จารุวรรณ ศิริเทพทวี : การเปรียบเทียบสมบัติเชิงหน้าที่และเชิงโครงสร้างของโปรตีนพอรินในผนังเซลล์ผิวนอกระหว่างเชื้อ ***Burkholderia Pseudomallei*** และ ***Burkholderia thailandenensis***

(COMPARISON OF FUNTIONAL AND STRUCTURAL PROPERTIES OF AN OUTER MEMBRANE PORIN BETWEEN *Burkholderia pseudomallei* AND *Burkholderia thailandensis*)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. วิภา สุจินต์, 199 หน้า. ISBN 974-533-325-5

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกโปรตีนพอรินสองชนิดคือ *Bps*Omp38 และ *Bth*Omp38 ซึ่งเป็นโปรตีนผิวนอกของเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ตามลำดับ พบว่าโปรตีนในสภาพธรรมชาติมีลักษณะเป็น 3 หน่วย (M_r 110,000) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน (M_r 38,000) จากข้อมูลที่ได้จากการทำ peptide mass fingerprint ทำให้สามารถแยกยีน Omp38 จากโครโมโซมของเชื้อทั้งสองได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BpsOmp38* และ *BthOmp38* พบว่าเหมือนกัน 98% และมีลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนเหมือนกัน 99.7% การวิจัยครั้งนี้ยังได้ทำการผลิตโปรตีน Omp38 ในแบคทีเรีย *E. coli* ในรูป inclusion bodies และทำให้กลับมามีสภาพธรรมชาติโดยใช้ระบบบัพเฟอร์ที่มี 10% (w/v) Zwittergent® 3-14 จากการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิโดยเทคนิค FTIR และ CD spectroscopy พบว่าโปรตีน Omp38 มีองค์ประกอบหลักเป็น β-sheet จากการศึกษาหน้าที่ของพอรินด้วยวิธี liposome-swelling assays พบว่าโปรตีน Omp38 มีคุณสมบัติเป็น non-specific channel ที่มีความสามารถให้สารละลายน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุล <650 Da ผ่านเข้าออกได้ จากการทำนายโครงสร้างของพอรินพบว่ามีโครงสร้างเป็น β-barrel ประกอบด้วย 16-stranded β-barrel 8 periplasmic turns และ 8 external loops การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเตรียมผลึกโปรตีนด้วยเทคนิค sitting drop แต่ผลการทดลองภายใต้สภาวะที่ทดสอบสังเกตเห็นเฉพาะผลึกโปรตีนขนาดเล็ก ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบการเตรียมโปรตีนใน detergent ชนิดอื่นๆ และสภาวะการเกิดผลึกโปรตีนที่เหมาะสมต่อไป เพื่อให้ได้ผลึกที่มีคุณภาพสำหรับศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน Omp38 ต่อไปในอนาคต

สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

JARUWAN SIRITAPETAWEE : COMPARISON OF FUNTIONAL AND STRUCTURAL PROPERTIES OF AN OUTER MEMBRANE PORIN BETWEEN *Burkholderia pseudomallei* AND *Burkholderia thailandensis*

THESIS ADVISOR : Wipa Suginta, Ph.D. 199 PP. ISBN 974-533-325-5

In this study, two outer membrane proteins, *Bps*Omp38 and *Bth*Omp38 were isolated and purified from *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*, respectively. The native conformation of Omp38 was found to be a trimer (M_r 110,000) consisting of three identical monomeric subunits (M_r 38,000). Based on peptide mass fingerprinting information, the gene encoding Omp38 was identified and isolated from genomic DNA of both bacteria. Nucleotide sequences of *BpsOmp38* and *BthOmp38* were 98% identical, and their predicted amino acid sequences were 99.7% identical. Omp38 proteins were over-expressed in *E. coli*, recovered from inclusion bodies, and refolded into functional trimeric Omp38 using a buffer system containing 10% (w/v) Zwittergent® 3-14. FTIR and CD spectroscopy revealed that the secondary structure of Omp38 contained predominantly β-sheet content. Liposome-swelling assays showed that Omp38 was a non-specific channel, which allowed sugars of <650 Da to permeate. Structural topology prediction suggested that Omp38 contained a 16-stranded β-barrel with 8 periplasmic turns and 8 extracellular loops. The expressed Omp38 was also subjected to protein crystallization trials using the sitting drop method. However, only small crystals of Omp38 were observed under tested conditions. To obtain Omp38 crystals with high quality for 3D-structure determination, different detergents for protein refolding and crystallization conditions will still need to be optimized in the future.

School of Biochemistry
Academic Year 2004

Student's Signature.....
Advisor's Signature.....
Co-adviser's Signature.....