti-coagulant activity of Albofibrase.....	
with normal human plasma in Prothrombin Time (PT).....	

	Page
at varied time incubation (minute).....	70
Figure 31 Comparison anti-coagulant activity of Albofibrase.....	
with normal human plasma in partial thromboplastin time (aPTT).....	
at varied time incubation (minute).....	71
Figure 32 Multiple sequence alignment of thrombin-like serine proteases.....	73
Figure 33 Multiple sequence alignment of snake venom.....	
plasminogen activator.. ..	75
Figure 34 Multiple-sequence alignment of snake venom	
fibrinogenase.GPV is albofibrase.....	75

LIST OF ABBREVIATIONS

A°	Angstrom unit
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
ADP	adenosine diphosphate
Arg	arginine
Asp	aspartic acid
bp	base pair
BCA	bicinchoninic acid
°C	degree Celsius
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cm	centimeter
Cys	cysteine
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP and dCTP
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetra acetic acid
FDA	food and drug administration
g	gram
Gly	glycine
GP	glycoprotein
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	concentration of inhibitor required to inhibit 50% aggregation
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kb	kilobase
kDa	kiloDalton

KGD	Lys-Gly-Asp
Ki	constant inhibition
L	Liter
LB	Luria-Bertani media
Lys	lysine
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
M	molar
MLD	methionine leucine aspartic acid
ng	nanogram
nm	nanometer
N	normal
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optical density
ORF	open reading frame
pmol	picomole
PCR	polymerase chain reaction
PLA ₂	phospholipase A ₂
PNGaseF	peptide-N-glycosidase
RACE	rapid amplification of cDNA end
RGD	Arg-Gly-Asp
SDS	sodiumdodesylsulphate
SDS-PAGE	sodiumdodesylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SVMPs	snake venom metalloproteinases
Thr	threonine
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane

UTR	untranslated region
VGD	valine glycine aspartic acid
YPDS	yeast extract peptone dextrose medium
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
μg	microgram
μl	microliter
μm	micrometer