



รายงานการวิจัย

การแยกยีนพอริน (porin) จากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* และ
การศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของพอรินที่แสดงออกในเชื้อ *E. coli*

(Isolation of gene encoding an outer membrane protein, porin, and
expression in *E. coli* for structural and functional characterization)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การแยกยีนพอริน (porin) จากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* และ
การศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของพอรินที่แสดงออกในเชื้อ *E. coli*
(Isolation of gene encoding an outer membrane protein, porin, and
expression in *E. coli* for structural and functional characterization)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. จารุวรรณ ศิริเทพทวี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546-2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2552

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และ
ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ
ชีวเคมีเพื่อการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี



รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9 กรกฎาคม พ.ศ. 2552

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดโปรตีนที่เยื่อเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* และ *B. thailandensis* พบว่าโปรตีนทั้งสองตัวคือ *BpsOmp38* และ *BthOmp38* มีความสัมพันธ์กันในแง่ภูมิโมโนโคลี มีคุณสมบัติทนต่อ SDS ไวต่อความร้อน มีน้ำหนักโมเลกุลในรูปไตรเมอร์เป็น 110 kDa และน้ำหนักโมเลกุลในรูปโมโนเมอร์เป็น 38 kDa การทำ peptide mass fingerprinting โดยเทคนิค MALDI-TOF MS และ ESI/MS พบว่าโปรตีน Omp38 มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับพอริน OpcP1 ของเชื้อ *B. cepacia* มากที่สุด ได้นำข้อมูลโครงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากจีโนมของ *B. pseudomallei* มาใช้ในการตรวจหาชิ้นที่ถอดรหัสให้ *BpsOmp38* และ *BthOmp38* และทำการเพิ่มจำนวนชิ้นด้วยเทคนิค PCR การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นทั้งสองพบว่ามีความเหมือนกัน 98% และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 99.7% การทำนาย transmembrane domain และโครงสร้างสามมิติพบว่าโปรตีนประกอบด้วยสายบีต้า 16 สาย มาประกอบเป็นโครงสร้าง β -barrel ต่อมาทำการโคลนยีน *BpsOmp38* และยีน *BthOmp38* เข้าไปในพลาสมิด pET23d(+) และทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ Omp38 ในเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ Origami (DE3) พบว่าโปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* มีขนาด 38 kDa อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำในลักษณะ inclusion bodies จึงได้ทำบริสุทธิ์ inclusion bodies แล้วนำโปรตีนมาละลายใน 8M urea และทำการทดลอง refolding การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบโปรตีนโมโนเมอร์ขนาด 38 kDa สามารถเกิดการ refold ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 10% (w/v) Zwittergent[®] 3-14 รูปที่ refold มีการเคลื่อนตำแหน่งบน DSD-PAGE gel ไปอยู่ที่ 110 kDa การวิเคราะห์ด้วย CD spectroscopy พบว่าโปรตีน 110 kDa มีองค์ประกอบของ β -sheet เป็นหลักเหมือนกับโปรตีน Omp38 ดั้งเดิมที่สกัดจาก *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* การวิเคราะห์ทางภูมิโมโนโคลีโดยใช้ anti-*BpsOmp38* polyclonal antibodies และการทำ peptide mass analysis ด้วย MALDI-TOF MS ยืนยันว่าโปรตีนที่ถูกผลิตโดย *E. coli* เป็น *BpsOmp38* และ *BthOmp38* การศึกษาหน้าที่พบว่า anti-*BpsOmp38* antibodies มีผลต่อการยับยั้งอัตราแพร่ผ่านของน้ำตาลโมเลกุลเล็กเข้าสู่ช่อง Omp38 ที่ได้ทำการ reconstitute เข้าไปในลิโปโซม และอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลโมเลกุลเล็กและยาปฏิชีวนะมีกราฟแปรผันโดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของสารซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน Omp38 มีคุณสมบัติเป็นช่องแพร่ผ่านพอริน

ABSTRACT

This study describes isolation of the outer membrane protein from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. The isolated proteins, namely *BpsOmp38* and *BthOmp38*, were found to be immunologically related, SDS-resistant, heat-sensitive trimers with the molecular weight of approx. 110 kDa. The monomeric proteins were found to be 38 kDa. Peptide mass fingerprinting by MALDI-TOF MS and ESI/MS showed that both Omp38 proteins had most sequence similarities to the OpcP1 porin from *B. cepacia*. Based on information from the *B. pseudomallei* genome-sequencing project, the genes encoding *BpsOmp38* and *BthOmp38* were subsequently identified and amplified by PCR technique. The nucleotide sequences of both genes were found to be 98% identical with the predicted amino acid sequences being 99.7% identical. Transmembrane domains and 3D-structure predictions suggested that this newly-isolated porin is a 16-stranded β -barrel. The genes encoded *BpsOmp38* and *BthOmp38* were further cloned into pET23d (+) expression vector, and then expressed in *Escherichia coli* host strain Origami (DE3). The 38 kDa proteins, expressed as insoluble inclusion bodies, were purified, solubilized in 8 M urea, and then subjected to refolding experiments. As analysed by SDS/PAGE, the 38 kDa band completely migrated to 110 kDa when the purified monomeric proteins were refolded in a buffer system containing 10% (w/v) Zwittergent[®] 3-14. CD spectroscopy revealed that the 110 kDa proteins contained a predominant β -sheet structure, which corresponded completely to the structure of the native Omp38 isolated from *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*. Immunoblot analysis using anti-*BpsOmp38* polyclonal antibodies and peptide mass analysis by MALDI-TOF MS confirmed that the *E. coli* expressed proteins were *BpsOmp38* and *BthOmp38*. Functional studies showed the considerable inhibitory effects of the anti-*BpsOmp38* antibodies on the permeation of small sugars through the Omp38-reconstituted liposomes. A linear relation between relative permeability rates and the molecular weight of small sugars and antibiotics suggested strongly that the Omp38 functioned fully as a diffusion porin.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์.....	11
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	24
ข้อเสนอแนะ	25
บรรณานุกรม	26
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	29
ภาคผนวก ข	32
ผลงานตีพิมพ์.....	34
ประวัติผู้วิจัย	35

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 แสดงพื้นที่บนแผนที่โลกที่มีการระบาดของโรค Melioidosis.....	1
รูปที่ 1.2 โครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่มีพอรินเป็นองค์ประกอบ.....	2
รูปที่ 1.3 โครงสร้างสามมิติทั่วไปของพอรินจาก <i>E. coli</i>	3
รูปที่ 3.1 การทำบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของ outer membrane protein ที่สกัดจาก crude peptidoglycan ของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> และ <i>B. thailandensis</i>	11
รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์โปรตีน Bps/Bth Omp38 ด้วยเทคนิค immunoblotting.....	13
รูปที่ 3.3 เปรียบเทียบกรดอะมิโนของ Bps/Bth Omp38 กับพอรินของแบคทีเรียอื่น ๆ.....	14
รูปที่ 3.4 การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ Bps/Bth Omp38 โดย <i>E. coli</i> BL21 (Origami).....	15
รูปที่ 3.5 การทำ refolding ของ Bps/Bth Omp38.....	16
รูปที่ 3.6 การตรวจหาโปรตีน Omp38 โดย MALDI-TOF MS.....	17
รูปที่ 3.7 CD spectra ของรีคอมบิแนนท์ Bps/Bth Omp38.....	18
รูปที่ 3.8 กราฟ Diederichs แสดงการทำนาย transmembrane domain ของ Bps/Bth Omp38...	19
รูปที่ 3.9 การทำนายโครงสร้างสามมิติของ Bps/Bth Omp38.....	20
รูปที่ 3.10 แสดงการแพร่ผ่านของน้ำตาลผ่านช่องพอริน โดยวิธี liposome swelling assay.....	21
รูปที่ 3.11 ผลของ anti-Omp38 polyconal antibodies ต่ออัตราการแพร่ของสารผ่านช่อง พอริน Bps/Bth Omp38.....	23

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ผลการทำบริสุทธิ์ของโปรตีน BpsOmp และ BthOmp38 ที่ขั้นตอนต่าง ๆ.....	12
ตารางที่ 3.2 อัตราการแพร่ผ่านสัมพัทธ์ของยาปฏิชีวนะผ่านช่อง Bps/Bth Omp38.....	22



บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อร้ายแรงคือ Melioidosis เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สัมฐานของโคโลนีสี่ลักษณะหยัก มีสีครีมหรือสีแทน สามารถเคลื่อนไหวโดยใช้ส่วนที่เรียกว่าแฟลกเจลลา (flagella) และสามารถย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส มอลโตส แลคโตส แมนนิทอล และน้ำตาลโมเลกุลคู่ เซลโลไบโอส เพื่อนำไปใช้เป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ (Delost, 1997) ได้มีรายงานเกี่ยวกับการระบาดของโรคติดเชื้อ Melioidosis ทั้งในคนและสัตว์ทั่วโลกโดยเฉพาะในภูมิภาคโซนร้อนครอบคลุมประเทศในแถบแอฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย (Woods et al., 1999) (รูปที่ 1.1) การศึกษาครั้งแรกพบว่าเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ในดินโคลนและแหล่งน้ำนิ่ง แต่สามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปในอากาศในสภาพร้อนชื้นและในช่วยหน้าฝน



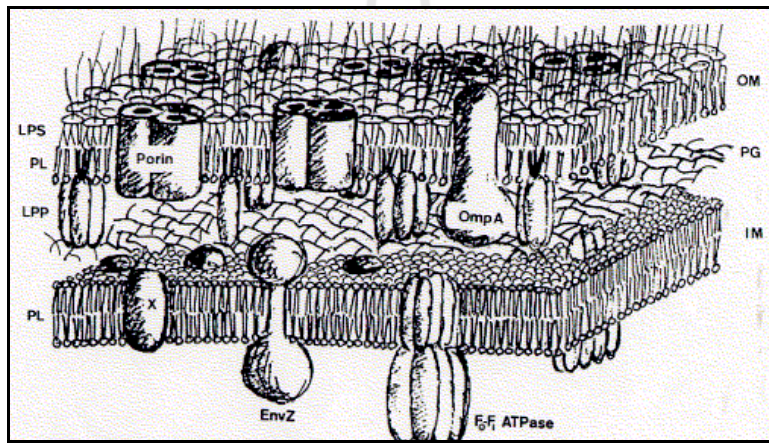
รูปที่ 1.1 แสดงพื้นที่บนแผนที่โลกที่มีการระบาดของโรค Melioidosis

พื้นที่สีเทาแสดงการพบเชื้อปนเปื้อนอยู่ตามแหล่งดินและน้ำ ส่วนพื้นที่สีดำแสดงการระบาดรุนแรง (Ellis and Titball, 1999)

อาการเจ็บป่วยอันเป็นสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายลักษณะทั้งแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง ลักษณะอาการของโรคแบบเฉียบพลันโดยทั่วไปคือ ปอดบวม เป็นไข้ และเกิดสภาวะ leukocytosis ภายใน 2 ถึง 3 วัน หลังจากการติดเชื้อ ในกรณีผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจะเกิดอาการระบบหายใจล้มเหลว เกิดฝีหนองบริเวณผิวหนังและอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น สมอง เชื้อหุ้มหัวใจ ตับ และกระดูก เป็นต้น

ส่วนผู้ที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังอาจมีพัฒนาการไปสู่โรควัณโรคหรือโรคมะเร็งปอดได้ การติดเชื้อเกิดจากการหายใจเอาเชื้อที่ปะปนมากับฝุ่นละอองที่กระจายอยู่ในอากาศหรือสัมผัสกับสิ่งของที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนอยู่ แต่การติดต่อสัมผัสโดยตรงระหว่างผู้ป่วยพบว่ามีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย ผู้ป่วยด้วยโรคนี้อัตราการเสียชีวิตสูงถ้าไม่ได้เข้ารับการรักษาย่างทันทั่วถึง โดยหนึ่งในสามของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมีรายงานว่าเสียชีวิต

สำหรับกลไกการเกิดโรคนั้นมีการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ผลิตทอกซินบางชนิดซึ่งมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนของ macrophage การที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน macrophage เช่นเดียวกับ polynuclear phagocyte อาจเกี่ยวข้องกับการฟักตัวของเชื้อในผู้ป่วยเป็นเวลานาน ๆ ก่อนแสดงอาการ ได้มีรายงานว่าลักษณะโครงสร้างภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทต่อการทำงานเบื้องต้นของแบคทีเรีย (Gotoh et al., 1994) โดยภายในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแกรมลบจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งเรียกว่า พอริน (porin) โปรตีนนี้ทำหน้าที่นำสารต่าง ๆ เข้าหรือออกจากเซลล์เนื่องจากโปรตีนนี้มีโครงสร้างพิเศษคือทำหน้าที่เป็น ช่อง (channel) (Nakae, 1976) ดังแสดงในรูปที่ 1.2

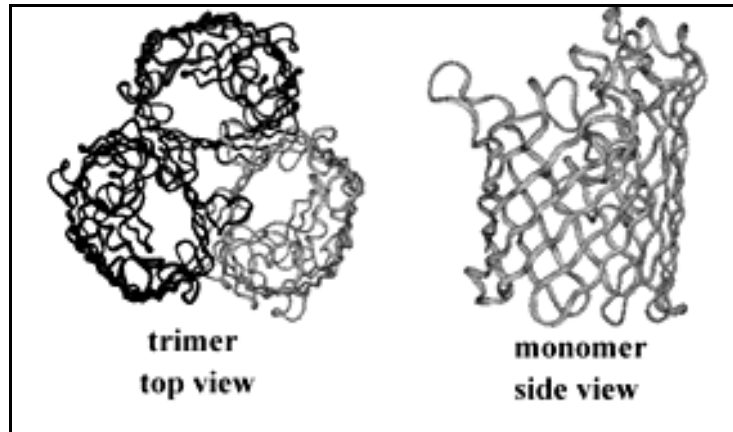


รูปที่ 1.2 โครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่มีพอรินเป็นองค์ประกอบ

พอรินจะฝังตัวอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) และมีคุณสมบัติให้โมเลกุลที่มีขั้วที่มีขนาดเล็กกว่า 600 ดาลตัน เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ รวมทั้งยาปฏิชีวนะหลาย ๆ กลุ่ม ผ่านอวัยวะโดยขบวนการแพร่ (non-specific diffusion) หรือแบบเลือกผ่าน (selective diffusion) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของช่องพอริน นอกจากนี้ส่วนของโปรตีนที่อยู่ในชั้นเพปทิโดไกลแคน ยังมีส่วนร่วมในการรักษารูปร่างของเซลล์และทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะของ bacteriophage และ bacteriolyticin อีกด้วย (Albert I' et al., 1995)

โปรตีนพอรินที่ได้รับการศึกษามากทั้งทางด้านโครงสร้าง หน้าที่ และยีนที่แสดงออก มีสามชนิดคือ OmpF OmpC และ PhoE ซึ่งเป็นโปรตีนจากเชื้อ *E. coli* (Rocque and McGroarty, 1989; Cowan et al., 1992; Cowan et al., 1995; Nikaido, 1994) จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน OmpF และ PhoE พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อย ๆ สามหน่วยที่เหมือนกัน โดยแต่ละหน่วยจะประกอบด้วยสายบีต้า จำนวน 16 สายมาจัดเรียงตัวในทิศตรงข้าม

กัน โดยส่วนที่เป็น loop จะทำหน้าที่เชื่อมสายบีต้า ทำให้เกิดโครงสร้าง barrel ที่มีลักษณะเป็นช่องขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 โครงสร้างสามมิติทั่วไปของพอรินจาก *E. coli*

การศึกษางานของพอริน OmpC และ PhoE โดยเทคนิค site-directed mutagenesis ช่วยอธิบายกลไกการนำสารผ่านเข้า-ออกของสารของแบคทีเรีย *E. coli* โดยพบว่าส่วนของ restriction loop ที่ยื่นเข้าไปในช่องของพอริน มีความสำคัญในการกำหนดขนาดของโมเลกุลที่จะผ่านเข้า-ออกจาก pore (Cowan et al., 1992) พอรินอีกชนิดหนึ่งคือ OmpG จากเชื้อ *E. coli* เช่น สามารถสร้างช่องจากหน่วยย่อยเดียว โดยทำหน้าที่ในการผ่านของน้ำตาลโมโน-ได- และ ไตรแซคคาไรด์ (Behlau et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาโปรตีนพอรินในแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ เช่น จากเชื้อ *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas salmonicida*, *Chlamydia trachomatis*, *Rhodopseudomonas capsulate*, *R. spaeroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Neisseria gonorrhoeae* และเชื้อ *Brucella* หลาย ๆ ชนิด (Hancock et al., 1979; Douglas et al., 1981; Darveau et al., 1983; Bavoil et al., 1984; Douglas et al., 1984; Flammann and Weckesser, 1984; and Gotoh et al., 1989) จากการศึกษาโครงสร้างของพอรินจากแบคทีเรียหลายชนิดพบว่าพอรินมีโครงสร้างร่วมกันคือ มีสัดส่วนของสายบีต้าซิท เป็นองค์ ประกอบหลัก (Nikaido and Baara, 1985)

ผลงานวิจัยหลายชิ้นให้ข้อสรุปว่าพอรินมีบทบาทสำคัญในการกำหนดพยาธิสภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหลายชนิด โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อโดยแบคทีเรียหลายโรคไม่ประสบความสำเร็จ ตัวอย่างการศึกษาได้แก่

1. พอริน MOMP จากเชื้อ *Chlamydia* เป็นโปรตีนขนาด 40 kDa มีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ ได้แก่ ทำให้เป็นหมัน การแท้งบุตร ตาบอด โรคปอดบวม หลอดลมอักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคหลอดเลือดอุดตัน และ Alzheimer's จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนระหว่างพอริน MOMP ของแบคทีเรียหลายชนิด ประกอบกับการทดลองทำ Epitope Mapping Studies พบว่า โปรตีนนี้มี immunogenic epitopes ในส่วนของ variable segments ที่เหนี่ยวนำการสร้าง neutralizing antibodies ที่สามารถช่วย

ป้องกันการติดเชื้อ Chlamydia ในแกะ ทำให้โมเลกุล MOMP เป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนา และวัคซีนป้องกันการโรค (Wyllie et al., 1999)

2. พอริน OpcPO ที่แยกจากเชื้อ *B. cepacia* พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อการก่อโรค cystic fibrosis เนื่องจากโปรตีนนี้มี low susceptibility ต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactam ทำให้เชื้อคือต่อยาในกลุ่มนี้ (Tsujiimoto et al., 1997)
3. พอริน OMF และ OMP จากการศึกษาในเชื้อแบคทีเรียสามชนิดคือ เชื้อ *B. aeruginosa* เชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* และเชื้อ *B. cepacia* โดยวิธี Tripartite Efflux Systems พบว่าโปรตีนมีส่วนเกี่ยวข้องกับต่อการคือต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่มโดยกลไกที่เรียกว่า Multi-resistance Mechanism
4. พอริน OM-1 และ OM-2 จากเชื้อ *B. pseudomallei* จากการการผ่านเข้าออกของสารผ่านช่องพอรินทั้งสอง โดยวิธี liposome swelling assay และ antimicrobial agent susceptibility test พบว่าโปรตีน OM-1 ทำหน้าที่เป็นช่องผ่านของโมเลกุลมีขั้วขนาดเล็ก ๆ เช่น น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการคือต่อยาในกลุ่ม β -lactam aminoglycosides macrolides และ polymyxins ของเชื้อ *B. pseudomallei* (Gotoh et al., 1994)

เนื่องจากพอรินทำหน้าที่เป็นโปรตีนหน้าด่านในการเลือกผ่านสารอาหาร โปรตีนนี้จึงมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย และความเกี่ยวข้องกับการคือต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย ทำให้การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของพอรินมีความสำคัญอย่างมากต่อการเข้าใจกลไกการทำงานของโปรตีน ซึ่งจะมีความสำคัญต่อการออกแบบโครงสร้างยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนี้โมเลกุลของพอรินยังมีส่วนที่มีความเป็น immunogenic สูง ดังนั้นจึงมีประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อหลายชนิด รวมทั้ง melioidosis

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ประเมินผลความสามารถของโปรตีนที่สกัดจากเยื่อเซลล์ด้านนอก (outer membrane proteins) ของเชื้อ *B. pseudomallei* ในการสร้างช่องพอริน
2. การแยกยีนพอรินจากเชื้อ *B. pseudomallei* และศึกษาความสามารถในการแสดงออกของโปรตีนพอรินในแบคทีเรีย *E. coli*
3. ศึกษาหน้าที่ในการนำสารต่าง ๆ เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และยาปฏิชีวนะผ่านช่องพอรินที่ผลิตจาก *E. coli*
4. การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนพอรินเพื่อนำไปสู่การอธิบายกลไกการแพร่ของสารผ่านช่องพอริน

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการสกัดโปรตีนที่อยู่ที่ยื่อเซลล์ด้านนอกของเชื้อ *B. pseudomallei* แล้วนำโปรตีนที่สกัดได้มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นช่องพอรินโดยศึกษาอัตราการนำโมเลกุลที่มีขั้วขนาดเล็ก เช่น น้ำตาลแซคคาไรด์ขนาดต่าง ๆ ผ่านเข้าช่องพอริน หลังจากนั้นจะทำการสกัดและโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนพอรินใน *E. coli* แล้วจะทำการทดสอบความสามารถในการสร้างช่องของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สกัดได้ โดยใช้เทคนิค liposome swelling assay โดยจะทดสอบกับน้ำตาลโมเลกุลต่าง ๆ รวมทั้งยาปฏิชีวนะด้วย หลังจากนั้นจะ

ทำการศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างของพอรินที่สร้างจากเชื้อ *E. coli* กับพอรินที่สร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei* โดยมีเป้าหมายที่จะเข้าใจกลไกการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียนี้

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้มี 3 ประการหลักคือ

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัย เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้ใดดำเนินงานมาก่อน จึงคาดว่าผลสัมฤทธิ์จากการวิจัยจะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor มากกว่า 1.5 ได้อย่างน้อย 2 เรื่อง และการเผยแพร่ในรูปแบบโปสเตอร์หรือการบรรยายอีก 1-2 ในที่ประชุมระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ครั้ง
2. เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นเยาว์ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมีและสาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยจัดเป็นความเชี่ยวชาญเฉพาะทางระดับสูงที่มีการถ่ายทอดค่อนข้างมากในสถาบันการศึกษาอื่น ๆ ในประเทศไทย
3. องค์ความรู้ที่ได้เป็นการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับแนวทางป้องกันโรคติดเชื้อร้ายแรง melioidosis ซึ่งผลงานวิจัยจะเป็นการบริการข้อมูลที่สำคัญต่อหน่วยงานแพทย์ของรัฐและเอกชน และสถาบันวิจัยทางการแพทย์ระดับนานาชาติที่จะคิดค้นคว้าหาทางป้องกันโรคติดเชื้อดังกล่าว

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. สถาบันวิจัยทางการแพทย์ เช่น คณะแพทยศาสตร์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ของมหาวิทยาลัยทั่วประเทศ
3. หน่วยงานระดับนานาชาติ เช่น สถาบันวิจัยทางการแพทย์ระดับนานาชาติ และองค์การอนามัยโลก
4. หน่วยงาน R & D ของหน่วยงานเอกชนที่มีเป้าหมายในการผลิตยาปฏิชีวนะหรือผลิตภัณฑ์ขึ้นป้องกันโรค melioidosis

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การเตรียมโปรตีนจากเยื่อเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* (ATCC 23343) และ *B. thailandensis* (ATCC 700388) ในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมเขย่า ทำการปั่นเก็บเซลล์แบคทีเรียที่เจริญเติบโตที่ระยะด้วยความเร็ว 10 000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นทำการเตรียมส่วนที่เรียกว่า 'crude peptidoglycan' ตามวิธีของ Gotoh (Gotoh *et al.*, 1994) กล่าวคือล้างเซลล์ที่เก็บได้ในส่วนตะกอนหนึ่งครั้งแล้วละลายตะกอนด้วย 10 ml ของสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 + 1 mM PMSF + 2 mg hen egg lysozyme ทำให้เซลล์แตกด้วยการคลื่นเสียงความถี่สูงโดยเครื่องมือที่เรียกว่า Sonopuls Ultrasonic homogeniser ประกอบด้วยหัวสั่น ขนาด 6 มม เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นตกตะกอนซ้ำอีกครั้งหนึ่งด้วยความเร็ว 10 000 x g เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์และส่วนของเซลล์ที่ไม่แตกหักออกไป นำส่วนใสที่ได้มาปั่นซ้ำอีกรอบด้วยความเร็ว 12 000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนของเหลวที่ได้จากการปั่นครั้งที่สองประกอบด้วยเยื่อเซลล์ ซึ่งนำมาละลายใน 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 0.5% SDS ต่อจากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเก็บตะกอนด้วยความเร็ว 12 000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนตะกอนที่ได้คือ crude peptidoglycan นำมาละลายใน 4 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่ประกอบด้วย 2% (w/v) SDS และ 0.5 M NaCl แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการปั่นแยกอีกครั้งด้วยความเร็ว 12 000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนใสที่ได้คือส่วนของโปรตีนที่เกาะอยู่ที่เพปทิโดไกลแคนที่ละลาย (solubilized peptidoglycan-associated proteins) ที่จะนำมาศึกษาต่อไป

2.2. การศึกษาการอัตรการผ่านของน้ำตาลเข้าช่องพอรินโดยเทคนิค Proteoliposome swelling assay

ทำการเตรียมโปรตีนโอลิโปโซม ตามวิธีที่ได้รายงานไว้สำหรับพอรินอื่น (Gotoh *et al.*, 1994; Yushimura *et al.*, 1983) โดยทำการผสม 2.4 μ mole phosphatidylcholine กับ 0.2 μ mole diacetylphosphate ในสารละลายคลอโรฟอร์ม แล้วทำให้แห้งด้วยการปั่นใน vacuum หลังจากนั้นทำการละลายฟอสโฟลิปิดที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ด้วยน้ำปริมาตร 0.2 ml ก่อนการเติม 50 μ g ของโปรตีน Omp38 ที่สกัดจากเชื้อ *B. pseudomallei* และเชื้อ *B. thailandensis* ต่อจากนั้นทำการ sonicate เป็นเวลา 7 นาทีในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 °C แล้วทำให้ฟอสโฟลิปิดที่มีโปรตีนฝังอยู่ให้แห้งอีกครั้งหนึ่งใน vacuo หลังจากนั้นเติม 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 15% (w/v) Dextran T-40 ปริมาตร 0.2 ml ส่วนที่ได้คือ โปรตีนโอลิโปโซม ซึ่งนำมาเจือจางด้วยการเติมสารละลายน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุล ต่าง ๆ ได้แก่ L-arabinose (150 kDa), D-glucose (180 kDa), D-mannose (180 kDa), D-galactose (180 kDa), N-acetylglucosamine (GlcNAc) (221 kDa), D-sucrose (342 kDa), D-melezitose (522 kDa) and D-stachyose (667 kDa) ปริมาตร 0.6 ml แล้วดูการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm (A_{400}) เป็นเวลา 60 วินาที การลดลงของค่า A_{400} ที่สังเกตได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับอัตรการแพร่ของน้ำตาลผ่านช่องพอริน

2.3. การผลิตแอนติบอดีและการทดสอบทางอิมมูโนวิทยา

นำโปรตีน BpsOmp38 และ BthOmp38 บริสุทธิ์ปริมาณ 2 μg มาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE ที่ประกอบด้วย 12% อะคริลาไมด์และ 8M urea โดยระบบของ Laemmli (Laemmli, 1970) แล้ว ย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie blue หลังจาก destain ทำการตัดแถบโปรตีนด้วยใบมีดโกนสะอาดออกจากเจลแล้วทำการ emulsify โปรตีนด้วย 50 μl Freund's complete adjuvant (Pierce) แล้วนำไปฉีดเข้ากระต่ายเพื่อการผลิต polyclonal antiserum [ref] นำแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีน Omp38 ปริมาณ 5 μg โดยการทำ Western blotting ทำการตรวจหาการเกิด antigen-antibody complex ด้วยวิธี enhanced chemiluminescence (ECL[®], Amersham Pharmacia Biotech) โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางของแอนติบอดี เป็น 1:10,000 ในสารละลาย phosphate buffer saline, pH 7.4 ที่มี 0.2% Tween 20 และ 5% (w/v) non-fat dried milk

2.4. การตรวจหาชนิดของโปรตีน โดยการวิเคราะห์มวลต่อประจุและการทำ mass fingerprinting โดยเครื่อง MALDI-TOF MS และ ESI/MS

นำโปรตีน Omp38 ที่สกัดได้ในการทดลองที่ 2.1. ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS/PAGE แล้วย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie blue หลังจากนั้นตัดแถบโปรตีนที่มีขนาด 38 กิโลดาลตัน มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน (Bio-Active Co., Ltd, Bangkok, Thailand) เก็บส่วนไซที่มีเพปไทด์หลุดออกมาก่อนขั้นตอนการสกัด เรียกว่า "prepeptides" ไว้ ต่อจากนั้นทำการสกัดเพปไทด์จากเจลตามวิธีของ Shevchenko (Shvchenko et al., 1996) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำแห้งส่วน prepeptides และส่วน peptides ด้วยการปั่นในเครื่อง SpeedVac Vacuum Centrifuge นำส่วน prepeptides มาทำ 'peptide mass fingerprint' ด้วยการหามวลของเพปไทด์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF (Voyager-DE Pro in reflective mode) และใช้กรด alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid เป็น matrix ส่วนของเพปไทด์ที่สกัดได้นำมาแยกด้วยเครื่อง capillary HPLC โดยทำการชะเพปไทด์ด้วย 0-40% linear gradient ของ acetonitrile ที่มี 0.1% acetic acid แล้ววิเคราะห์หามวลด้วยเครื่อง ESI/MS/MS (Thermo Finnigan LCQ Deca) ค่า m/z ของเพปไทด์ที่ได้นำไป submit ใน protein data bank searching โดยใช้โปรแกรม "MS-Fit" (<http://prospector.ucsf.edu/>)

2.5. การเตรียม genomic DNA and cDNA การ cloning และการทำ sequencing

ทำการเตรียม genomic DNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ตามวิธีของ Ausubel (Ausubel et al. 1999) หลังจากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีน BpsOmp และ BthOmp โดยเทคนิค PCR โดยทำการออกแบบคู่ primer จากส่วนเริ่มต้นและส่วนท้ายยีน Omp38 ที่ได้ข้อมูลจาก genome database ของ *B. pseudomallei* ขึ้น PCR ที่ได้นำมาโคลนเข้าใน pGEM-T cloning vector และเรียกโคลนที่ได้ว่า pGEM-T-BpsOmp38 และ pGEM-T-BthOmp38 ทำการตรวจสอบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สกัดได้ด้วยการทำ automatic DNA sequencing โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์กับ BioService Unit (Bangkok) ก่อนที่จะนำโคลนทั้งสองมาใช้เป็น template ในการทำ PCR อีกครั้งหนึ่งโดยใช้คู่ primer ที่มีลำดับดังนี้

Forward primer: 5'-CATGCCATGGCTCAAAGCAGCGTCACGC-3'

Reverse primer, 5'-CCGCTCGAGTTAGAAGCGGTGACGCAGACC-3'

ส่วนที่ขีดเส้นใต้ของ forward primer แสดง NcoI site และของ reverse primer แสดง XhoI site ตามลำดับ
 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มีขนาด 1.1 kb เป็นยีน BpsOmp38 และ BthOmp38 ที่ไม่มีส่วนของ signal peptide
 อยู่ ทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าไปในพลาสมิด pET-23d(+) และเรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pET-23d(+)-
 BpsOmp38 และ pET-23d(+)-BthOmp38 ทำการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำ PCR โดยใช้คู่ primer ข้างบน
 แล้วจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และ *E. coli* BL21 (Origami)
 เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป

2.6. การเตรียม inclusion bodies จากโปรตีน Omp38 ที่ผลิตจาก *E. coli* BL21 (Origami)

ทำการเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* BL21 (Origami) ใหม่ ๆ ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET23d(+)-
 Omp38 ใน 50 ml ของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB/amp ที่มี 1% กลูโคส (Pullen et al., 1995) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ
 37 °C แล้วถ่ายเชื้อลงใน 500 ml LB/amp ทำการเลี้ยงเชื้อต่อ จนค่า OD₆₀₀ ~0.6 แล้วเติม isopropyl- β -D-
 thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.4 mM เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อุณหภูมิ 37
 °C เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็วในการปั่น 10,000 x g เป็นเวลา 30 นาที แล้ว
 ละลายส่วน cell pellet ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 1mM EDTA และ 100 mM NaCl (TEN buffer) ด้วย
 อัตราส่วน 3 ml ของ TEN buffer ต่อเซลล์ 1 กรัม หลังจากนั้นเติม 1 mM PMSF และ lysozyme (2 mg/ml) ลงไป
 แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีแรงสั่นสะเทือนแบบใช้เสียงด้วยเครื่อง Sonopuls Ultrasonic homogeniser ที่มีหัว probe
 ขนาด 6 mm ติดอยู่ หลังจากนั้นทำการปั่นแยกเศษเซลล์ออกจากส่วนใสด้วยการปั่นที่ความเร็ว 20 000 x g ที่ 4 °C
 นำส่วนตะกอนมาล้างด้วย 10 ml 2 M urea ที่มี 0.05% (v/v) Tween 20 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM Tris/HCl, pH
 8.0 แล้วปั่นล้างอีกครั้งหนึ่งด้วยความเร็ว 20 000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ตะกอนในขั้นตอนนี้เป็น
 ส่วน inclusion bodies ของโปรตีน Bps/Bth Omp38

2.7. การทำให้โปรตีนเสียสภาพและการทำ refolding ของ Bps/Bth Omp38

นำส่วนของ inclusion bodies ที่เตรียมได้มาละลายด้วย 10 ml ของ denaturing buffer ที่ประกอบด้วย 8 M
 urea ใน 25 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ก่อนทำการปั่นด้วยความเร็ว 20 000 g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2
 ชั่วโมง ทำบริสุทธิ์ต่อโดยนำส่วนใสมา apply ลงในคอลัมน์ prepacked SP Fast Flow HiTrap™ (1.5 cm×3 cm)
 (Amersham Biosciences) ตามด้วยคอลัมน์ prepacked DEAE Fast Flow HiTrap™ (1.5 cm×3 cm) (Amersham
 Biosciences) ทำการชะคอลัมน์ทั้งสองคอลัมน์ด้วย 0–0.3 M step gradient ของ NaCl ใน 25 mM sodium acetate
 buffer, pH 5.0 โดยใช้ flow rate ขนาด 1 ml/min เก็บส่วนที่ถูกชะออกมาในหลอดทดลอง ๆ ละ 2 ml นำไปวัดค่า
 A₂₈₀ และวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ด้วย SDS/PAGE ทำการส่วนที่ถูกชะที่มีโปรตีนขนาด 38 kDa เข้าด้วยกันแล้ว

ตกตะกอนโปรตีนข้ามคืนด้วย 50% (v/v) ethanol ที่ -20°C แล้วปั่นเก็บตะกอนโปรตีนที่ 20 000 g 20 นาที นำตะกอนมาละลายด้วย 2 ml 8 M urea ใน 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 วัดหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วย BCA kit แล้วปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้เป็น 5 mg/ml ด้วย Tris/HCl/urea buffer ต่อจากนั้นทำการ refolding โปรตีน Bps/Bth Omp38 ด้วยการเจือจางโปรตีนด้วยอัตราส่วน 1:1 ของสารละลาย refolding solution (20 mM Tris/HCl ที่มี 10% (w/v) Zwittergent® 3-14, 200 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 10 mM EDTA และ 0.02% NaN_3) หลังจากนั้นทำการต้มสารละลายโปรตีนที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งสารละลายโปรตีนข้ามคืนไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200® HR column (1.5 cm \times 95 cm) ที่ทำการ equilibrate ไว้แล้วด้วย 20 mM Tris/HCl, pH 7.0 ที่มี 0.05% (w/v) Zwittergent® 3-14 ส่วน flow rate ที่ใช้คือ 0.5 ml/min และทำการเก็บ fraction ละ 2 ml ทำการวิเคราะห์หาโปรตีนขนาด 110 kDa ด้วย SDS/PAGE ภายได้สภาวะที่ไม่ต้มหลังจากนั้นรวมโปรตีนแล้วทำให้เข้มข้นที่ปริมาตร 1 ml ในถุง dialysis ด้วย PEG 20000 ในขณะที่เดียวกันก็ทำการแลกเปลี่ยนบัฟเฟอร์ด้วยวิธี dialysis ให้เป็น 20 mM Tris/HCl, pH 7.0 ที่มี 0.05% Zwittergent® 3-14 ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นวัดหาความเข้มข้นของโปรตีนสุดท้ายด้วยวิธี BCA assay แล้วเก็บสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ไว้ที่ -30°C หรือนำมาวิเคราะห์ต่อไป

2.8. การทำนายโครงสร้างและการทำ molecular modeling

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนพอรินจากแบคทีเรียหลาย ๆ ชนิดมาเปรียบเทียบโดยทำ amino acid alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) แสดงผลการทำ alignment ด้วยโปรแกรม Genedoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>) ทำการวิเคราะห์หา signal peptide และตำแหน่งตัด ด้วยโปรแกรม Signal P V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ทำการวิเคราะห์หา transmembrane domains ด้วยโปรแกรม Protein localisation sites (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/okumura.pl>) และใช้โปรแกรม RPS-BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) เพื่อหาโดเมนที่ conserve ส่วนการทำนายโครงสร้างสามมิติ และแสดงโครงสร้างด้วยโปรแกรม Swiss-model และ 3D-PSSM (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dssm> และ <http://www.expasy.org/swissmod>)

2.9. การหาความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน

หาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายที่เตรียมด้วยวิธี BCA assay (Pierce, USA) ดังนี้คือ ผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 12.5 μl กับ BCA working reagent ปริมาตร 100 μl ในไมโครเพลท แล้วบ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดหาค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader spectrophotometer (Labsystem, Finland) ส่วนกราฟมาตรฐานของโปรตีนใช้ bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.025–2.0 mg/ml

2.10. การตรวจสอบโครงสร้างทุติยภูมิโดยวิธี Circular Dichroism (CD)

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนในรูป unfold เทียบกับ fold ด้วย โดยวิธี Circular Dichroism (CD) ด้วยเครื่อง Jasco J-715 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Japan) ดังนี้คือ เตรียมสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 0.5 mg/ml มาวัดหาค่า CD spectral data ในช่วง far UV (180-250) และ near UV (250-320 nm) ที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ scan speed เท่ากับ 20 nm/min ค่า bandwidth เท่ากับ 2 nm และตั้งค่า sensitivity เป็น 100 mdeg มี average response time เท่ากับ 2 s และ optical path length เป็น 0.2 mm ในแต่ละตัวอย่างของการวัดเป็นผลเฉลี่ยของการ scan อย่างน้อย 3 ครั้ง ค่า baseline ของ spectra ของโปรตีนดั้งเดิมได้จากสารละลายบัฟเฟอร์คือ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ส่วน baseline ของ spectra ของโปรตีนที่ unfold คือ สารละลาย 8M urea ใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ส่วน baseline buffer ของโปรตีนที่ทำการ refold คือ 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ที่มี 0.05% Zwittergent®3-14 ทำการเปลี่ยนข้อมูลที่ได้จากการวัดให้เป็น mean residue molar ellipticity (MRE) โดยสมการข้างล่าง

$$[\theta] = (73.33 \text{ m}^\circ) / ([\text{protein}]_{\text{mM}} \cdot l_{\text{cm}} \cdot n)$$

โดยที่ค่า $[\theta]$ คือค่า MRE ในหน่วย $\text{deg.cm}^2/\text{dmole}$ ค่า n เป็นจำนวนกรดอะมิโนในสายโพลีเพปไทด์และค่า m° คือค่า ellipticity ที่วัดได้ ส่วนค่า 1 คือเส้นทางเดินแสงในหน่วยเซนติเมตร

2.11. การศึกษาผลของ anti-*BpsOmp38* polyclonal antibodies ต่อการนำเข้าน้ำตาลของช่องพอริน *Bps/BthOmp38*

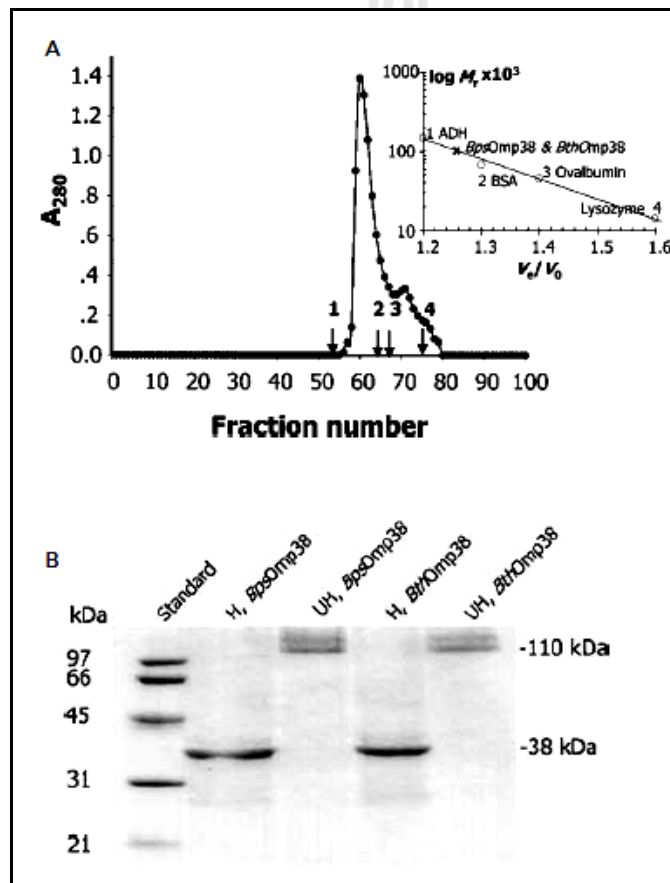
ทำการเจือจาง anti-*BpsOmp38* polyclonal antibodies: 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, และ 1:100 000 แล้วผสมกับrefolded หรือ native *Omp38* ปริมาณ 50 μg บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการ reconstitute โปรตีนเข้าไปใน proteoliposomes แล้วศึกษาอัตราการผ่านเข้าสู่ช่องพอรินโดยวิธี liposome swelling assays ในการทดลองนี้ใช้ proteoliposome ที่ผสมอยู่กับแอนติบอดีที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังที่กล่าวแล้วกับโปรตีน BSA เป็น negative

บทที่ 3

ผลการทดลองและข้อวิจารณ์

3.1. การเตรียม outer membrane proteins จากเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis*

ผู้วิจัยได้ทำการสกัด outer membrane proteins จากส่วน crude peptidoglycan ของเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ดังวิธีที่ได้อธิบายในส่วนของการทดลอง หลังจากการทำ SDS extraction แล้วได้ทำบริสุทธิ์ต่อของโปรตีนที่ได้จากส่วน peptidoglycan โดยวิธี size-exclusion chromatography คอลัมน์ที่ใช้คือ Sephacryl S-200[®] HR ขนาด 1.5 cm x 80 cm ที่ได้ equilibrate ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 1% SDS และ 0.5 M NaCl ทำการเก็บ fraction ละ 2 ml แล้ววัดหาโปรตีนของแต่ละ fraction ด้วยค่า A_{280} ดังกราฟในรูปที่ 3.1A พบว่า peak ของโปรตีนออกมาในช่วง fraction ที่ 55-80 โดยมียอด peak อยู่ที่ fraction ที่ 61 เมื่อหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ยอด peak จากกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเท่ากับ 110 kDa



รูปที่ 3.1 การทำบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของ outer membrane protein ที่สกัดจาก crude peptidoglycan ของเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004a)

(A) การทำบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย gel filtration chromatography โดยใช้คอลัมน์ Sephacryl S200[®] HR และ (B) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วย SDS-PAGE

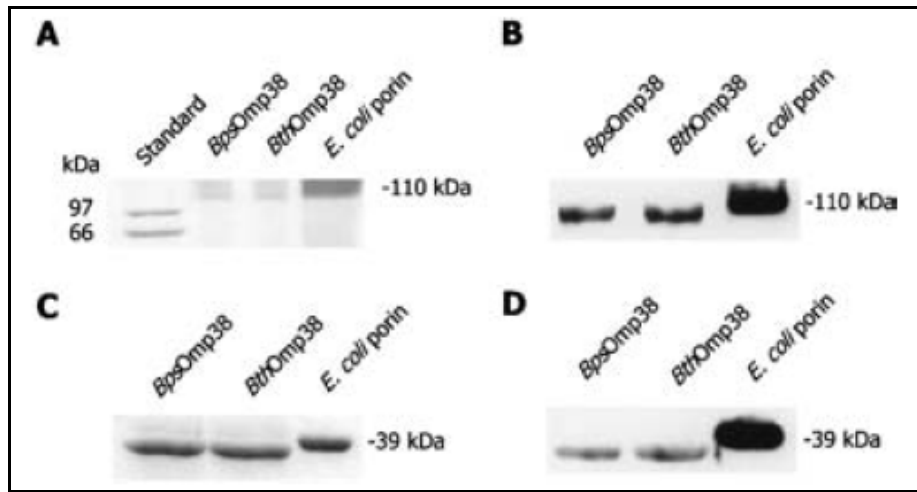
เมื่อนำ fraction ที่มีโปรตีนที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephacryl S200[®]HR ไปวิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างที่ต้มที่ 95 °C ก่อนการวิเคราะห์จะอยู่ที่ 38 kDa ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างที่ไม่ได้ต้มอยู่ที่ 110 kDa ดังแสดงในรูปที่ 3.1B ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า outer membrane protein ที่เตรียมได้น่าจะมีลักษณะเป็น trimeric protein ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่เท่า ๆ กันคือ 38 kDa ผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับการศึกษาในพอรินชนิดอื่น ๆ เช่น *E. coli* OmpF (Cowan et al., 1992) ที่พบว่าโปรตีน OmpF จะทนต่อการเสียดสภาพด้วย SDS แต่จะไวต่อความร้อน ในการศึกษาต่อไปจะอ้างถึงโปรตีนที่สกัดได้จาก outer membrane ของ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ว่าเป็น BpsOmp38 และ BthOmp38 ตามลำดับ จากการเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร พบว่าให้ปริมาณโปรตีนบริสุทธิ์ 800 µg และ 600 µg สำหรับ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ผลการทำบริสุทธิ์ของโปรตีน BpsOmp และ BthOmp38 ที่ขั้นตอนต่าง ๆ (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004a)

Purification step	<i>B. pseudomallei</i> (mg)	Yield (%)	<i>B. thailandensis</i> (mg)	Yield (%)
1. Crude peptidoglycan	492.0	100	296.0	100
2. OM fraction	175.4	36	107.4	36
3. Peptidoglycan-associated fraction				
0.5 % (w/v) SDS extraction	5.4	1.1	3.4	1.1
2 % (w/v) SDS and 0.5 M NaCl extraction	5.0	1.0	3.0	1.0
4. Sephacryl S200 filtration and dialysis	0.8	0.2	0.6	0.2

3.2. การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค western blot analysis

ทำการผลิต polyclonal antibodies ที่จำเพาะต่อโปรตีน Bps/Bth Omp38 จากแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 38 kDa จาก 12% SDS-PAGE gel ผลการวิเคราะห์ทาง immunoblotting พบว่า antiserum ที่เตรียมได้สามารถ cross react กับโปรตีน Bps/BthOmp38 ทั้งขนาด 110 kDa และ 38 kDa แต่ไม่ cross react กับโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็น MW marker เลย และไม่พบว่า pre-immune serum ทำปฏิกิริยากับโปรตีน Omp38 ทั้งสองตัว แสดงว่า polyclonal antibodies ที่ผลิตขึ้นมีความจำเพาะต่อทั้ง trimeric Omp38 และ monomeric Omp38 ดังแสดงในรูปที่ 3.2 นอกจากนี้ยังพบว่า anti Bps/BthOmp38 ที่เตรียมได้สามารถ cross react กับ *E. coli* OmpF และ *B. cepacia* Omp ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน Omp ที่สกัดจาก outer membrane ของ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* น่าจะมีโครงสร้างและหน้าที่สอดคล้องกับพอรินจาก *E. coli* และพอรินจาก *B. cepacia*



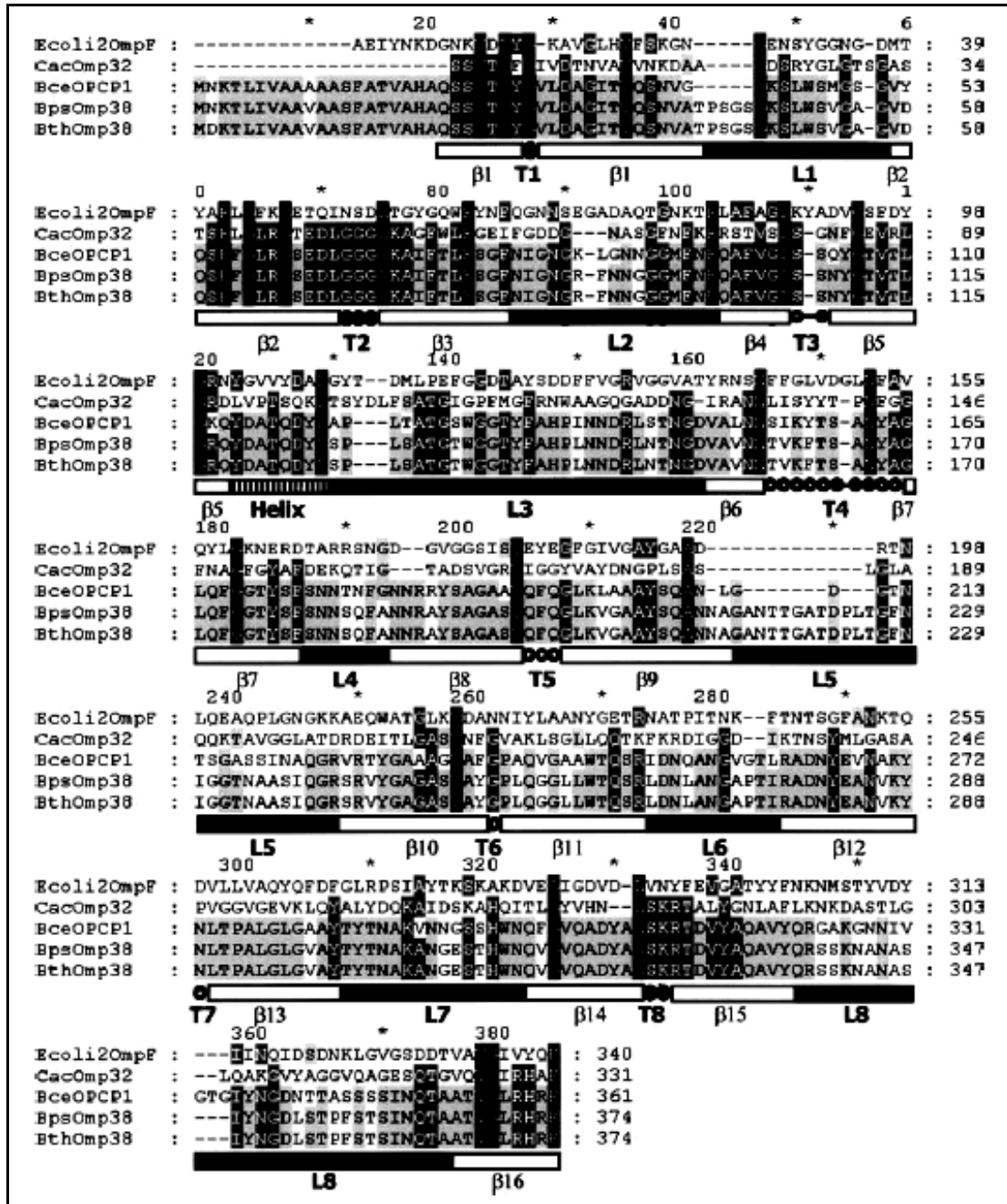
รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์โปรตีน Bps/Bth Omp38 ด้วยเทคนิค immunoblotting (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004a)

- (A) SDS-PAGE แสดงตำแหน่งของ trimeric Omp38 ที่ 110 kDa
- (B) Immunoblot ของ trimeric Omp38
- (C) SDS-PAGE แสดงตำแหน่งของ monomeric Omp38 ที่ 38 kDa
- (D) Immunoblot ของ monomeric Omp38

3.3. การแยกยีน การโคลนยีนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหายีน Omp38 โดยการย่อยแถบโปรตีน BpsOmp38 บน SDS-PAGE gel แล้วสกัดเอา tryptic peptides ที่ได้ไปวิเคราะห์หา mass-to-charge (m/z) ของเปปไทด์ที่สกัดได้ด้วย MALDI-TOF MS หรือ capillary HPLC MS แล้วทำ peptide mass fingerprinting เพื่อตรวจหาโปรตีนที่มี m/z ที่สอดคล้องกันใน Swiss-Prot database พบว่ามีชิ้นของเปปไทด์ทั้งหมด 8 เปปไทด์ คือ TDVYAQAVYQR, GSEDLGGGLK, SLWSVGAGVDQSR, LNTNGDVAVNNTVK, AYSAGASYQFQGLK, QAFVGLSSNYGTVTLGR, AIFTLESGFNIGNGR, และ NANASIYNGDLSTPFSTSINQTAATVGLR ที่ตรงกับเปปไทด์ของพอริน OpcP1 ของเชื้อ *B. cepacia* จึงใช้ยีนของ OpcP1 มาทำ blast search พบว่าตรงกับ open reading frame หนึ่ง ใน contig 836 ในจีโนมของ *B. pseudomallei* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) ซึ่งประกอบด้วย 1,112 นิวคลีโอไทด์ จึงทำ PCR amplification ของ ORF ดังกล่าวจากจีโนมของ *B. pseudomallei* โดย sense primer ที่ใช้มีลำดับของนิวคลีโอไทด์เป็น 3'-ATGAACAAGACTCTGATTGTTGCA-5' และ antisense primer มีลำดับของนิวคลีโอไทด์เป็น 3'-GAAGCGGTGACGCAGACCAA-5' และใช้คู่ primer เดียวกันทำ PCR amplification ของยีนในจีโนมของ *B. thailandensis* แล้วโคลนยีนทั้งสองที่ให้ชื่อว่า *BpsOmp38* และ *BthOmp38* เข้าไปใน pGEM[®]-T vector แล้วส่งรีคอมมิแนนท์พลาสมิดที่ได้ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองโดยการทำ double stranded nucleotide sequencing แล้วจึง deposit ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองใน GenBank database โดยมี GenBank accession numbers AY312416 และ AY312417 สำหรับ *BpsOmp38* และ *BthOmp38* ตามลำดับ การเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *BpsOmp38* มีความเหมือนกับยีน *BthOmp38* อยู่ 98% แต่เมื่อ

เปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนพบว่าโปรตีนทั้งสองมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกันเกือบ 100% ยกเว้นกรดอะมิโนตัวเดียวที่ต่างกันคือ กรดอะมิโน Asparagine ใน BpsOmp38 เปลี่ยนเป็น Aspartic acid ใน BthOmp38 รูปที่ 3.3 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ BpsOmp38 และ BthOmp38 กับพอริน B. cepacia OPCP1, C. acidovolans Omp32 และ E. coli OmpF

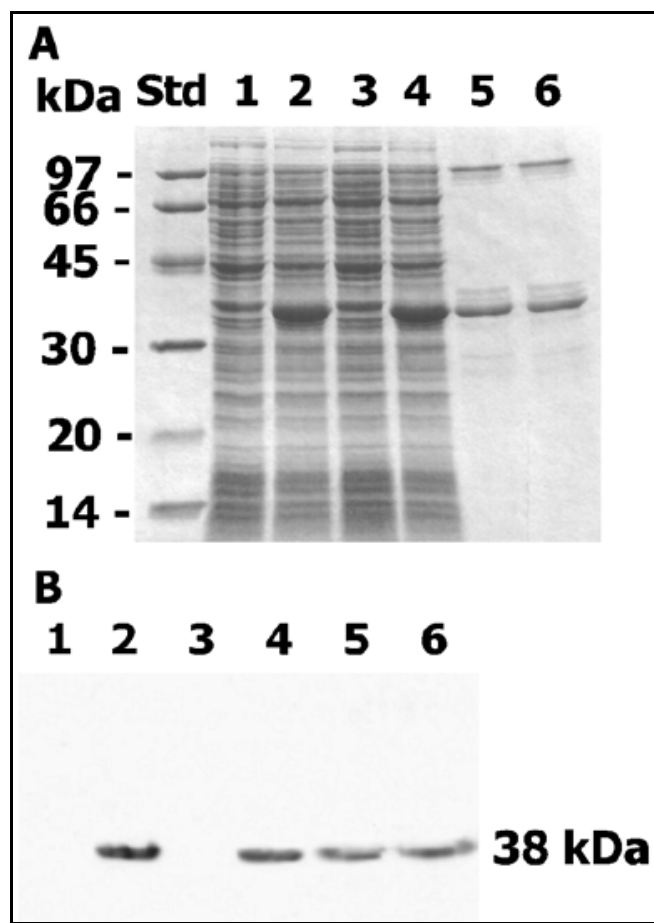


รูปที่ 3.3 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ Bps/Bth Omp38 กับพอรินของแบคทีเรียอื่น ๆ (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004a)

โครงสร้างทุติยภูมิแสดงดังนี้ open box แสดง β strand; closed box แสดง loop; hatched box แสดง α helix และ circle แสดง turn

3.4. การศึกษาการแสดงออก และการทำบริสุทธิ์ การทำ refolding ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli*

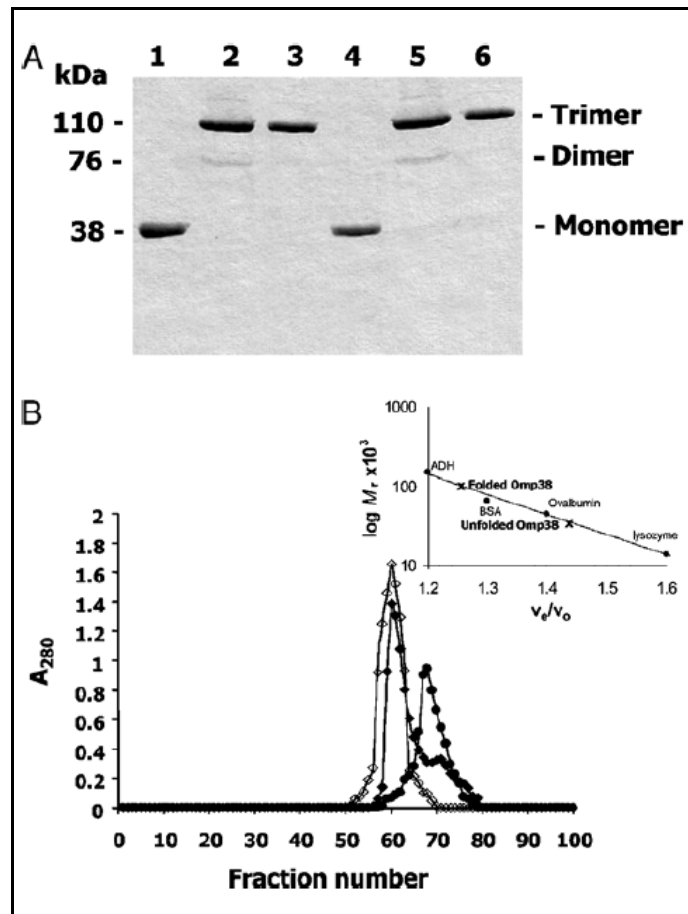
เมื่อโคลนยีน Bps/Bth Omp38 เข้าไปในพลาสมิด pET23d(+) ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดคือ pET23d(+)-*BpsOmp38* และ pET23d(+)-*BthOmp38* ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* Origami(DE3) หลังจากได้เลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมิดที่มียีน Omp38 อยู่จนถึงระยะ log phase ($OD_{600} \sim 0.6$) ทำการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Omp38 ด้วย 0.4 mM IPTG ที่ 37 °C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาทำให้แตกแล้ววิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนที่มีความเข้มข้นมากกว่าเซลล์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแต่ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG อยู่ที่ตำแหน่งประมาณ 30-45 kDa ดังแสดงในรูปที่ 3.4A ซึ่งแถบโปรตีนนี้สามารถเกิด cross react กับ anti BpsOmp38 polyclonal antibodies ได้แถบสัญญาณเข้มเพียงแถบเดียวดังแสดงในรูปที่ 3.4B จึงสรุปว่าโปรตีนที่ *E. coli* สร้างขึ้นเป็นรีคอมบิแนนท์ Bps/Bth Omp38



รูปที่ 3.4 การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ Bps/Bth Omp38 โดย *E. coli* BL21 (Origami) (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004b)

(A) การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (B) Western blotting ช่องที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐาน; ช่องที่ 2, 4 เซลล์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน Bps/BthOmp38 แต่ไม่ได้เติม IPTG; ช่องที่ 3, 5 เซลล์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน Bps/BthOmp38 ที่เติม IPTG; ช่องที่ 6, 7 native Bps/BthOmp38 ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว

เมื่อทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ในปริมาณมากพบว่าเซลล์ผลิตโปรตีนในรูป inclusion bodies ซึ่งไม่ละลายน้ำ จึงได้ทำบริสุทธิ์ โดยนำส่วนของตะกอน inclusion bodies นำมาละลายใน denaturing buffer ที่มี 8M urea ใน 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 หลังจากปั่นตกตะกอนเอาส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วผ่านส่วนโอสองในคอลัมน์ที่มีคุณสมบัติเป็น strong cation exchanger (SP Fast Flow™ HiTrap) ตามด้วย weak anion exchanger (DEAE Fast flow HiTrap™) นำส่วนของโปรตีนที่ถูกชะด้วยเกลือในช่วง 0-0.3 M NaCl มาวัดหาค่าโปรตีนที่ A_{280} แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์ต่อด้วย SDS-PAGE หลังจากนั้นทำการ refold โปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วย 8M urea ด้วยการเติมสารละลาย refolding solution (20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ที่มี 10% (w/v) Zwittergent® 3-14, 200 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, 10 mM EDTA และ 0.02% NaN₃) ในปริมาตร 1:1 แล้วตั้งสารละลายโปรตีนใน 10% Zwittergent ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้อุณหภูมิการ folding เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ แล้วนำมาวิเคราะห์การสร้างรูปไตรเมอร์ขนาด 110 kDa



รูปที่ 3.5 การทำ refolding ของ Bps/Bth Omp38 (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004b)

(A) SDS-PAGE แสดงรูปไตรเมอร์ของโปรตีนที่ได้จากการ refold ด้วย 10% Zwittergent ช่องที่ 1 , 4 โปรตีนโมโนเมอร์ Bps/Bth Omp38 ก่อนทำ refolding; ช่องที่ 2,5 โปรตีนไตรเมอร์ Bps/Bth Omp38 หลังทำ refolding; ช่องที่ 3, 6 โปรตีนที่ถูก refold และผ่านการต้มที่ 95 °C นาน 5 นาที (B) การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ refold ด้วยคอลัมน์ Sephacryl-S200 HR gel filtration

รูปที่ 3.5A แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE การเกิด refolding ของ Omp38 ด้วย พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่เกิดการ refold จากรูปโมโนเมอร์ขนาด 38 kDa ไปเป็นรูปไตรเมอร์ขนาด 110 kDa ส่วนของแถบโปรตีนขนาดประมาณ 76 kDa แสดงถึงตำแหน่งของโปรตีนไดเมอร์ที่เกิดขึ้นในปริมาณเล็กน้อย ผลการทดลองที่น่าสังเกตคือถ้าต้มโปรตีนที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จะทำให้โปรตีนเปลี่ยนรูปเป็นไตรเมอร์อย่างสมบูรณ์ (ช่องที่ 3 และ 6) ส่วนรูปที่ 3.5b แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของ refolded Bps/Bth Omp38 โดยโครมาโตกราฟี gel filtration พบว่าโปรตีนสามารถคงรูปไตรเมอร์หลังจากผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 HR ที่มีความเข้มข้นของ Zwittergent ลดลงจาก 10% เป็น 0.05% น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการหาจากกราฟมาตรฐานคือ ~100 kDa ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของ Bps/Bth Omp38 ที่สกัดได้จาก outer membrane ของเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis*

3.5. การยืนยันการผลิตภัณฑ์คอมบิแนนท์โปรตีน Omp38 โดยวิธี MALDI-TOF MS

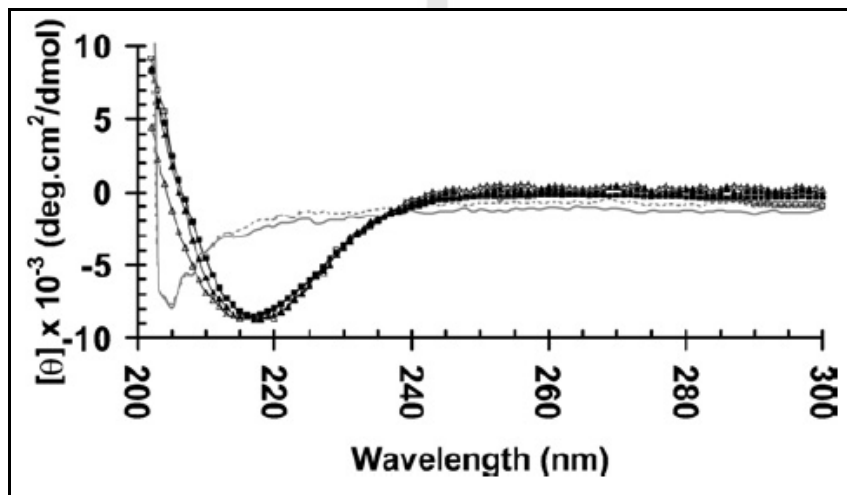
ในการตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ผู้วิจัยได้ตัดแถบโปรตีนขนาด 38 kDa แล้วทำการย่อยในแผ่น SDS-PAGE gel ด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้วสกัดเอาเปปไทด์ออกมาวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF แล้ว submit ค่า m/z ของเปปไทด์ที่ได้ทั้งหมดใน Swizz-Prot database และ nucleotide database พบว่ามีเปปไทด์ทั้งหมด 7 เปปไทด์ที่ให้ค่า monoisotopic mass ตรงกับโปรตีน Omp38 จาก *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ดังแสดงในรูปที่ 3.6 ผลการทดลองที่ได้ประกอบกับผลของ immunoblotting ทำให้สรุปว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ *E. coli* (Origami) ผลิตขึ้นเป็น Bps/Bth Omp38

	P1	
QSSVTLYGVLDAGITYQSNVATPSGSGK	<u>SLWSVGAGVDQSR</u>	FGLRGSEDLGG
P2		P3
GLK <u>AIETLES</u> GENIGNGRFNNGGGMFNR	<u>QAEVGLSSNYGTVTLGR</u>	QYDA
TQDYLSPLSATGGGTYFAHPLNNDRLNTNGDVAVNNTVK	<u>FTSANYAGLQEGGT</u>	
		P4
<u>YFSNNSQFANNR</u> AYSAGASYQFQGLKVGAAYSQANNAGANTTGATDPLTGF		
	P5	* P6
NIGAASIQGRSR <u>VYGAGASYAYG</u> PLQGGLLWT <u>QSRLDNL</u> ANGAPT <u>I</u>		
ADNYEANVKYNLTPALGLGVAYTYTNAKANGESTH		
	P7	
R <u>TDVYAQAVYQR</u> SSKNANASIYNGDLSTPFSTSINQTAATVGLRHRF		

รูปที่ 3.6 การตรวจหาโปรตีน Omp38 โดย MALDI-TOF MS (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004b) เปปไทด์ที่ขีดเส้นใต้ P1-P7 คือเปปไทด์ที่ตรงกับโปรตีน Bps/Bth Omp38 จากการทำ peptide mass fingerprinting

3.6. การศึกษาการ folding ของโปรตีน Omp38 โดยวิธี Circular Dichroism (CD) spectroscopy

เพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์ Omp38 มีโครงสร้างโปรตีนที่สร้างช่องพอรินได้หลังจากทำ folding ได้นำสารละลายโปรตีน Omp38 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CD spectroscopy เทียบกับโปรตีนก่อนผ่านการ folding และเทียบกับโปรตีน Omp38 ที่สกัดจากเชื้อ *Burkholderia* โดยตรง รูปที่ 3.7 แสดง CD spectra ของโปรตีน Omp38 ที่สภาวะต่าง ๆ จากรูปจะเห็นว่า Omp38 ที่ได้จากการ refold ด้วย 10% (w/v) Zwittergent มีรูปแบบของ spectrum เหมือนกับโปรตีนไตรเมอร์ดั้งเดิม โดย spectra ของทั้งสองโปรตีนให้ peak ที่มีค่าติดลบใกล้ 215 nm ซึ่งแสดงตำแหน่งของโครงสร้างหลักเป็นแบบ β -sheet structure ส่วน spectra ของโปรตีนโมโนเมอร์ที่ทำให้เสียสภาพด้วย urea ให้ peak ที่มีค่าติดลบที่ 205 nm ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างแบบ random coil โดยรวมลักษณะ peak ของโปรตีนไตรเมอร์และโมโนเมอร์ที่ได้มีลักษณะเหมือนกับ CD spectra ของไตรเมอร์และโมโนเมอร์ของพอริน OmpA ของ *E. coli* ของนักวิจัยกลุ่มอื่นที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (Eisele & Rosenbusch, 1990)



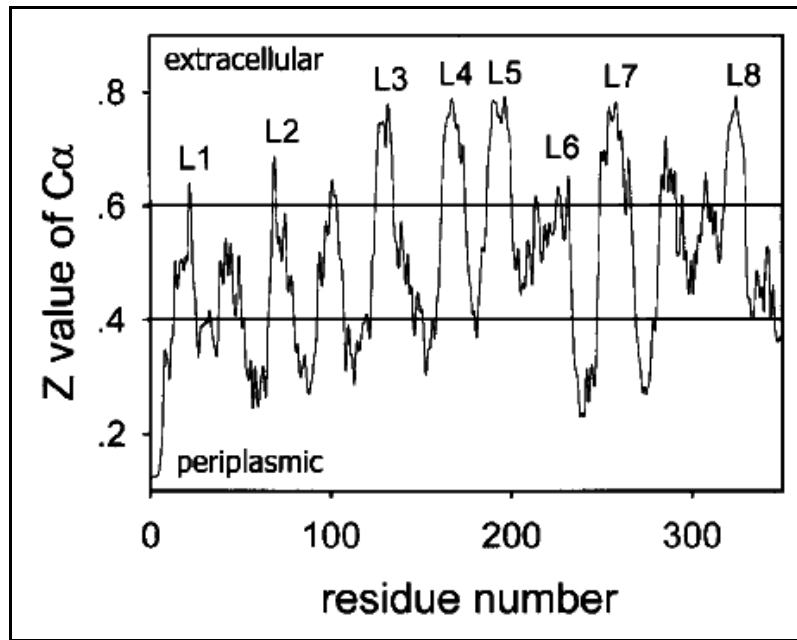
รูปที่ 3.7 CD spectra ของรีคอมบิแนนท์ Bps/Bth Omp38 (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004b)

สัญลักษณ์ — แสดงโปรตีนที่เสียสภาพของ BpsOmp38; --- แสดงโปรตีนที่เสียสภาพของ BthOmp38; ◇ แสดง native BpsOmp38; ◆ แสดง refolded BpsOmp38; □ แสดง native BthOmp38; ■ แสดง refolded BthOmp38

3.7. การทำนาย transmembrane domains และการทำนายโครงสร้างสามมิติ

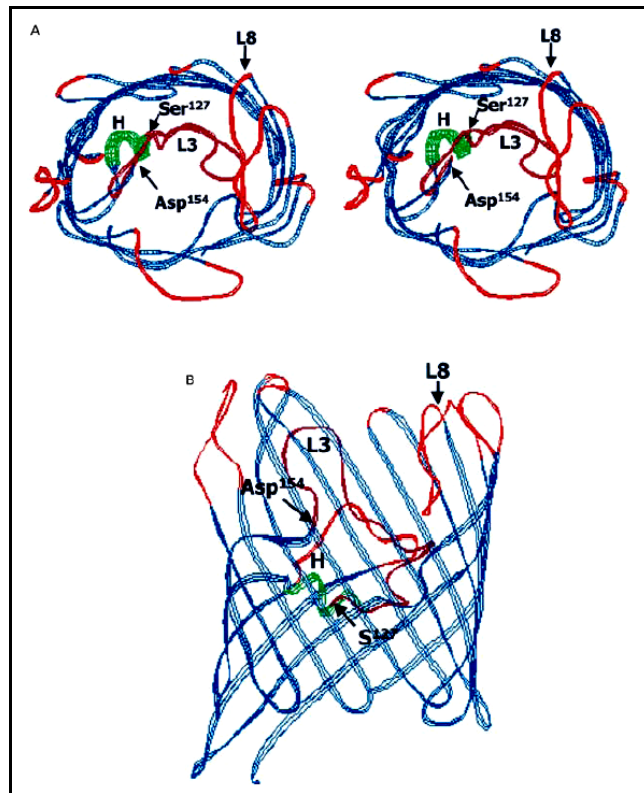
งานวิจัยต่อมาคือการทำนายโครงสร้างของ transmembrane domain ของโปรตีน Bps/Bth Omp38 ตามวิธีของ Diederichs (Diederichs et al., 1998) รูปที่ 3.8 เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Z value ของ C_{α} ในช่วง 0-1 กับ residue number ในสายโพลีเพปไทด์ของโปรตีน Bps/Bth Omp38 ค่า Z value จะแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนในเยื่อหุ้มสองชั้นของ outer membrane ถ้าค่า Z value มีค่าน้อยกว่า 0.4 แสดงว่ากรดอะมิโนอยู่ในส่วนของ periplasmic turn แต่ถ้าค่า Z value มีค่าอยู่ในช่วง 0.4 - 0.6 แสดงว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งนั้นอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มสองชั้นและน่าจะเป็นส่วนของ transmembrane domain ถ้าค่า Z value มีค่ามากกว่า 0.6 แสดงว่ากรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบของ loop ที่อยู่ด้านนอก outer membrane จากรูปพบว่าโปรตีน Omp38 ประกอบด้วยสาย β -strand ที่

เป็นส่วนของ membrane crossing ทั้งหมด 16 สาย มีส่วน loop ทั้งหมด 8 loops (L1-L8) และมี periplasmic turn ทั้งหมด 8 เส้น มาประกอบกันเป็นโครงสร้าง β -barrel ที่มี transmembrane domain ทั้งหมด 16 โดเมน



รูปที่ 3.8 กราฟ Diederichs แสดงการทำนาย transmembrane domain ของ Bps/Bth Omp38 (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004a)

ส่วนรูปที่ 3.9 แสดงผลการทำนายโครงสร้างสามมิติโดยใช้โปรแกรม 123D+ และ Swiss-Model พบว่า โปรตีนมีความเหมือนกับพอรินที่เลือกประจุลบ Omp32 (PDB 1e54a) จากเชื้อ *Comanmonas acidovolans* (Zeth et al., 2000) มากที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในแง่ของโครงสร้างอยู่ 35.8% โปรตีนมีลักษณะเป็น barrel ที่ประกอบด้วยสาย β -strand ทั้งหมด 16 สาย มีส่วนของ loop ทั้งหมด 8 เส้น ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำนาย membrane topology ในรูปที่ 3.8 ส่วน loop ที่ยาวที่สุดคือ Loop3 (L3) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 28 ตัว คือ Ser¹²⁷ → Asp¹⁵⁴ ภายในของโครงสร้าง barrel มี β strand สองสายที่วิ่งลักษณะสวนทางกันและที่ปลายของ Loop3 ด้าน N-terminus มีสาย α helix มีลักษณะเป็นเกลียวเวียนขวา สั้น ๆ ประกอบด้วยกรดอะมิโน Tyr¹¹⁹ → Lue¹²⁶ จากโครงสร้างของ *C. acidovolans* Omp32 พบว่า Loop3 ยื่นเข้าไปในบริเวณกลางช่องและน่าจะทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดขนาดของสารที่จะผ่านเข้าออกบางครั้งเรียก Loop3 ว่า ‘the pore-confined loop หรือ eyelet’ (Zeth et al., 2000; Breden et al., 2002)

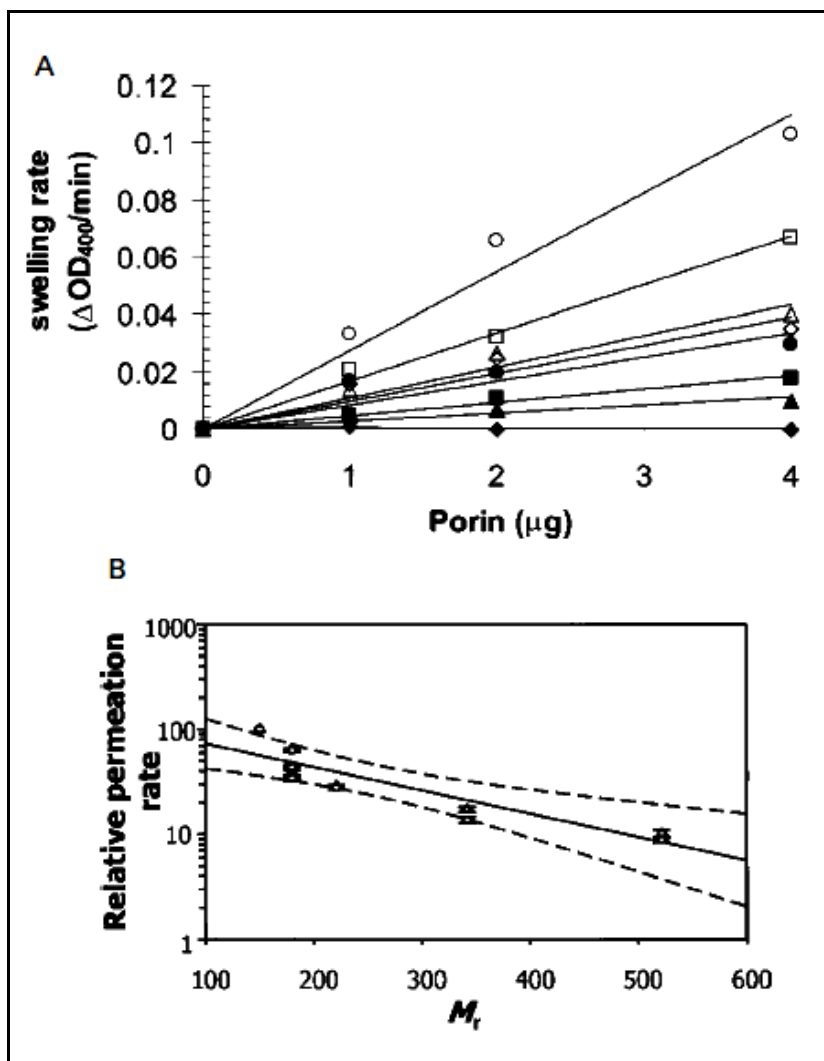


รูปที่ 3.9 การทำนายโครงสร้างสามมิติของ Bps/Bth Omp38 (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004a) โครงสร้างสามมิตินำมาโดยโปรแกรม แสดงโครงสร้างสามมิติ 123D+ และ Swiss-Model และแสดงโครงสร้างด้วยโปรแกรม Swiss-pdb Viewer version 3.7b2 โดยใช้โครงสร้างของ Omp32 จากเชื้อ *C. acidovorans* เป็นโครงสร้างต้นแบบ (A) แสดงโครงสร้าง stereo จากด้านบน (B) แสดงโครงสร้างจากด้านข้าง ลูกศรชี้แสดง Loop8 และ Loop3 ที่เป็น loop ยาว โดยที่ Loop3 ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดขนาดของสารผ่านช่องพอริน Omp38

3.8. การวัดกานำสารผ่านเข้า-ออกผ่านช่องพอริน Omp38 ด้วยวิธี liposome swelling assay

นำโปรตีน *BpsOmp38* และ *BthOmp38* ที่ทำการ refold ด้วย Zwittergent[®] 3-14 มา reconstitute เข้าไปในโปรติโอลิโปโซม เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างช่องพอรินของโปรตีนที่เตรียมได้ใหม่ ๆ หลักการคือถ้าโปรตีนสร้างช่องพอรินจะทำให้เกิดการนำสารผ่านเข้าช่องและส่งผลให้ลิโปโซมบวมขึ้น ซึ่งสามารถวัดอัตราการบวมได้จากค่าการกระจายแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm (OD_{400}) ที่ลดลงแปรผันตามอัตราการแพร่ของสารผ่านช่องพอริน การทดลองใช้น้ำตาล *L-arabinose* ที่เป็นน้ำตาลขนาดเล็กที่สุดที่ใช้ในการทดสอบมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 150 kDa พบว่าโปรตีนไตรเมอร์สามารถสร้างช่องพอรินได้โดยให้ค่าอัตราการบวมของลิโปโซมของน้ำตาล *L-arabinose* สูงที่สุดดังแสดงในรูปที่ 3.10A ส่วนอัตราการบวมอื่นเกิดจากน้ำตาลชนิดอื่น ๆ จะลดลงตามน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลจากน้อยไปมากดังนี้ $D\text{-glucose} \cong D\text{-mannose} \cong D\text{-galactose}$ (180 kDa) > *N-acetylglucosamine* (221 kDa) > *D-sucrose* (342 kDa) > *D-melezitose* (522 kDa) > *stachyose* (667 kDa) จากการทดลองพบว่าอัตราการบวมของลิโปโซมจะเพิ่มขึ้นแปรผันตามปริมาณของโปรตีนไตรเมอร์ที่ใช้ แสดงว่าการสร้างช่องพอรินไม่เกิดในลักษณะที่เป็น single channel แต่อัตราการบวมเป็นผลรวมของการแพร่ผ่านช่องที่มีลักษณะเป็น multichannel

นอกจากนี้อัตราการเต่งอันเกิดจากการแพร่ของน้ำตาล *D*-glucose, *D*-mannose และ *D*-galactose มีค่าเกือบเท่ากันเนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลทั้งสามเท่ากัน ส่วนอัตราการเต่งของลิโปโซมเมื่อใช้น้ำตาล stachyose น้อยที่สุดมีค่าเกือบเป็นศูนย์เนื่องจากน้ำตาลนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด และอาจปิดกั้นช่องพอรินเอาไว้เกือบทั้งหมด จึงทำนายว่าช่องพอรินน่าจะเป็นช่องเลือกผ่านที่ให้สารที่มีขนาดเล็กกว่า 650 kDa แพร่ผ่านได้เท่านั้น กราฟแสดงอัตราการแพร่และแสดงในรูปที่ 3.10B



รูป 3.10 แสดงการแพร่ผ่านของน้ำตาลผ่านช่องพอริน โดยวิธี liposome swelling assay (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004a)

3.9. การศึกษาการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะผ่านช่องพอริน Omp38

เชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei* เป็นเชื้อก่อโรค Melioidosis ที่มีอัตราการติดเชื้อยาปฏิชีวนะสูงมาก การทดลองต่อมาคือการทดสอบการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะต่างๆ ผ่านช่องพอรินโดยวิธี liposome swelling assay โดยทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 7 ตัวด้วยกัน และเทียบอัตราการแพร่ผ่านกับน้ำตาล *L*-arabinose ผลการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 3.2 โดยรูปแบบของอัตราการแพร่จะเป็นในลักษณะเดียวกับอัตราการแพร่ของน้ำตาลกล่าวคือ

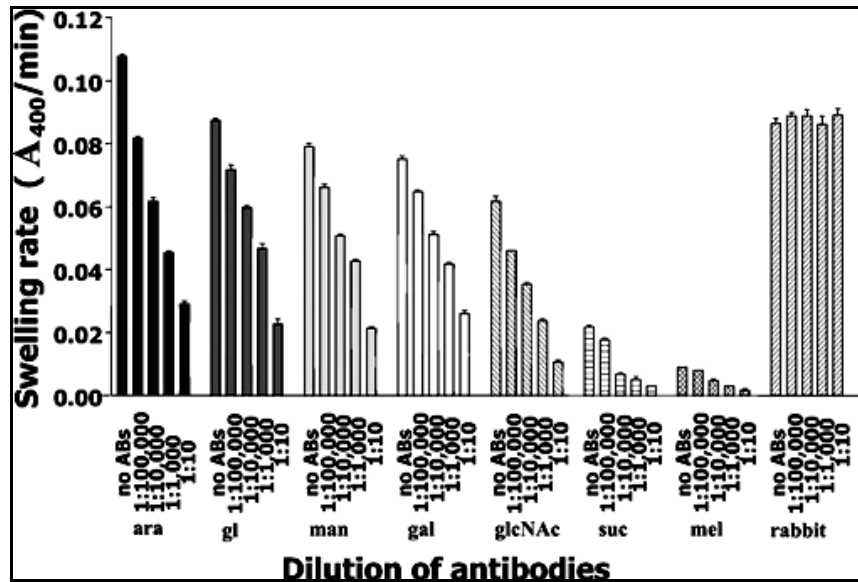
อัตราแพร่ผ่านจะลดลงตามขนาดของยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นดังนี้ meropenem (383 kDa) > ciprofloxacin (421 kDa) > clindamycin (505 kDa) > cefepime (572 kDa) > ceftazidime (637 kDa) ส่วนอัตราการแพร่ผ่านของ gentamicin และ amikacin มีค่าเท่ากับศูนย์เนื่องจากสารทั้งสองตัวมีขนาดใหญ่โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 709 kDa และ 782 kDa ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลนี้มีขนาดใหญ่กว่าขนาดของช่องพอรินที่ได้ทำนายไว้มาก ซึ่งผลการทดลองที่ได้รับอาจช่วยอธิบายความสามารถในการติดต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยห้าชนิด คือ ยา clindamycin ยา cefepime ceftazidime ยา gentamicin และยา amikacin ของแบคทีเรีย *B. pseudomallei* เนื่องอัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเกิดขึ้นน้อยมาก (< 10%) หรือแพร่ผ่านไม่ได้เลย

ตารางที่ 3.2 อัตราการแพร่ผ่านสัมพัทธ์ของยาปฏิชีวนะผ่านช่อง Bps/Bth Omp38 (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004b) กำหนดให้อัตราการแพร่ของ L-arabinose มีค่าเท่ากับ 100%

Antibiotic	M_r	Permeability rate (%)	
		Native <i>Bps</i> Omp38	Refolded <i>Bps</i> Omp38
Amikacin	782	0	0
Gentamicin	709	0	0
Ceftazidime	637	< 1	< 1
Cefepime	572	4 ± 1.6	5 ± 0.5
Clindamycin	505	8 ± 0.9	8 ± 0.5
Ciprofloxacin	421	15 ± 0.9	15 ± 0.9
Meropenem	383	20 ± 0.5	20 ± 0.5

3.10. ผลของ anti-*Bps*Omp38 antibodies ต่อการทำงานของช่องพอริน Omp38

ทดลองส่วนสุดท้ายคือการศึกษาค่าผลของแอนติบอดีต่ออัตราการแพร่ผ่านของสารผ่านช่องพอริน Bps/Bth Omp 38 โดยเทคนิค liposome swelling assay หลังจากได้ทำการบ่มโปรตีนไตรเมอร์กับ anti-Omp38 polyclonal antibodies ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วจึงนำโปรตีนมา reconstitute เข้าไปในโพรติโอลิโปโซมตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ในส่วนของการทดลอง และวัดหาอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.11 ผลของ anti-Omp38 polyconal antibodies ต่ออัตราการแพร่ของสารผ่านช่องพอริน Bps/Bth Omp38 (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004b)

ผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามที่คาดไว้คืออัตราการแพร่ของน้ำตาลที่ใช้ทดสอบทุกชนิดได้แก่ L-arabinose, D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-GlcNAc, D-sucrose และ D-melizitose ลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับช่องพอรินส่งผลทำให้คุณสมบัติการสร้างช่องพอรินเปลี่ยนไป



บทที่ 4

บทสรุป

4.1. สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดโปรตีนจาก crude peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่เยื่อเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* และ *B. thailandensis* เนื่องจากโปรตีนมีขนาด 38 kDa ใน SDS-PAGE gel จึงกำหนดชื่อของโปรตีนทั้งสองว่า BpsOmp38 และ BthOmp38 ตามลำดับ งานวิจัยต่อมาได้ทำการผลิต anti-Omp38 polyclonal antibodies การทำ immunoblotting พบว่าแอนติบอดีสามารถ cross react กับโปรตีน Bps/Bth Omp38 ได้ดี แต่โปรตีนไม่ cross react กับ preimmune serum แสดงว่าแอนติบอดีที่สร้างมีความจำเพาะต่อโปรตีนทั้งสอง การทดสอบทางกายภาพพบว่าโปรตีน Omp38 มีคุณสมบัติทนต่อ SDS แต่ไวต่อความร้อนที่ 95 °C ขึ้นไป การหาค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยโครมาโตกราฟีแบบ gel filtration chromatography พบว่ารูปที่ทำงานของโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 110 kDa ซึ่งเป็นรูปไตรเมอร์ที่ประกอบด้วยสามหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ขนาด 38 kDa การทำ peptide mass fingerprinting ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS และ ESI/MS พบว่าโปรตีน Omp38 ทั้งสองมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับพอร์ริน OpcP1 ของเชื้อ *B. cepacia* มากที่สุด ได้นำข้อมูลที่ได้จากโครงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของ *B. pseudomallei* มาทำการตรวจหายีนที่ถอดรหัสให้ BpsOmp38 และ BthOmp38 และทำการเพิ่มจำนวนของยีนด้วยเทคนิค PCR การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองพบว่ามีเหมือนกัน 98% และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 99.7% การทำนาย transmembrane domain โดยวิธีของ Didecrichs และโครงสร้างสามมิติพบว่าโปรตีนมีโครงสร้างเป็นแบบ β -barrel ประกอบด้วยสายบีต้า 16 สาย มี external loop ทั้งหมด 8 เส้น และมี periplasmic turn ทั้งหมด 8 turn ส่วนของ Loop3 มีความยาวมากที่สุดและตำแหน่งของ loop นี้ในช่องพอร์รินน่าจะทำหน้าที่กำหนดขนาดของสารที่ผ่านเข้าช่องพอร์ริน งานวิจัยขั้นต่อไปคือการโคลนยีน BpsOmp38 และยีน BthOmp38 เข้าไปในพลาสมิด pGEM-T และทำการ subclone ขึ้นของยีนที่ไม่มี signal peptide เข้าสู่พลาสมิด pET23d (+) และทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ Omp38 ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ Origami (DE3) ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Bps/Bth Omp38 พบว่า *E. coli* ผลิตโปรตีนขนาด 38 kDa ในปริมาณมากเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.4 mM IPTG แต่โปรตีนที่ผลิตออกมาอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำมีลักษณะเป็น inclusion bodies จึงได้ทำบริสุทธิ์ inclusion bodies แล้วละลายโปรตีนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 8M urea พบว่าโปรตีนละลายได้สมบูรณ์ จึงทำการ refold ด้วย detergent ต่าง ๆ การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ตรวจพบโปรตีนโมโนเมอร์ขนาด 38 kDa ที่ถูก refold ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 10% (w/v) Zwittergent® 3-14 มีการเคลื่อนตำแหน่งไปอยู่ที่ 110 kDa ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตีนไตรเมอร์ และเมื่อต้มโปรตีนเป็นเวลา 5 นาทีที่ 95 °C พบว่าโปรตีนมีการ fold เป็นรูปไตรเมอร์อย่างสมบูรณ์ การวิเคราะห์ด้วย CD spectroscopy พบว่าโปรตีน ไตรเมอร์ 110 kDa มีองค์ประกอบของ β -sheet เป็นหลักซึ่งเป็นโครงสร้างที่เหมือนกับโปรตีน Omp38 ที่สกัดจาก *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ส่วนโปรตีนโมโนเมอร์ที่เสียสภาพจะให้ CD spectrum เป็นแบบ random coil การวิเคราะห์ทางอิมมูโนโลยีโดย anti-BpsOmp38 polyclonal antibodies และการทำ peptide mass analysis ด้วย MALDI-TOF MS ยืนยันว่าโปรตีนที่ถูกผลิตโดย *E. coli* เป็น BpsOmp38 และ BthOmp38 การศึกษาหน้าที่ของช่องพอร์รินโดยเทคนิค liposome swelling

assay พบว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวขนาดเล็กมีอัตราการแพร่ผ่านแปรผันโดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของสาร ดังนี้คือ $D\text{-glucose} \cong D\text{-mannose} \cong D\text{-galactose}$ (180 kDa) > $N\text{-acetylglucosamine}$ (221 kDa) > $D\text{-sucrose}$ (342 kDa) > $D\text{-melezitose}$ (522 kDa) > $stachyose$ (667 kDa) ผลการทดลองเรื่องการแพร่ผ่านทำให้ทำนายคุณสมบัติของช่องพอริน Omp38 ว่าเป็นช่องเลือกผ่านที่ยอมให้สารขนาดไม่เกิน 650 kDa ผ่านเข้าออกด้วยกระบวนการแพร่ ในทำนองเดียวกันอัตราการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะผ่านช่องพอรินก็แปรผันตามน้ำหนักโมเลกุลของยาปฏิชีวนะนั้น โดยอัตราการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะที่น้อยกว่า 10% คือ ยา clindamycin ยา cefepime ยา ceftazidime ยา gentamicin และยา amikacin เนื่องจากทั้งหมดนี้มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่เกิน 600 kDa และอาจอธิบายกลไกการคือยาของแบคทีเรีย *B. pseudomallei* ต่อยาที่ใช้ทดสอบดังกล่าว การทดลองสุดท้ายคือการศึกษาค้นคว้าผลของแอนติบอดี พบว่า anti-*BpsOmp38* antibodies มีผลต่อการยับยั้งการผ่านของน้ำตาลโมเลกุลเล็กทุกชนิดเข้าช่อง Omp38 ผลการทดลองทั้งหมดให้ข้อสรุปว่าโปรตีน *BpsOmp38* และ *BthOmp38* มีคุณสมบัติเป็นพอรินที่อาจมีส่วนกำหนดกลไกการคือยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis*

4.2. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

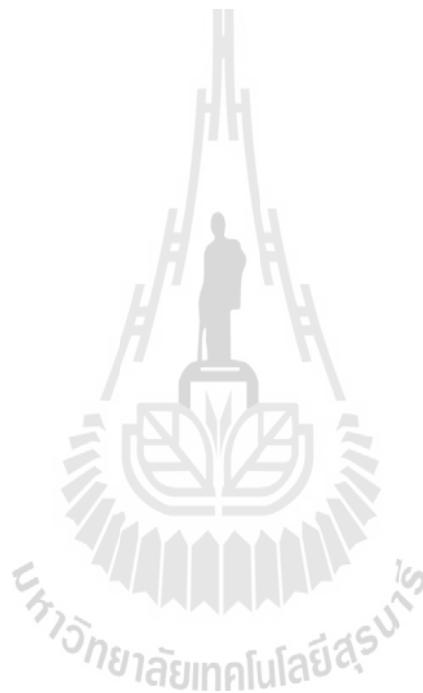


บรรณานุกรม

- Alberti S, Rodriquez-Quinones F, Schirmer T, Rummel G, Tomas JM, Rosenbusch JP, Benedi VJ. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect Immun.* 1995, 63:903-910.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Struhk K Short Protocols in Molecular Biology. 4th edition, pp.2-12, 1999, Wiley & Sons, New York
- Bavoil P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1984, 44:479-485.
- Behlau M, Mills DJ, Quader H, Kuhlbrandt W, Vonck J. Projection structure of the monomeric porin OmpG at 6 Å resolution. *J Mol Biol.* 2001, 305:71-77.
- Breden J, Saint N, Mallea MDE, Molle G, Pages JM, Simonet V. Alteration of pore properties of *Escherichia coli* OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region. *Biochem. J.* 2002, 363:521-528.
- Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Paupit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature.* 1992, 358:727-733.
- Cowan SW, Garavito RM, Jansonius JN, Jenkins JA, Karlsson R, Konig N, Pai EF, Paupit RA, Rizkallah PJ, Rosenbusch JP, et al. The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form. *Structure.* 1995, 3:1041-1050.
- Darveau RP, MacIntyre S, Buckley JT, Hancock RE. Purification and reconstitution in lipid bilayer membranes of an outer membrane, pore-forming protein of *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol.* 1983, 156:1006-1011
- Delost , MD (1997). Introduction to diagnostic microbiology: a text and workbook. Walsworth, United State of America.
- Diederichs K, Freigang J, Umhau S, Zeth K, Breed J. Prediction by aneural network of outer membrane beta-strand protein topology. *Protein Sci.* 1998. 7, 2413-2420
- Douglas JT, Lee MD, Nikaido H. Protein I of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane is a porin. *FEMS Microbial Lett.* 1981, 12:305-302.
- Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstrete DR, Winter AJ. Porins of *Brucella* species. *Infect Immun.* 1984, 44:16-21.
- Ellis JF, Titball RW. *Burkholderia pseudomallei*: medical, veterinary and environmental aspects. *Infect Dis Rev.* 1999, 1:174-181.
- Eisele JL, Rosenbusch J P. In vitro folding and oligomerization of a membrane protein: transition of bacterial

- porin from random coil to native conformation. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 10217–10220.
- Flammann HT, Weckesser J. Porin isolated from the cell envelope of *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Bacteriol.* 1984, 159:410-412.
- Gotoh N, Wakebe H, Yoshihara E, Nakae T, Nishino T. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J Bacteriol.* 1989, 171:983-990.
- Gotoh N, White NJ, Chaowagul W, Woods D. Isolation and characterization of the outer-membrane proteins of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. *Microbiology* 1994, 140:797-805.
- Hancock RE, Decad GM, Nikaido H. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Biochim Biophys Acta.* 1979, 554:323-331.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227:680–685.
- Nakae T. Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976, 71:877-884.
- Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 1985, 49:1-32. Review.
- Nikaido H, 1994 Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994, 264:382-388. Review.
- Pullen JK, Liang SM, Blake MS, Mates S, Tai JY. Production of *Haemophilus influenzae* type-b porin in *Escherichia coli* and its folding into the trimeric form. *Gene* 1995. 152:85-88.
- Rocque WJ, McGroarty EJ. Structure and function of an OmpC deletion mutant porin from *Escherichia coli* K-12. *Biochemistry.* 1990, 29:5344-5351.
- Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH, Suginta W. Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Biochem J.* 2004a, 377:579-587.
- Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Suginta W. Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem J.* 2004b, 384:609-617.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996, 68:850–858.
- Tsujimoto H, Gotoh N, Yamagishi J, Oyamada Y, Nishino T. Tsujimoto et al. Cloning and expression of the major porin protein gene *opcP* of *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas*) *cepacia* in *Escherichia coli*. *Gene.* 1997, 186:113-118.

- Yoshimura F, Zalman LS, Nikaido H. Purification and properties *Pseudomonas aeruginosa* porin. J. Biol. Chem. 1983, 258: 2308–2314.
- Woods DE, DeShazer D, Moore RA, Brett PJ, Burtnick MN, Reckseidler SL, Senkiw MD. Current studies on the pathogenesis of melioidosis. Microbes Infect. 1999, 1:157-162. Review.
- Wyllie S, Longbottom D, Herring AJ, Ashley RH. Single channel analysis of recombinant major outer membrane protein porins from *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. FEBS Lett. 1999, 445:192-196.
- Zeth K, Diederichs K, Welte W, Engelhardt H. Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. Structure 2000, 8: 981-992.



ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1.1. LB Medium (Luria-Bacterial Medium)

Per litre:

To 950 ml of deionised H₂O add:

bacto-tryptone 10 g

bacto-yeast extract 5 g

NaCl 10 g

Shake until the solutes have dissolved. Adjust the pH to 7.0 with 5 N NaOH (0.2 ml). Adjust the volume of the solution to 1 litre with deionised H₂O. Sterilise by autoclaving for 20 min at 15lb/sq. in. on liquid cycle.

1.2. SDS-PAGE

- Solutions for preparing 12% resolving SDS-polyacrylamide gel

Solution component	Component volume (ml)		
	5 ml	10 ml	20 ml
H ₂ O	1.6	3.3	6.6
30% (w/v) acrylamide mix	2.0	4.0	8.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25	2.5	5.0
10% SDS	0.05	0.1	0.2
10% ammonium persulfate (freshly prepared)	0.05	0.1	0.2
TEMED	2 µl	4 µl	6 µl

- Solutions for preparing 5% stacking SDS-polyacrylamide gel

Solution component	Component volume (ml)	
	2 ml	5 ml
H ₂ O	1.4	3.4
30% (w/v) acrylamide mix	0.33	0.83
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.25	0.63

10% SDS	0.02	0.05
10% ammonium persulfate (freshly prepared)	0.02	0.05
TEMED	2 μ l	5 μ l

- **Buffers for SDS-PAGE**

SDS-gel loading buffer (3 x stock)

150 mM Tris.Cl (pH6.8)

300 mM dithiothreitol

6% SDS (electrophoresis grade)

0.3 % bromophenol blue

30% glycerol

- **Tris-Glycine electrophoresis buffer (5 x stock)**

250 mM Tris.Cl (pH 8.3)

1.25 M glycine (electrophoresis grade) (pH 8.3)

0.5 % SDS

- **Staining solution with Coomassie Brilliant Blue for Protein**

Dissolve 0.25 g of Coomassie Brilliant Blue R250 in 90 ml of methanol:H₂O (1:1v/v) and 10 ml of glacial acetic acid. Filter the solution through a Whatman No. 1 filter to remove any particulate matter.

- **Destaining Solution for Coomassie Stain**

30% methanol

10% acetic acid

dH₂O is added to bring volume to 100 ml.

1.3. Preparation of competent cells

1. Streak *E. coli* host cells on an LB plate+100 $\mu\text{g/ml}$ Amp)
2. Allow cells to grow at 37°C overnight
3. Place one colony in 10 mL LB media (+antibiotic selection if necessary), grow overnight at 37°C
4. Transfer 5 mL overnight DH5a culture into 500 mL LB media in 2-L flask
5. Allow cell to grow at 37°C (250 rpm), until $\text{OD}_{600} = 0.6$ (~2-3 hours)
6. Transfer cells to 2 centrifuge bottles (250 mL), and place cells on ice for 20 mins
7. Centrifuge cells in Sorval GSA rotor at 4°C for 10 mins at 3,000 g (2500 rpm). **Cells must remain cold for the rest of the procedure**
8. Pour off media and resuspend cells in 30 mL of **cold** 0.1 M CaCl_2 . Transfer the suspended cells into 50 mL polypropylene falcon tubes, and incubate on ice for 30 mins
9. Centrifuge cells using rotor at 4 °C for 10 mins at 3,000 g
10. Pour supernatant and re-suspend cells (by pipetting) in 8 mL cold 0.1M CaCl_2 containing 15% glycerol. Transfer 100 μL into (1.5 mL) Eppendorff tubes placed on ice. Freeze the cells in liquid nitrogen. Cells stored at -80°C can be used for transformation for up to ~6 months.

1.4. Buffers for Western blot analysis

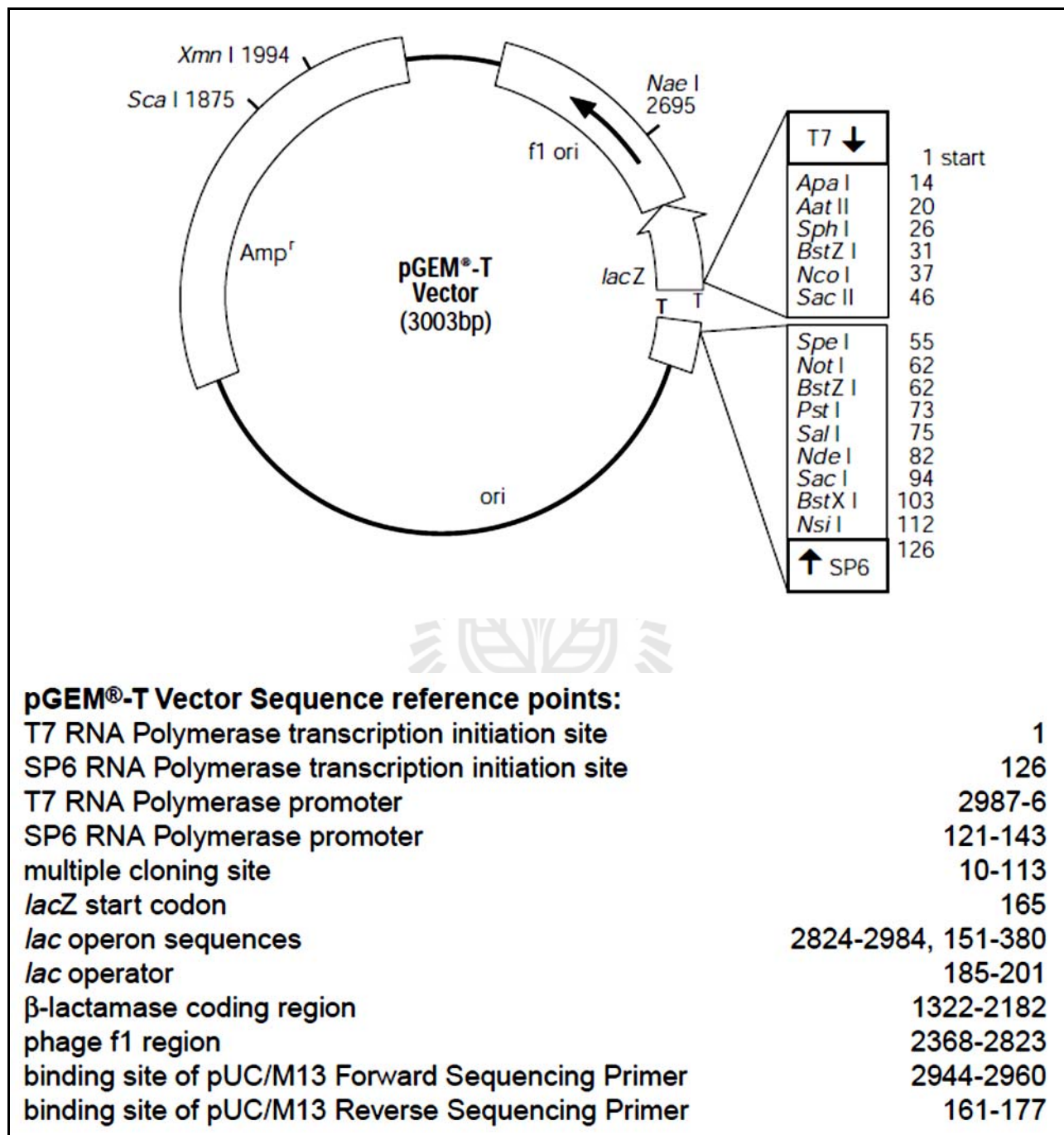
Phosphate-buffered saline plus Tween 20 (PBS-T)

Dissolve 8 g of NaCl, 0.2 g of KCl, 1.44 g of Na_2HPO_4 , and 0.2 g of KH_2PO_4 in 800 ml of distilled H_2O .

