การตรวจแยกและศึกษาคุณสมบัติบางประการของ protease จาก *Pseudomonas pseudomallei*

นางสาว กัญชลี เลิศโภคะสมบัติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2533

ISBN 974-577-162-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016292

Isolation and Some Properties of a Protease from *Pseudomonas pseudomallei*

Miss Kanchalee Lertpocasombat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1990

ISBN 947-577-162-7

Thesis Title. Isolation and Some Properties of a Protease from *Pseudomonas pseudomallei*

By Miss Kanchalee Lertpocasombat

Inter-Department Medical Microbiology

Thesis Advisor Assistant Professor Somying Tumwasorn , Ph.D.

Co-Advisor Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D.

Co-Advisor Assistant Professor Suthep Thaniyavarn , Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

....Thavorn Vajrabhaya.....Dean of The Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya , Ph.D.)

Thesis committee :

Dilok Yenbutra .....Chairman

(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

...Somying Tumwasorn.....Advisor

(Assistant Professor Somying Tumwasorn , Ph.D.)

....Somjai Reinprayoon.....Co-Advisor

(Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D.)

.....Suthep Thaniyavarn.....Co-Advisor

(Assistant Professor Suthep Thaniyavarn , Ph.D.)

.....Nikom Chaisiri.....Member

(Associate Professor Nikom Chaisiri , Ph.D.)

Copyright of the Graduate School , Chulalongkorn University

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กัญชลี เลิศโภคะสมบัติ การตรวจแยกและศึกษาคุณสมบัติบางประการของ Protease จาก *Pseudomonas pseudomallei* (ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF A PROTEASE FROM PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI) อ.ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมหญิง ธัมวาสร , อ.ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, รศ.พญ. สมใจ เหรียญประยูร, 96 หน้า. ISBN 974-577-162-7

Pseudomonas pseudomallei เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิส ซึ่งเป็นโรคติดเชื้ออันตรายที่พบมากในภูมิภาคเอเชียอาคเนย์ protease ของเชื้อนี้อาจจะเป็นปัจจัยก่อโรคชนิดหนึ่งเนื่องจากพบร่วมอยู่กับ necrotoxin (สารพิษที่ทำให้เนื้อเยื่อเน่า) การแยก protease ในเบื้องต้นนี้จึงมีความสำคัญและจะเป็นประโยชน์ต่อไปในการศึกษาถึงบทบาทของ protease ในพยาธิกำเนิดของโรค

ศึกษา protease จาก*P. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 24 สายพันธุ์ และสายพันธุ์อ้างอิง NCTC 3 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ glycerol beef extract และตรวจหา protease โดยวิธี skim milk plate พบว่าทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถสร้าง protease ได้ในปริมาณแตกต่างกัน เชื้อสามารถสร้าง protease สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ glycerol beef extract ที่มีแคลเซียมไอออนในสภาวะที่เขย่า 30^{0}ซ.

Protease ที่แยกได้โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40-70% แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีด้วย DEAE-cellulose และ gel filtration คิดเป็นผลผลิต 1.6% ของทั้งหมด คุณสมบัติของ protease ที่แยกได้มีดังต่อไปนี้ 1) การทำงานมีประสิทธิภาพดีในช่วง pH 4 ถึง 9 แต่ดีที่สุดที่ pH 5, 2) มีคุณสมบัติไม่ทนความร้อน 3) สารที่ยับยั้งการทำงานของ protease ได้แก่ EDTA, PHE และโลหะหนักบางตัวคือ Hg^{2+} และ Cu^{2+} ส่วนสารที่ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของ protease ได้แก่ PMSF, trypsin soy bean inhibitorโลหะหนักบางตัวเช่น Ca^{2+}, Ba^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+} จัดได้ว่า protease นี้เป็น acid metalloprotease 4) protease ที่แยกได้นี้มีน้ำหนักโมเลกุล 39,000 และ 50,000 เมื่อประมาณค่าด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis และวิธี gel filtration ตามลำดับ 5) protease ที่แยกได้มีคุณสมบัติเป็น collagenase แต่ไม่มีคุณสมบัติเป็น elastase

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KANCHALEE LERTPOCASOMBAT : ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF A PROTEASE FROM PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI. THESIS ADVISOR : ASS. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph.D., CO-ADVISOR : ASS. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., ASSO. PROF. SOMJAI REINPRAYOON, M.D., 96 PP.ISBN 974-577-162-7

Pseudomonas pseudomallei is a causative agent of melioidosis which is an infectious disease endemic in Southeast Asia. *P. pseudomallei* protease is implicated as a potential virulence factor since it is associated with necrotoxin. It is thus crucial to isolate and purify *P. pseudomallei* protease as an initial step in defining its role in pathogenesis.