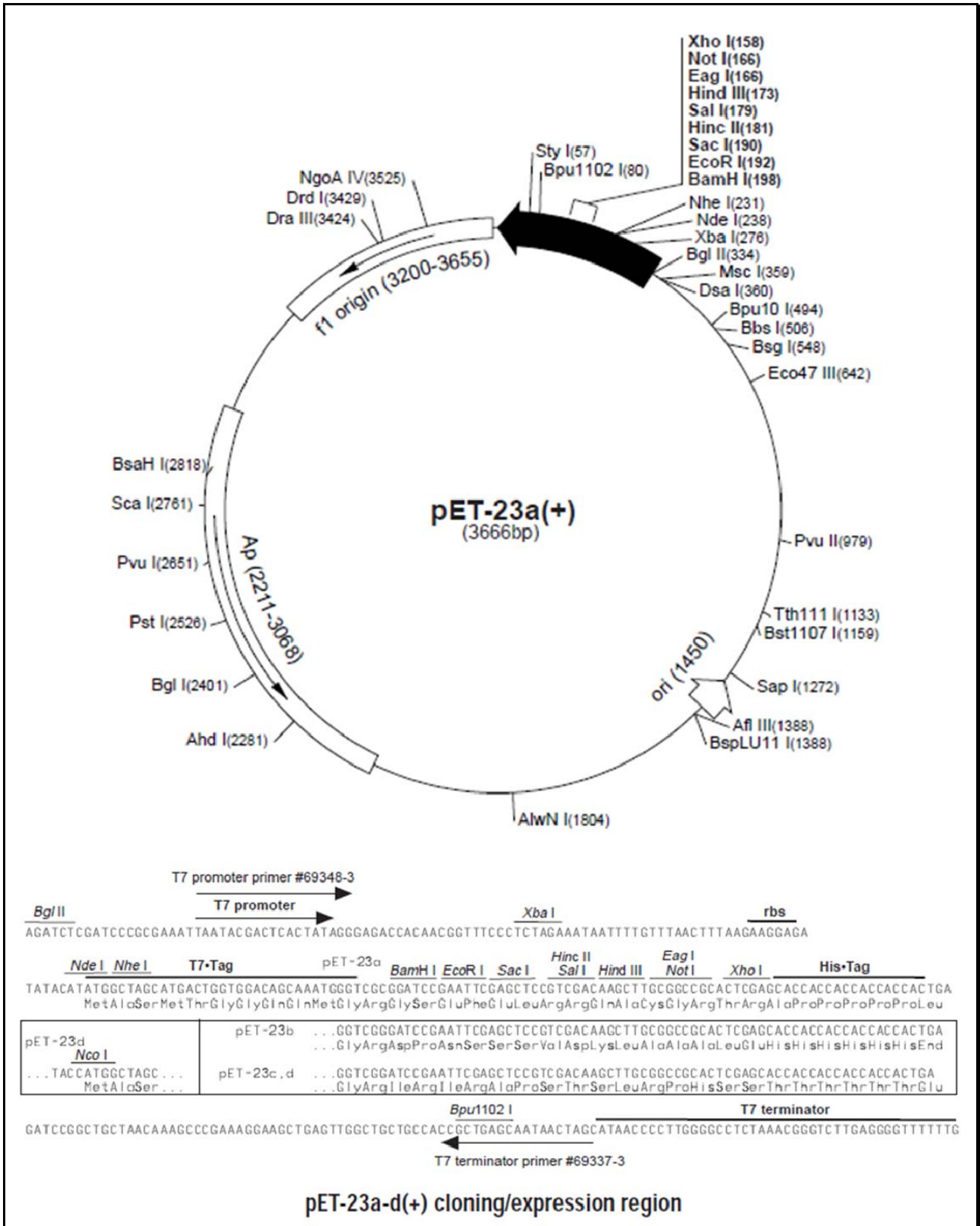
Adjust the pH to 7.4 with HCl. Add H_2O to 1 litre. 1% (v/v) of Tween 20 is added and stirred to prior to use.

ภาคผนวก ข

- แผนที่พลาสมิด pGEM[®]-T cloning vector



- แผนที่พลาสมิด pET23a-d(+) expression vector



ภาคผนวก ข

การนำเสนอผลงาน

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 2 ผลงาน

- Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C & **Suginta W** (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem. J.* 384, 609–617. (JIF2008 = 4.317)
- Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH & **Suginta W** (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. *Biochem. J.* 377, 579-587. (JIF2008 = 4.317)

2. ผลงานนำเสนอในรูปแบบบรรยายหรือโปสเตอร์ในที่ประชุมระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 4 ผลงาน

- **Suginta W**. On the structure and function of bacterial porins and chitinases. A Departmental Special Seminar, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Agriculture, The University of the West Indies, Trinidad and Tobago, May 15th, 2006. *Invited oral presentation.*
- Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Ashley RH & **Suginta W** Porin from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. In 30th FEBS Congress & 9th IUBMB Meeting, Budapest, Hungary, July 2nd-7th, 2005. *FEBS J. Vol. 272, Supp. 1, P389. Poster presentation.*
- Siritapetawee J & **Suginta W** Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and their function as a non-specific channel. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P5. *Poster presentation.*
- Siritapetawee J, Ashley RH, Prinz H, Samosornsuk W & **Suginta W** Identification of *Burkholderia* porins using MALDI-TOF and nanoelctrospray MS. 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Invited oral Presentation.*

ประวัตินักวิจัย

Name	Wipa Suginta
Affiliation	School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand Tel: +66 44 22 4313; E-mail wipa@sut.ac.th
Degree	Ph.D. (Biochemistry), University of Edinburgh, UK M.Sc. (Biochemistry), Mahidol University, Bangkok, Thailand B.Sc. (Biochemistry), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
Marital status	married with one child
Current Position	Associate Professor in Biochemistry
Fellowships/Awards (2000 - present)	
2009-2011	Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers from Alexander von Humboldt Foundation, Germany
2006	Suranaree University of Technology Award for “Outstanding Academic Performance in Science”
2005	For Women in Science Fellowship from L’OREAL (Thailand)/UNESCO.
2004	Biochemical Society General Travel Grant for a study visit to the Max-Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany.
2003	DAAD Fellowship for a Study Visit to the Max-Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany.
1999-2000	Wellcome Trust fellowship for Postdoctoral research study in Membrane Biology Group, The University of Edinburgh, United Kingdom.

Research Interest

1. Structure and function of bacterial porins
2. Structure and function of chitinases and chitobiases from marine bacteria to humans

Publications

Research Articles

1. Pantoom S, Vetter I, Prinz H & **Suginta W*** (2009) Structural analysis of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with novel chitinase inhibitors: Implications for drug development against allergic asthma. In preparation for *Nature-Struct. Mol. Biol.*
2. **Suginta W***, Chuenark D, Masuhara M & Fukamizo T (2009) Cloning, expression, and functional characterization of non-homologous *N*-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi*. In preparation for *FEBS J.*
3. Sritho N & **Suginta W*** (2009) The effects of the active site residues Asp313 and Tyr435 on the binding and catalytic activities of *Vibrio harveyi* chitinase A. Submitted to *J. Biochem. (Tokyo)*.
4. Schulte A, Ruamchan S, Khunkaewla P & **Suginta W*** (2009) The outer membrane protein VhOmp from *Vibrio harveyi*: The pore-forming properties in black lipid membranes. *J. Membr. Biol.* (Accepted) (JIF2008 = 2.844).
5. **Suginta W***, Pantoom S & Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. *J. Chem. Biol.* (online available May 28th, 2009).
6. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC & **Suginta W*** (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. *J. Struct. Biol.* 162, 491-499. (JIF2008 = 4.059)
7. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W*** (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC-Biochemistry*, 9:2. (unofficial JIF2007 = 2.34)
8. **Suginta W***, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R & Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BBA - General Subjects* 1770, 1151-1160. (JIF2008 = 2.713)
9. **Suginta W*** (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme Microb. Tech.* 41, 212-220. (JIF2008 =2.375)
10. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H & **Suginta W*** (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. *Acta Cryst. Section F.* 61, 895-898. (JIF2007 = 0.645)
11. **Suginta W***, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J & Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS J.* 272, 3376-3386. (JIF2008 = 3.139)

12. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C & **Suginta W*** (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem. J.* 384, 609–617. (JIF2008 = 4.317)
13. **Suginta W***, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J & Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 171-180. (JIF2008 = 2.626)
14. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH & **Suginta W*** (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. *Biochem. J.* 377, 579-587. (JIF2008 = 4.317)
15. **Suginta W**, Karoulias N, Aitkin A & Ashley RH (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. *Biochem. J.* 359, 55-64. . (JIF2007 = 4.317)
16. **Suginta W**, Robertson PAW, Austin B, Fry SC & Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84. (JIF2008 = 2.028)
17. Svasti J, Srisomsap C, Surarit R, Benjavongkulchai E, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Champattanachai V, Nilwarangkoon S & Rungvirayudx S (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In *Protein Structure-Function Relationship* (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press. pp.249-257.
18. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In *Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications* (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.
19. **Suginta W** & Svasti MRJ (1995) Purification and Properties of β -Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. *ScienceAsia* 21, 183-186.
20. **Suginta W** & Svasti J (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In *Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications* (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.
21. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. *ScienceAsia* 21, 293-303.

Note: เครื่องหมาย * แสดงผู้แต่งเป็น Corresponding author

Presentations at Scientific Meetings (2000-present)

1. Sritho N & **Suginta W**. Mutational analysis of the active-site residues Aspartate313 and Tyr435 of Chitinase A from a marine bacterium *Vibrio harveyi*. 2nd SUT Graduate Conference 2009, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, January 21st-22nd, 2009. AG-P-13, *Poster presentation*.
2. Ruamchan S, Schulte A & **Suginta W**. Ion channel activity of *Burkholderia pseudomallei* and *thailandensis* porins in black lipid membranes. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P53, *Poster presentation*.
3. Chuenark D, Prinz & **Suginta W**. Cloning, expression, and characterization of two zincin-like fold containing chitobiasis from *Vibrio harveyi*. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P73, *Poster presentation*.
4. Sritho N, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. Mutational analysis of the reducing-end binding residues of chitinase A from *Vibrio harveyi*. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P50, *Poster presentation*.
5. Pantoom S, Prinz H & **Suginta W**. Identification of novel inhibitors of chitinase A from *Vibrio harveyi* using a high-throughput screening approach. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P48, *Poster presentation*.
6. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. Crystallization of wild-type chitinase A and mutants (W275G and W397F) from *Vibrio harveyi* in complex with potential inhibitors. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P46, *Poster presentation*.
7. **Suginta W** & Prinz H. Substrate binding preference and anomer selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A as revealed by HPLC-MS. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P14, *Invited oral presentation*.
8. **Suginta W**. Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P47. *Poster presentation*.

9. Songsiriritthigul C, Kobdaj A & **Suginta W**. The active site residues Trp275 and Trp397 are important for the binding selectivity of chitinase A to soluble substrates. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P53. *Poster presentation*.
10. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The influence of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P27. *Poster presentation*.
11. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The effect of the *N*-terminal residues on the enzymatic properties of *Vibrio carchariae* chitinase A. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Challenges in Protein Research in Thailand”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P61. *Poster presentation*.
12. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W**. Structural analysis of *Vibrio carchariae* chitinase A reveals conformational changes during substrate hydrolysis. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Challenges in Protein Research in Thailand”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P19. *Oral presentation*.
13. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W**. Structure of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2nd Protein Crystallization Workshop. Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima, 20 – 23 July 2006. *Invited oral presentation by SC*.
14. **Suginta W**. On the structure and function of bacterial porins and chitinases. A Departmental Special Seminar, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Agriculture, The University of the West Indies, Trinidad and Tobago, May 15th, 2006. *Invited oral presentation*.
15. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** A study of substrate specificity of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P327. *Oral presentation*.
16. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A & **Suginta W** Expression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P335. *Poster presentation*.
17. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** Active-site mutation alters substrate specificity of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2nd Protein Symposium Network, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, September 23th-24th, 2005. *Invited oral presentation*.

18. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Ashley RH & **Suginta W** Porin from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. In 30th FEBS Congress & 9th IUBMB Meeting, Budapest, Hungary, July 2nd-7th, 2005. *FEBS J. Vol. 272, Supp. 1*, P389. *Poster presentation*.
19. Songsiriritthigul C, Robinson RC, Yuvaniyama J & **Suginta W** Expression, purification, and preliminary structural analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P164. *Poster presentation*.
20. Siritapetawee J & **Suginta W** Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and their function as a non-specific channel. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P5. *Poster presentation*.
21. **Suginta W**, Svasti J & Prinz H Enzymatic properties of a family 18 chitinase a from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC/ESI mass spectrometry, Joint Senior Research Scholar Meeting: Protein Structure and Thalassemia Research Fund, Royal River Hotel, Bangkok, August 22th-23th, 2003, *Invited oral presentation*.
22. Siritapetawee J, Ashley RH, Prinz H, Samosornsuk W & **Suginta W** Identification of *Burkholderia* porins using MALDI-TOF and nanoelctrospray MS. 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Invited oral Presentation*.
23. **Suginta W** C-terminal protein processing study of *Vibrio carchariae* chitinase, using MALDI-TOF and nanoelectrospray MS, 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Oral presentation*.
24. Sun Q, McDonald A, **Suginta W** & Ashley RH (2001) Localisation of a CLIC (Chloride Intracellular Channel) protein fused to green fluorescent protein. *Biochem. Soc. Trans.* A112. *Poster Presentation*.
25. **Suginta W** & Ashley RH (2000) The chloride intracellular channel protein p64H1 (CLIC4) associates *in vitro* with brain dynamin, actin and 14-3-3 proteins. *Molecular Biophysics of Cell Membranes (FASEB conference)*, P57. *Poster presentation*.
26. **Suginta W**, Estibeiro P, Rigden DJ & Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*, Gene isolation, Nucleotide sequence, and homology modelling of 3D-structure. *Biophy. J.* P417A. *Poster presentation*.