Twenty-four clinical isolates and three reference strains of *P. pseudomallei* were used to screen for the protease production by growing the organisms in glycerol beef extract broth and detecting protease by skim milk plate test. It was found that all tested strains produced extracellular protease in different amounts . High protease production was obtained when growth was performed at 30°C with shaking in glycerol beef extract broth containing calcium ions.

Purified protease was achieved by 40-70% ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration on Sephadex G-200 with a recovery of 1.6%. The properties of the protease were as follows ; i) it possessed activity at wide range pH from 4 to 9 with the optimal pH of 5; ii) it was heat-labile; iii) its activity was inhibited by EDTA, PHE and some heavy metal ions such as Hg^{2+} and Cu^{2+} but not by PMSF and trypsin soy bean inhibitor, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+} and Zn^{2+}; these suggested that *P. pseudomallei* protease is an acid metalloprotease; iv) its molecular weight was estimated as 39,000 by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and 50,000 by gel filtration; v) it possessed collagenase activity but not elastase activity.

ภาควิชา ..... สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์...
สาขาวิชา ..... จุลชีววิทยาทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา ...2532.....

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgement

This thesis would never have been successful without the cordial advices of the following persons whom I would like to express my deep gratitude to their valuable helps and understanding.

My deep thankfulness to :

Assistant Professor Dr. Somying Tamwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her valuable advices and supervising this thesis.

Assistant Professor Dr. Suthep Thaniyavarn, Department of Microbiology , Faculty of Science, Chulalongkorn University,my co-advisor, for his valuable advices and technical consultant.

Associate Professor Dr. Somjai Reinprayoon , Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University , my co-advisor, for her kindness, encouragement and understanding.

The staffs of Science Division ,Thai Red Cross Society, Queen Saovabha Memorial Institute, for permission to use the highspeed refrigerated centrifuge.

The staffs of the Audio Visual Service Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their valuable help in

photographic work.

The committee of the Graduate School, Chulalongkorn University, for the research grant to support some of this study.

Finally , I am deeply indebted to my parents for their help,encouragement and understanding.

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKOWLEDGEMENT.....vi

LIST OF TABLES.....xii

LIST OF FIGURES.....xiii

ABBREVIATIONS.....xiv

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

II. LITERATURE REVIEW.....4

Pseudomonas pseudomallei

History and geographic distribution.....4

Bacteriological aspects.....4

Clinical manifestation 6

Histopathological study in melioidosis.....8

Immunity 9

Pathogenesis and virulence factors.....9

Microbial proteases and their classification.....11

Collagenase.....14

Elastase.....15

Role(s) of microbial protease in pathogenesis.....16

III. MATERIALS AND METHODS 18

1. Source of microorganisms.....18

2. Selection for protease producing strains.....18

2.1 Media and culture condition.....18

2.2 Detection of protease activity.....18

3. Enzyme assays.....20

3.1 Protease assay.....20

3.1.1 Skim milk plate test.....20

3.1.2 Azocasein assay.....20

3.2 Collagenase assay.....21

3.3 Elastase assay.....21

4. Growth and protease production.....22

5. Effects of media on protease production.....23

6. Optimal growth condition.....23

7. Isolation of *P.pseudomallei* protease.....23

7.1 Preparation of culture filtrate.....23

7.2 Ammonium sulfate fraction.....24

7.3 Diethylaminoethyl (DEAE) cellulose column chromatography.....25

7.4 Gel filtration column chromatography.....25

8. Determination of protein 26

9. Analysis of protease.....26

9.1 SDS-PAGE analysis.....26

9.2 Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE).....27

9.3 Immunoelectrophoresis(IEP).....28

10. Estimation of molecular weight.....28

10.1 Molecular weight estimation by Sephadex G-200..28

10.2 Molecular weight estimation by SDS-PAGE.....29

11. Preparation of antiserum against protease.....30

12. Determination of optimal pH.....30

13. Heat stability.....31

14. Effects of protease inhibitors, metal ions, and chelating agents.....31

IV. RESULTS.....32

1. Protease produce by *Pseudomonas pseudomallei*.....32

2. Growth and protease production.....32

3. Effects of media on protease production.....33

4. Optimal condition for protease production.....33

5. Isolation of protease.....34

5.1 Ammonium sulfate fractionation.....34

5.2 DEAE-cellulose chromatogrphy.....34

5.3 Sephadex G-200 chromatogrphy.....34

6. Molecular weight of *P. pseudomallei* protease.....35

6.1 SDS-PAGE determination.....35

6.2 Sephadex G-200 determination.....35

7. Analysis of *P. pseudomallei* protease.....35

7.1 SDS-PAGE analysis.....35

7.2 PAGE analysis.....36

7.3 Immunoelectrophoresis(IEP).....36

8. Optimal pH of *P. pseudomallei* protease.....36

9. Heat stability.....37

10. Effects of protease inhibitors and chelating agents....37

11. Effects of metal ions.....37

12. Elastase activity.....38

13. Collagenase activity.....38

V. DISCUSSION.....60

Conclusions.....68

REFERENCES.....70

APPENDIX I.....81

APPENDIX II.....83

CURRICULUM VITAE.....96

LIST OF TABLES

Table Page

1. Source of microorganisms.....19

2. Protease activity in ammonium sulfate fraction.....39

3. Summary of protease production.....40

4. Effects of heat treatment on protease activity.....56

5. Effects of chelating agents and protease inhibitors.....57

6. Effects of divalent cations on the protease activity.....58

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Protease activity on skim milk plate.....41
2. Growth curve and protease production in BB medium.....42
3. Growth curve and protease production in GB medium.....43
4. Protease production in various media.....44
5. Protease production in various conditions.....45
6. Percentage of total protease activity in ammonium sulfate fractions.....46
7. Elution profile from DEAE-cellulose.....47
8. Elution profile from Sephadex G-200.....48
9. Calibration curve of MW determination by SDS-PAGE.....49
10. Calibration curve of MW determination by Sephadex G-200...50
11. SDS-PAGE analysis of *P. pseudomallei* protease.....51
12. Protease on PAGE (anionic system).....52
13. Protease on PAGE (cationic system).....53
14. IEP of curde and purified protease.....54
15. Effect of pH on protease activity.....55
16. Elastase activity toward the substrate elastin congo red..59
17. Collagenase activity toward the substrate azocoll.....60
18. Protease activity assay O.D.420 nm.....94
19. Linear graph of azodye release from azocasein.....95
20. Kinetic of trypsin 1 PU using azocaein as substrate.....95

ABBREVIATIONS

BB	=	beef extract broth
° C	=	degree celsius
ca.	=	circa , approximate
cm.	=	centimeter
CFU	=	colony forming unit
D.W.	=	distilled water
e.g.	=	exampli gratia (Latin), for example
et al.	=	et alii (Latin), and others
etc.	=	et cetera
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
fig.	=	figure
gm	=	gram
x g	=	gravity (centrifugal force)
GB	=	glycerol broth
GBC	=	glycerol broth containing calcium ions
GBG	=	glycerol broth containing glucose
hr	=	hours
HMB	=	para- hydroxymercuribenzoate
IEP	=	immunoelectrophoresis
IgA	=	immunoglobulin A
IgG	=	immunoglobulin G
KD	=	kilodaltons
M	=	molarity

MW	=	molecular weight
µl	=	microlitre
µm	=	micrometer
mA	=	milli ampare
mg	=	milligram
min	=	minutes
ml	=	millilitre
mm	=	millimeter
N	=	normality
nm	=	nanometer
O.D.	=	optical density
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PMSF	=	phenylmethylsulfonyl fluoride
PHE	=	1-10 phenanthroline
PU	=	protease unit
rpm	=	revolution per minute
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis