รหัสโครงการ SUT1-102-56-12-30

รายงานการวิจัย

ผลของการกลายพันธุ์ต่อการนำเข้าของน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ผ่านช่องไคโตพอริน

Effects of mutations on molecular uptake of chitooligosaccharides through chitoporin channel

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-102-56-12-30

รายงานการวิจัย

ผลของการกลายพันธุ์ต่อการนำเข้าของน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ผ่านช่องไคโตพอริน

Effects of mutations on molecular uptake of chitooligosaccharides through chitoporin channel

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์
สาขาวิชาชีวเคมี
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว
พฤษภาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์
อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
21 พฤษภาคม พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ช่องพอริน *Vh*ChiP ที่สกัดจากเยื่อเมมเบรนด้านนอกของแบคทีเรียในทะเล *Vibrio harveyi* มีคุณสมบัติเป็นช่องจำเพาะต่อน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ โดยมีความสามารถในการนำน้ำตาลไคโตเฮกซะโอสได้ดีที่สุด ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค BLM และ liposome swelling assay ทำการแสดงผลของการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp136 ที่บริเวณผิวส่วนบนของช่อง *Vh*ChiP มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการนำอิออนและการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ผ่านช่องพอริน การวิเคราะห์ทางจลนพลศาสตร์ของการนำน้ำตาลเข้าช่องพอรินเดี่ยว *Vh*ChiPW136A และ *Vh*ChiPW136F พบว่าพอรินกลายพันธุ์มีความสามารถในการนำอิออนและน้ำตาลไคโตเฮกซะโอสลดลงจากช่อง *Vh*ChiP ดั้งเดิม และพอรินกลายพันธุ์ทั้งสองมีความชอบในการจับกับน้ำตาลน้อยลงอันเนื่องมาจากการมีค่าคงที่การปล่อยของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นมากถึง 20 เท่าของค่าคงที่การปล่อยของพอรินดั้งเดิม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ABSTRACT

*Vh*ChiP is a chitooligosaccharide-specific porin isolated from the outer membrane of the marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Vh*ChiP is responsible for the uptake of chitin oligosaccharides, with particular selectivity for chitohexaose. In this study, we employed BLM and liposome swelling assays to demonstrate that Trp136, located at the mouth of the *Vh*ChiP pore, plays an important role in controlling the ion conductivity, and sugar permeability of the *Vh*ChiP channel. Kinetic analysis of sugar translocation obtained from single channel recordings indicated that the Trp136 mutations W136A, and W136F considerably reduced the binding affinity of the protein channel towards its best substrate, chitohexaose. Data obtained from liposome swelling assays confirmed that *Vh*ChiPW136A and *Vh*ChiPW136F mutants showed decreased the rate of chitohexaose permeation through *the Vh*ChiP channel. Notably, both Trp136 mutants showed significant increases in the off-rate for chitohexaose, of up to 20-fold that of the native channel.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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	12
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	18
ข้อเสนอแนะ	18
เอกสารอ้างอิง	19
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	21
ภาคผนวก ข	22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์ 1
รูปที่ 1.2 โมเดลการใช้แบคทีเรียย่อยสลายไคตินเพื่อการผลิต biogas 2
รูปที่ 1.3 แสดงวิถีการสลายไคตินโดยแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 3
รูปที่ 1.4 โครงสร้างทำนายของช่องไคโตพอรินของ *V. harveyi* ที่มี Trp136 อยู่ที่บริเวณกลางช่อง 4
รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของ BLM set-up ที่ใช้ศึกษาการแพร่ผ่านของสารผ่านช่องพอริน 8
รูปที่ 2.2 องค์ประกอบของ BLM cuvette 9
รูปที่ 3.1 โครงสร้างทำนายของช่องพอริน *VhChiP* ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโน Trp136 12
รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน *Vh*ChiP ที่ผลิตโดย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) Omp8 13
รูปที่ 3.3 คุณสมบัติการนำอิออนช่องไคโตพอรินที่ได้จากการวัดด้วยวิธี BLM technique 14
รูปที่ 3.4. ผลของน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส ต่อการแพร่ของอิออนผ่านช่องพอริน 15
รูปที่ 3.5 กราฟแสดงการไตเตรทพอริน *Vh*ChiP ด้วยน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส 16
รูปที่ 3.6 แสดงอัตราการแพร่ของน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส ผ่าน proteo-liposome ของพอริน *VhChiP* 17

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงลำดับของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สร้างโปรตีน *Vh*ChiP กลายพันธุ์ 6

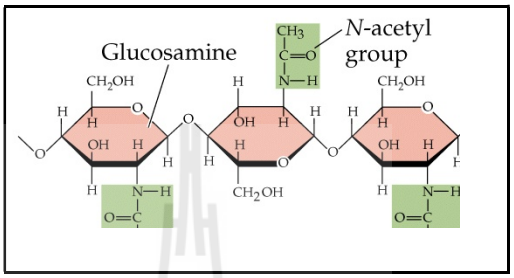
ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบค่าจลนพลศาสตร์การแพร่ของน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส ผ่านช่องพอรินกลายพันธุ์กับค่าของพอรินดั้งเดิม 16

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

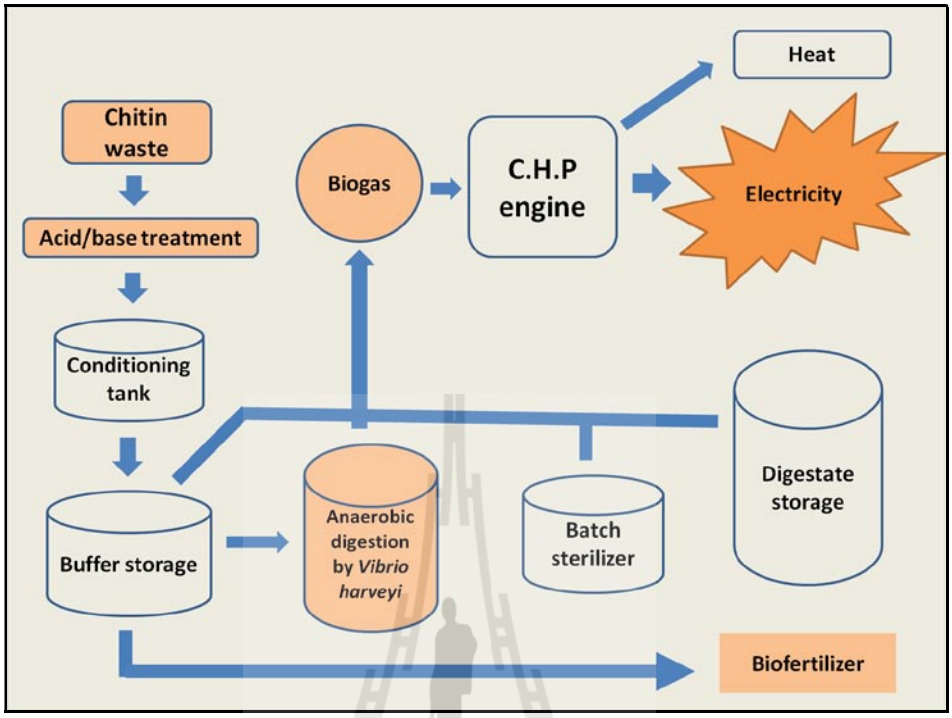
ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย ๆ ของ N-acetylglucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคลซิดิกแบบ $\beta 1 \rightarrow 4$ ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์ (แหล่งที่มา: http://www.scottsmithonline.com/interests/medicalschool/biology/110a/Midterm1Materials/Notes/MyTextbookBSCI110aMT1.html)

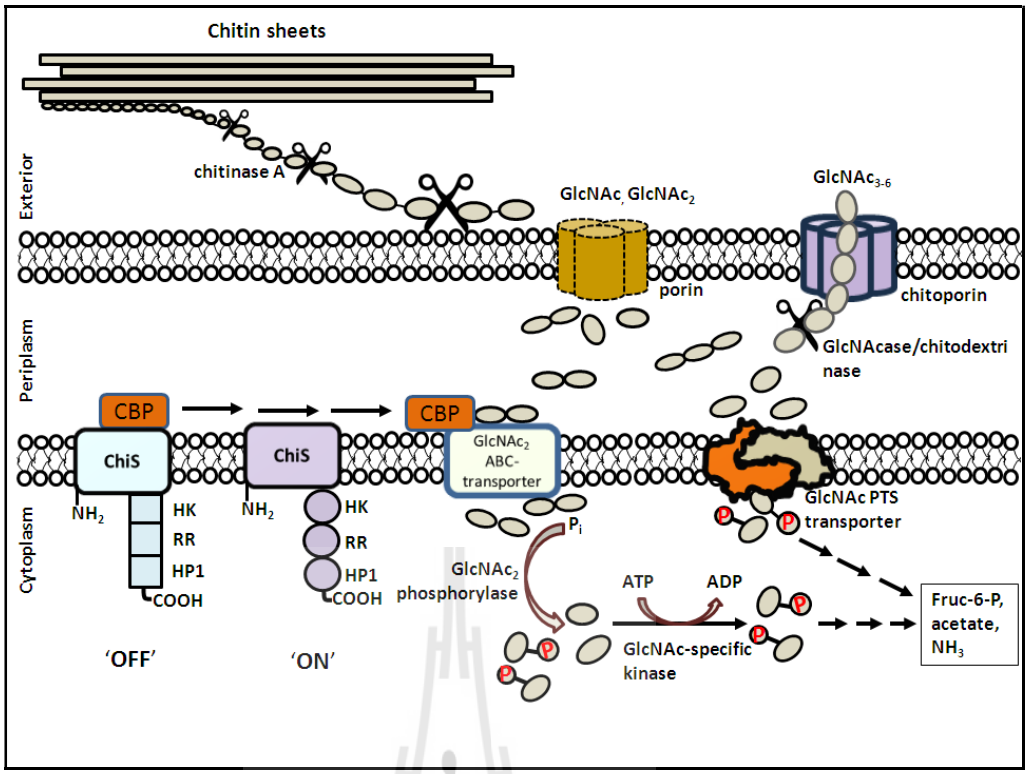
ไคตินจัดเป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลีเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง 10^{10} ถึง 10^{11} ตันต่อปี (Zobell CE and Rittenberg SC, 1937) ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเภสัชกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ ในระบบนิเวศน์วิทยาทางทะเล ไคตินถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติโดยแบคทีเรียในทะเลแฟมิลี *Vibrionaceae* ทำให้ไม่มีการสะสมของไคตินในท้องทะเล การนำแบคทีเรียนี้มาช่วยสลายกากไคตินจะช่วยลดปริมาณของเสียที่เป็นผลิตผลข้างเคียงจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหารอาหารทะเลแช่แข็งและอาหารทะเลอัดกระป๋อง ที่ปล่อยกากไคตินที่ไม่ย่อยสลายให้สร้างปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมตามแนวชายฝั่งทะเลได้ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิกิริยาการย่อยสลายในธรรมชาติ ได้มีการนำเสนอว่าหน่วยย่อยที่ได้จากการสลายไคตินโดยแบคทีเรีย เช่น *Vibrio sp*. สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิต pharmaceutically-active compounds เช่น สารกลูโคซามีนมีฤทธิ์ช่วยลดอาการไขข้อและอาการข้อเสื่อม สารไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์มีฤทธิ์ในการต้านการเติบโตของมะเร็ง หรือมีคุณสมบัติช่วยสมานบาดแผลและการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย นอกจากนี bioconversion ของไคตินโดยแบคเทีย *Vibrio* ยังมี potential สูงในการผลิต bioenergy/biodiesel-active compounds ถ้าปรับสภาวะที่เหมาะสม ขบวนการ recycle ของไคตินจะเกิดประโยชน์มหาศาลในเรื่องของแหล่งพลังงานทดแทนเพราะไคตินมีปริมาณมากไม่จำกัดในระบบนิเวศน์วิทยาทางทะเล มีผู้เสนอความคิดการสร้าง biodiesel จากไคตินมาแล้ว (Science Daily, August 5,

2005; Rezaei et al., 2007 และ Eijsink et al., 2008) โมเดลในการใช้เทคนิค microbial fuel cells ในการกระแสไฟฟ้าจากการหมักและย่อยไคตินแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 โมเดลการใช้แบคทีเรียย่อยสลายไคตินเพื่อการผลิต biogas (ดัดแปลงจาก: Kelly and Dworjanyn, Scottish Association for Marine Science, 2008)

ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่มีความเหมาะสมในการนำใช้ในกรรมวิธีการสลายไคติน เนื่องจากเป็นแบคทีเรียในทะเลที่ใช้ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอยู่แล้ว มีงานวิจัยระดับพื้นฐานโดย Roseman และคณะ (Bassler BL et al., 1991; Yu et al., 1991; Keyhani and Roseman, 1999 และ Li and Roseman, 2004) ได้ทำการศึกษาวิถีเมทาบอลิซึมของการสลายไคตินโดย*เชื้อ V. furnissei* โดยให้แนวคิดว่าการสลายไคตินโดยแบคทีเรีย *Vibrio* เกี่ยวข้องกับ signaling cascade ที่ซับซ้อนและต้องการกลุ่มของเอนไซม์หรือโปรตีนหลายชนิดมาทำงานร่วมกันอย่างเป็นลำดับ โดยขั้นตอนอาจสรุปได้ดังนี้คือ (1) การเกาะติดของไคตินบนผิวของแบคทีเรีย (2) การสลายไคตินโดยไคติเนส (3) การขนส่งไคตินโอลิโกแซคคาร์ไรด์เข้าสู่เซลล์ และ (4) เมทาบอลิซึมของน้ำตาล GlcNAc เพื่อสร้างเป็นพลังงานให้แก่เซลล์ในที่สุด (รูปที่ 1.3)

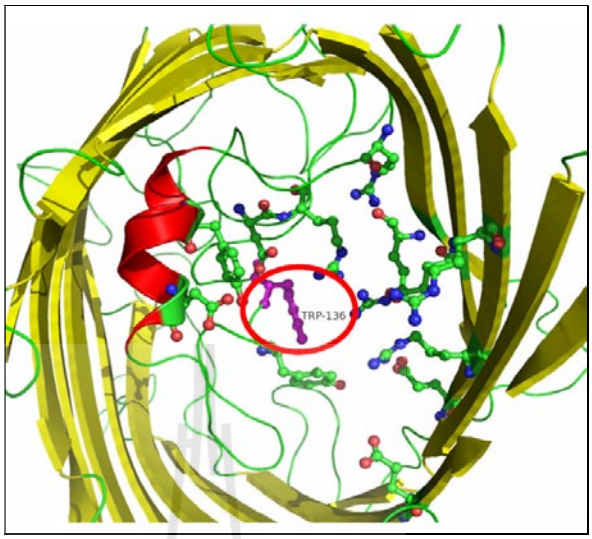


รูปที่ 1.3 แสดงวิถีการสลายไคตินโดยแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (Hjerde et al., BMC Genomics, 2008; Suginta et al., PLoS One, 2013)

จากรูปที่ 1.3 ขั้นตอนของการเกาะติดของไคตินเกิดผ่าน chemotaxis protein บนผิวเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรีย หลังจากนั้นแบคทีเรียจะหลั่งเอนไซม์ไคติเนสออกมาย่อยสลายสายไคตินให้เป็นสายสั้น ๆ น้ำตาลหน่วยเดี่ยวหรือหน่วยคู่สามารถผ่านเข้าเซลล์โดย general diffusion porin ส่วนน้ำตาลสายยาว เช่น $GlcNAc_{3-6}$ จะผ่านเข้าเซลล์ผ่านช่องไคโตพอรินหรือช่องจำเพาะที่เรียกว่า chitooligosaccharide-specific porin หรือ ChiP (Keyhani et a., 2000) หลังจากนั้นน้ำตาลสายยาวจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ N-acetylglucosaminidases (GlcNAcases) ที่อยู่ใน periplasm ได้น้ำตาลหน่วยคู่หรือหน่วยเดียวซึ่งผ่าน GlcNAc permease หรือ $GlcNAc_2$ ABC transporter บางส่วนของน้ำตาลจะ deacetylate ด้วยเอนไซม์ deacytylase เป็น GlcN ที่ถูกส่งเข้าสู่ไซโตพลาสซึมโดย GlcN transporter ในไซโตพลาสซึมน้ำตาลนี้จะถูก phosphorylate แล้วถูกเปลี่ยนเป็น fructose-6-phosphate หรือ acetate และ NH_3

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการใช้ไคตินของเอนไซม์ไคติเนสและเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส จากเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 650 ไว้อย่างละเอียด (Suginta et al., 2000; 2004; 2005; 2007; 2009; 2010 และ Songsiriritthigul et al., 2008) ในส่วนของไคโตพอรินผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการสร้างช่องพอรินและการนำอิออนผ่านเข้าออก นอกจากนี้ยังได้ทำงการทดสอบการนำเข้าด้วยวิธี high-time resolution BLM measurements และ liposome swelling assay พบว่าไคโตพอรินมีคุณสมบัติเป็นช่องที่จำเพาะต่อน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์หรือ chitooligosaccharide-specific channel (Suginta et al., PLoS One, 2013) และมีอัตราการนำเข้าของสารสูงกว่าช่องพอรินอื่นในระดับมากถึง 100,000 เท่า โดยช่องไคโตพอรินที่ศึกษาอยู่เป็น

sugar-specific channel ที่ว่องไวที่สุดเท่าที่มีรายงานมา (Suginta et la., under review by J Biol Chem) ข้อเสนองานวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อยอดถึงอิทธิพลของกรดอะมิโนวงแหวนคือ Trp136 รูปที่ 1.4 ที่พบอยู่ที่กลางช่องพอรินว่าน่าจะเป็นตัวกำหนดการผ่านของอิออนและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ผ่านช่องไคโตพอริน



รูปที่ 1.4 โครงสร้างทำนายของช่องไคโตพอรินของ *V. harveyi* ที่มี Trp136 อยู่ที่บริเวณผิวด้านบนกลางช่องพอริน

ดังนั้นองค์ความรู้ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จะนำไปสู่การเข้าใจกลไกการส่งผ่านน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่เซลล์ *Vibrio* จะนำไปเมทาบอไลท์ให้ได้สารตัวกลางที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์ เภสัชกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ทำการผลิตโปรตีนกลายพันธุ์ไคโตพอรินจากแบคทีเรียในทะเล *V. harveyi* ในระบบ *E. coli*
2. ทำการศึกษาผลของกรดอะมิโนกลายพันธุ์ Trp136 ที่เปลี่ยนไปเป็น Ala หรือ Phe ต่อการผ่านของอิออนสู่ช่องไคโตพอรินโดยเทคนิค Planar Lipid Reconstitution Technique
3. ทำการศึกษากลไกและจลนพลศาสตร์ของการแพร่ผ่านของไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์เข้าช่องไคโตพอรินกลายพันธุ์เทียบกับไคโตพอรินดั้งเดิม

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

ผู้วิจัยได้ทำการโคลนยีนไคโตพอรินและทดสอบความสามารถในการแสดงออกในระบบ *E. coli* และศึกษาหน้าที่ในการขนส่งอิออนและน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ผ่านช่องพอรินไว้อย่างละเอียดแล้ว (Suginta et al, PLoS One, 2013 และ Suginta et al, Under review by J Biol Chem) โครงการวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยต่อยอดจากโครงการวิจัยที่ผ่านมาโดยมีขอบเขตคือ 1) ทำการสร้างยีนกลายพันธุ์ที่มีกรดอะมิโนที่สำคัญในการกำหนดคุณสมบัติของช่องพอริน Trp136 เปลี่ยนไปเป็น Ala (mutant W136A) และ Phe (mutant W136F) โดยวิธี site-directed mutagenesis; 2) ทำการผลิตโปรตีนกลายพันธุ์ในระบบ *E. coli* (DE3) Omp8 Rosetta และการทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยวิธีทางโครมาโตกราฟฟี; 3) ทำการศึกษาคุณสมบัติการสร้างช่องเดี่ยวของไคโตพอรินโดย

เทคนิค Planar Black Lipid Membrane (BLM) Reconstitution Technique เพื่อดูค่าการนำไอออนของช่องพอรินเดี่ยวและศึกษาผลของการเปลี่ยนกรดอะมิโนนี้ต่อการเปิด-ปิดของช่องไคโตพอริน; 4) ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการแพร่ผ่านของไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ชนิดต่าง ๆ เข้าช่องไคโตพอรินกลายพันธุ์เทียบกับพอรินดั้งเดิม; และ 5) ทำการรวบรวมข้อมูลเพื่อเขียนรายงานการวิจัยและตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้มี 4 ประการหลักคือ

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยเนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้ใดดำเนินงานมาก่อนจึงคาดว่าผลสัมฤทธิ์ จากการวิจัยจะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor สูงได้อย่างน้อย 1 เรื่อง
2. การเผยแพร่ในรูปโปสเตอร์หรือการบรรยายในที่ประชุมระดับชาติอย่างน้อย1 ครั้ง
3. เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นเยาว์ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมีและสาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยจัดเป็นความเชี่ยวชาญเฉพาะทางระดับสูงที่มีการถ่ายทอดน้อยมากในสถาบันการศึกษาอื่นในประเทศไทย
4. องค์ความรู้ที่ได้เป็นการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับแนวทางการพัฒนากระบวนการสลายไคตินโดยวิธีทางชีวภาพ เช่น การผลิตสารกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่มีฤทธิ์ทางยา การทดลองสร้าง biogas จากการไคตินโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ซึ่งเป็นการประยุกต์ในเชิงพลังงานทดแทนพร้อมกับการจัดการสิ่งแวดล้อมแบบสะอาดในเวลาเดียวกัน

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้องกับการเกษตรและการพลังงาน เช่น หน่วยงานในสังกัดของกระทรวงเกษตร และสหกรณ์ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและกระทรวงพลังงาน
2. หน่วยงานของรัฐและเอกชนที่รับผิดชอบเกี่ยวเกี่ยวกับการกำจัดมลภาวะที่เกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อม เช่น หน่วยงานในสังกัดของกระทรวงธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
3. หน่วยงานในระดับมหาวิทยาลัยต่าง ๆ ที่ต้องการค้นคว้าเกี่ยวกับงานวิจัยที่ผู้วิจัยกำลังศึกษาอยู่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเนื่องจากงานวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของการสอนการวิจัยและการผลิตบัณฑิตศึกษาในระดับปริญญาโทและเอกของสาขาชีวเคมี สำนักวิทยาศาสตร์ของม. เทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ *Vh*ChiP

ทำการกลายพันธุ์กรดอะมิโน Trp136 ที่ตำแหน่งกลางช่อง *Vh*ChiP โดยเทคนิค PCR-based site-directed mutagesis ส่วนดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้คือยีน *ChiP* ที่โคลนเข้าไปใน pET23d(+) vector ไว้แล้วในการศึกษาอื่น (Suginta et al., PLoS One, 2013) โดยเรียก construct ที่ได้ว่า pET23d(+)/*VhChiP* ส่วนคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบการกลายพันธุ์แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงลำดับของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สร้างโปรตีน *Vh*ChiP กลายพันธุ์

โปรตีนกลายพันธุ์	ลำดับของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์
Trp136 (wt)	(F) 5'-ataccatggcgtcttacctaaagaaaag-3' (*Nco*I) (R) 5'-aacctcgagttagaagtagtattcaacac-3' (*Xho*I)
Trp136⟶Ala	(F) 5'-ggtctaggtgatgtttacgacgcaggtggtgctatcggtggtgc-3' (R) 5'-gcaccaccgatagcaccacctgcgtcgtaaacatcacctagacc-3'
Trp136⟶Phe	(F) 5'-ggtctaggcgatgtttacgactttggtggtgcgattggtggtgc-3' (R) 5'-gcaccaccaatcgcaccaccaaagtcgtaaacatcgcctagacc-3'

หมายเหตุ นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้คือส่วนที่เปลี่ยนเพื่อสร้างกรดอะมิโนที่กลายพันธุ์

เมื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ที่ต้องการแล้วทำการกลายพันธุ์ยีนด้วยเทคนิค PCR-based site-directed mutagenesis ตามวิธี QuikChange Site-Directed Mutagenesis protocol ของ Stratagene หลังจากทำการย่อยดีเอ็นเอแม่ด้วยเอนไซม์ *Dpn*I แล้วทำการนำพลาสมิดที่มีแต่ยีนกลายพันธุ์เข้าไปในเชื้อ *E. coli* XL1-Blue หลังจากนั้นทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคโลนีที่ได้โดยใช้ QuickClean II Plasmid Miniprep Kits (GenScript, Piscataway, NJ, USA) แล้วนำพลาสมิดที่มียีนกลายพันธุ์ที่ให้ชื่อว่าpET23d(+)/*VhChiPW136A* และ pET23d(+)/*VhChiPW136F* เข้าสู่ *E. coli* DH5α เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ทำการสกัดพลาสมิดอีกครั้งแล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องของยีนกลายพันธุ์ทั้งสองสายดีเอ็นเอโดยวิธี automated DNA sequencing (First BASE Laboratories Sdn Bhn, Selangor Darul Ehsan, Malaysia)

2.2. การศึกษาการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์โปรตีน

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET23d(+)/*VhChiPW136A* และ pET23d(+)/*VhChiPW136F* เข้าสู่เซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) Omp8 Rosetta โดยวิธี $CaCl_2$ เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์นี้ได้ผ่านการทำ gene knockout ทำให้ยีนพอริน LamB OmpF OmpC และ OmpA ในจีโนมถูกทำลาย (Prilipov et al.,1998) จึงมีความเหมาะสมในการใช้ศึกษาการผลิตช่องพอริน *Vh*ChiP เพราะเซลล์นี้ไม่สามารถสร้างพอรินอื่น ๆ ได้ ขั้นตอนในการศึกษาการแสดงออก การสกัดและการทำบริสุทธิ์โปรตีนดั้งเดิมและโปรตีนกลายพันธุ์มีดังนี้

- การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *VhChiP*
    1. ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* Omp8 (pET23/*VhChiP*) บนอาหารแข็ง LB agar plate ที่เติม 100 µg/mL Amp ในตู้บ่มที่ 37° เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
    2. เขี่ยโคโลโนเดี่ยวลงใน 250 mL ของอาหารเหลว LB/Amp ในเตรียมใน flask ขนาด 1 L ทำการเขย่าในตู้เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°
    3. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB/Amp ปริมาตร 9x350 mLในเตรียมใน flask ขนาด 1 L แล้วปรับค่า OD_{600} ให้เท่ากับ 0.1 ทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37° จนเซลล์มีการเจริญเติบโตถึงช่วง mid-log phase ทำการตรวจค่า OD_{600} ให้เท่ากับ 0.5-0.8
    4. เติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 mM เพื่อเหนี่ยวการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน*VhChiP* ทำการเลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°
    5. ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ตั้งอุณหภูมิในการปั่นที่ 4°
    6. เก็บเซลล์ที่ในส่วนตะกอน ไว้ที่ -20°
- การสกัดโปรตีน *VhChiP* จากผนังเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (Omp8) Rosetta
    - การสลายเซลล์
        1. ทำการละลายเซลล์ด้วยอัตราส่วน 1 g ของน้ำหนักเซลล์เปียกต่อ 10 mL ของ lysis buffer (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$)
        2. เติม 100 uLของ RNase A (10 mg/mL) และ 10 ไมโครLของ DNase I (10 mg/mL) ต่อปริมาตร 10 mL ของบัฟเฟอร์
        3. สลายเซลล์ด้วย French Press homogenizer
        4. เติม 20% (w/v) SDS ปริมาตร 1 mL ต่อ 10 mLของ cell suspension ที่เตรียมได้ บ่มสารละลายเซลล์ที่ 60° เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ
        5. ปั่นเก็บส่วนตะกอนที่ได้จากการปั่นที่ความเร็วรอบ 22,000 rpm ที่ 4° เป็นเวลา 60 นาที
    - การเตรียมการสกัดด้วย SDS
        1. ล้างตะกอนด้วย 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 เพื่อกำจัด SDS ที่หลงเหลืออยู่
        2. เติม 0.125% (v/v) octyl-POE เตรียมใน 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 สัดส่วนที่เติมคือ 5 mL ต่อ 1 g ของตะกอน
        3. บดตะกอนด้วย Potter-Elvehjem homogenizer จนไม่เห็นก้อนตะกอนหลงเหลืออยู่
        4. บ่มสารละลายตะกอนที่ 37° เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ ขณะบ่ม
        5. ปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็วในการปั่น 40,000 rpm ที่ 4° เป็นเวลา 40 นาที
    - การสกัดและการละลาย
        1. เติม 0.125% (v/v) octyl-POE เตรียมใน 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 สัดส่วนที่เติมคือ 5 mL ต่อ 1 g ของตะกอน
        2. บดตะกอนด้วย Potter-Elvehjem homogenizer ให้ละเอียดจนไม่เห็นตะกอนหลงเหลืออยู่
        3. บ่มสารละลายตะกอนที่ 37° เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ ขณะบ่ม
        4. ปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็วในการปั่น 40,000 rpm ที่ 20° เป็นเวลา 40 นาที

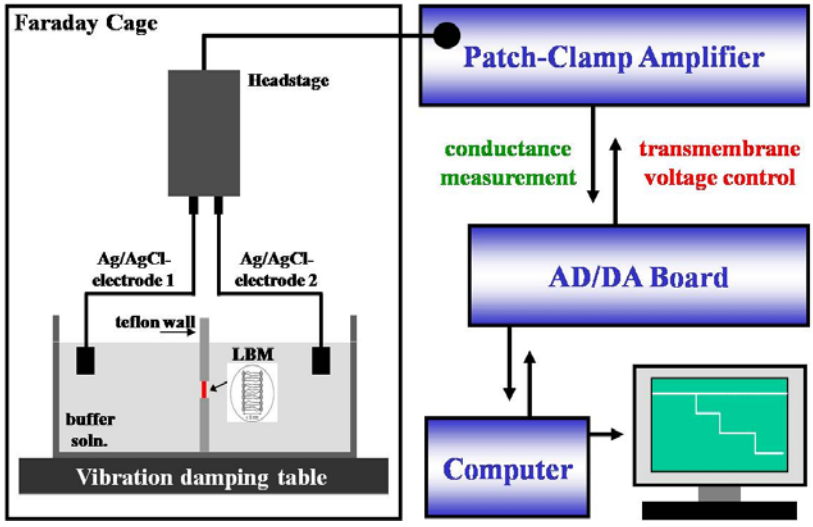
5. ละลายตะกอนด้วย 3% (v/v) octyl-POE ในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM phosphate, pH 7.4 ส่วนที่ละลายประกอบด้วย “*Vh*ChiP”

2.3. การตรวจความถูกต้องของการสร้างโปรตีน *Vh*ChiP ด้วยวิธี immunoblotting

ทำการแยกโปรตีนพอรินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปริมาณ 2 µg ด้วยวิธี SDS-PAGE ที่ประกอบด้วย 12% อะคริลาไมด์ และ 8M urea โดยระบบของ Laemmli (Laemmli, 1970) แล้วย้อมแถบโปรตีนด้วยสี Coommassie blue หลังจาก destain ทำการตัดแถบโปรตีนด้วยใบมีดโกนสะอาดออกจากเจลแล้วทำการ emulsify โปรตีนด้วย 50 uL ของ Freund’s complete adjuvant (Pierce) แล้วนำไปฉีดเข้ากระต่ายเพื่อการผลิต polyclonal antiserum นำแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีน ChiP ปริมาณ 5 µg โดยการทำ Immunoblotting ทำการตรวจหาปฏิกิริยาการจับแบบจำเพาะระหว่าง แอนติเจนและแอนติบอดีด้วยวิธี enhanced chemiluminescence (ECL®, Amersham Pharmacia Biotech) โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางของ anti-*Vh*ChiP antibody เป็น 1:10,000 ในสารละลาย phosphate buffer saline, pH 7.4 ที่มี 0.2% Tween 20 และ 5% (w/v) non-fat dried milk (Suginta et al., PLoS One, 2013)

2.4. การศึกษาคุณสมบัติการสร้างช่องของรีคอมบิแนนท์ *VhChiP* กลายพันธุ์โดยเทคนิค Black Lipid Membrane (BLM) Reconstitution Technique

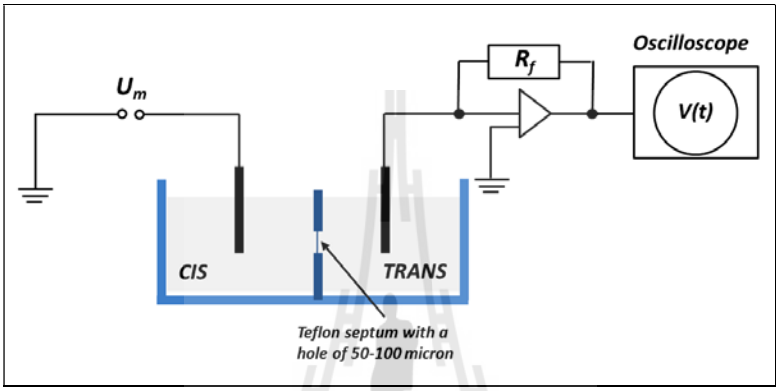
การวัดหา single ion channel conductance โดยวิธี BLM (Nestorovich et al, 2002) อาศัยหลักการ insert ของช่องพอรินบนฟอตโฟลิปิดเมมเบรนด้วยการเหนี่ยวนำด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้าที่มีค่าไม่เกิน 200 mV องค์ประกอบของ BLM set-up แสดงให้เห็นในรูปที่ 2.1 จากรูป BLM set-up จะต้องอยู่ภายในกล่องฟาราเดย์ที่ป้องกันการรบกวนจากกระแสไฟฟ้าหรือคลื่นไฟฟ้าจากภายนอกระบบ เพื่อสามารถวัดกระแสอิออนในระบบที่มีระดับระดับต่ำมาก ๆ โดยกระแสที่เกิดขึ้นเกิดจากการเคลื่อนที่ของอิออน เช่น K^+ หรือ Cl^- ในอิเลคโตรไลท์ ผ่านช่องพอรินที่ฝังอยู่บนเมมเบรนที่คั่นระหว่าง chamber ด้าน cis และ trans การเคลื่อนที่ของอิออนที่สามารถตรวจวัดด้วยอิเลคโทรดที่มีสองขั้ว ด้านหนึ่งคือขั้วลบและอีกด้านหนึ่งเป็นขั้วบวก ซึ่งจะแปลงรูปเป็นกระแสไฟฟ้า (I) ที่ระดับ pA โดยค่ากระแสที่วัดจะแปรผันโดยตรงกับความปริมาณอิออนที่เคลื่อนที่ผ่านช่องพอริน *Vh*ChiP



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของ BLM set-up ที่ใช้ศึกษาการแพร่ผ่านของสารผ่านช่องพอริน

การทดลองนี้ทำการตรวจหาคุณสมบัติของ *VhChiP* ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 2.1 โดยวัดหาค่า single ion conductance โดย Montal-Mueller BLM technique มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการประกอบแผ่นเทฟลอน (Teflon) ที่มีความหนา 15 micron และมีรูขนาด 100-200 micron กับ cuvette เข้าด้วยกัน แผ่นเทฟลอนจะแยก chamber ออกเป็นสองส่วนคือ ส่วน cis และส่วน trans โดยเรียกอิเลคโทรดด้าน cis ว่าเป็น working electrode ส่วนอิเลคโทรดด้าน trans เป็น reference electrode ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 องค์ประกอบของ BLM cuvette ที่มีแผ่นเทฟลอนที่เจาะรูตรงกลางขนาด 50-100 micron กั้นระหว่างช่องใส่สารละลายด้าน cis และด้าน trans

2. หยด 1% (v/v) hexadecane ที่เตรียมใน n-hexane ที่ตรงกลางของแผ่นเทฟลอนที่มีรูทั้งสองด้านโดยใช้ทิปที่เสียบท่อพลาสติกยาวประมาณ 2 cm สำหรับไมโครปิเปตขนาด 20 uL ทิ้งแผ่นเทฟลอนไว้ 5-10 นาที จนตัวทำละลายระเหยหมด
3. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 1 M KCl/20 mM HEPES, pH 7.4 ปริมาตร 2.5 mL ลงใน chamber ทั้งสองด้าน
4. ใช้ Hampton syringe (ขนาด 10 uL) ดูดสารละลายไขมัน diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC) ความเข้มข้น 5 mg/mL ที่เตรียมในตัวทำละลาย n-pentane และหยดปริมาตร 2-3 uL ลงในแต่ละด้านของ chamber ทิ้งให้ไขมันกระจายตัวดีประมาณ 10-15 นาที
5. ทำการสร้าง planar lipid membrane ด้วยการไปเปตสารละลายไขมันด้าน CIS ขึ้นลงเบา ๆ
6. ให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ค่าต่าง ๆ เช่น ±50 ±100 ±150 และ ±200 mV ระบบควบคุมความต่างศักย์ไฟฟ้าคือ Axopatch 200B amplifier โดยใช้ voltage-clamp mode ถ้าเมมเบรนไม่ขาด ทิ้งให้เมมเบรนคงที่อีกประมาณ 5-10 นาที
7. เติมโปรตีน *Vh*ChiP ความเข้มข้นประมาณ 1-2 ng/mL เตรียมใน 1%(v/v) octyl-POE/20mM HEPES, pH 8.0 ลงในด้าน CIS ของ chamber ไปเปตขึ้นลงเบา ๆ

8. ให้ applied voltage ที่ ±50 mV รอจนมีกระทั่งมีการแทรก (insert) ของช่องพอรินเดี่ยว บันทึกค่ากระแสที่ได้ที่ ±50, ±100, ±150 และ ±200 mV ที่ค่า output gain (α) = 10 และใช้ four-pole low-pass Bessel filter ที่ 10 mHz
9. ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองหาค่า single channel conductance ตามกฎของโอห์ม

2.5. การศึกษาการนำเข้าของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ผ่านช่อง *Vh*ChiP โดยเทคนิค BLM

ทำการไตเตรทช่องพอรินเดี่ยวที่แทรกอยู่ในลิปิดเมมเบรนที่เตรียมได้ในหัวข้อ 2.4 ด้วยการเติมสารละลายน้ำตาลไคโตเฮกซะโอส ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25, 1.25, 2.5, 5, 10 uM ด้าน cis หรือด้าน trans ของ chamber ปิเปตเบา ๆ แล้ววัดค่าการไหลของอิออนเป็นเวลา 2 นาที ที่ค่าความต่างศักย์ ±100 mV ถ้ามีการผ่านของน้ำตาลเข้าไปในช่องพอรินจะเห็นการลดลงของกระแสเนื่องจากโมเลกุลของน้ำตาลเข้าไปปิดกั้นการเคลื่อนที่ของอิออนเมื่อโมเลกุลของน้ำตาลเข้าไปจับกับบริเวณ affinity sites ภายในช่องพอรินทำให้ค่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของการนำอิออนหรือ ion conductance ลดลง ดังนั้นสามารถคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับหรือ Equilibrium binding constant (K, M^{-1}) ได้ตามสมการที่ 1 ดังข้างล่าง (Danelon et al., J Biol Chem, 2003)

$$\frac{G_{max}-G_c}{G_{max}} = \frac{I_{max}-I_c}{I_{max}} = \frac{K.[c]}{K.[c]+1} \qquad \text{Eq. 1}$$

โดยที่ค่า G_{max} คือค่า average conductance ของช่อง *Vh*ChiP ก่อนทำการไตเตรท ค่า G_c คือค่า average conductance ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ [c] ค่า I_{max} ค่ากระแสเริ่มต้นที่เกิดการเปิดของช่องพอรินเดี่ยวทั้งสามหน่วยย่อยก่อนการไตเตรท ค่า I_c คือค่ากระแสที่ลดลงจากการจับของน้ำตาลในช่องพอรินที่ความเข้มข้น [c] ค่า K คือค่าคงที่สมดุลของการจับในหน่วย M^{-1}

ส่วนค่าคงที่การจับหรือ on-rate constant หรือ k_{on} ในหน่วย $M^{-1}\cdot s^{-1}$ คำนวณจากสมการที่ 2 ดังข้างล่าง

$$k_{on} = K \cdot k_{off} \qquad \text{Eq. 2}$$

และค่าคงที่การปล่อยหรือ off-rate constant หรือ k_{off} ในหน่วย s^{-1} หาจากสมการที่ 3 ข้างล่าง (Kullman *et al*., Biophys J, 2002)

$$k_{off} = 1/\tau_c \qquad \text{Eq. 3}$$

2.6. การศึกษาอัตราการนำเข้าของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ผ่านช่อง *Vh*ChiP โดยวิธี liposome swelling assay

- การเตรียม multi-lamellar liposome

1. ชั่ง 20 mg ของลิปิด (soy bean azolectin) นำมาละลายด้วย chloroform (Avanti) ปริมาตร 1 mL ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ที่สะอาด ความเข้มข้นของสารละลายลิปิดที่ได้เป็น 20 mg/mL
2. ปิเปต 0.2 mL ลงในหลอดแก้วที่มีฝาเกลียวปิดได้ เอียงหลอดเป็นมุม 45° และหมุนหลอดแล้วพร้อมกับเป่าของเหลวเบา ๆ จนแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน N_2(g)
3. เติม 0.2 mL diethyl ether (analytical grade) เขย่าเบา ๆ จนลิปิดละลายดี ตั้งทิ้งไว้ใน fume hood ประมาณ 10 นาที

4. จุ่มส่วนก้นของหลอดลงในน้ำอุณหภูมิ 50° เอียงหลอดเป็นมุม 45° และหมุนหลอดไปพร้อม ๆ กับเป่าของเหลวเบา ๆ จนแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน N_2(g)
5. ถ้ายังมีก้อนลิปิดค้างอยู่ให้ทำการทดลองในข้อ 3 และ 4 ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง
6. วางหลอดแก้วที่เปิดฝาใน dessicator แล้วทำแห้งอย่างน้อย 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน
7.

- การเตรียม proteoliposome

1. เติม 200 uLของสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 20 ug/mL ในสารละลายบัพเฟอร์ 5 mM Tris/HCl, pH 7.5/0.125% LDAO ทำการผสมลิปิดและโปรตีนด้วยการ vortex เบา ๆ (ปรับความเร็วในการเขย่าไม่เกิน 600 rpm) ต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที
2. ทำการ sonicate หลอดเป็นเวลา 30 วินาที
3. ทำแห้ง proteoliposome ด้วยเครื่อง evaporator ที่ความดัน 65 mbar ที่อุณหภูมิอ่างเป็น 50°
4. ทำแห้ง proteoliposome ใน dessicator เป็นเวลาอีก 1 ชั่วโมง

- การเตรียม dextran-filled proteoliposome

1. เตรียม 17% (w/v) D(+)-dextran (MW 40,000, fluka) ปริมาตร 2 mL ใน 5 mM Tris/HCl, pH 7.4
2. เติม 600 uLของสารละลาย dextran ในแต่ละหลอด แล้วถือหลอดของผสมในแนวตั้ง ยืดแขนตรงแล้วเขย่าหลอดด้วยวิธีการยกแขนขึ้นลงระดับหัวไหล่-เอว 3 ครั้ง
3. บ่มหลอดสารละลาย proteoliposome/dextran ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 30° เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บหลอดไว้ในตู้เย็น 4°

- การหาค่า isotonic solute concentration

1. เตรียม 0.1 M stock solution ของสารละลาย raffinose 2 mL ละลายให้ดีด้วยการเขย่าด้วย vortex กรองสารละลายน้ำตาลด้วย filtered disc ขนาด 0.45 micron
2. เตรียมสารละลายน้ำตาล D-raffinose ปริมาตร 0.2 mL ความเข้มข้น 40, 50,60, และ 70 mM ใน 5 mM Tris/HCl, pH 7.5 จาก stock solution ในข้อ 1
3. ปิเปต 25 uLproteoliposome solution ลงใน 1-mL glass cuvette
4. เติม 600 uL40 mM raffinose ลงใน cuvette เขย่าทันทีเบา ๆ แล้วรีบวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า OD_{500} ภายในเวลา 60 นาที
5. ทำการทดลองซ้ำกับสารละลายน้ำตาล D-raffinose ที่ความเข้มข้น 50, 60, 70, และ 80 mM
6. คำนวณอัตราการเปลี่ยนแปลงค่า OD_{500} ของสารละลายน้ำตาลแต่ละความเข้มข้น ณ ช่วงเวลา 60 วินาที ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ให้ค่าการเปลี่ยนแปลง $\leq$ 0.01 ถือว่าเป็น isotonic concentration ให้ใช้ความเข้มข้นนั้นเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ ในการทดลองถัดไป

- การวัดหาค่า swelling rate ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลไคโตเฮกซะโอส ที่ความเข้มข้นเท่ากับ isotonic solute concentration จาก 0.1 M stock solution
2. ปิเปต 25 uLproteoliposome solution ลงใน 1-mL glass cuvette
3. เติม 600 uL 40 mM raffinose ลงใน cuvette เขย่าทันทีเบาแล้วรีบวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า OD_{500} ภายในเวลา 60 นาที

4. คำนวณหาค่า swelling rate จากค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง หาค่า relative swelling rate โดยให้ค่า swelling rate ของน้ำตาล arabinose มีค่าเป็น 100%
5. สร้างกราฟระหว่างค่า relative swelling rate กับน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล เปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่าของน้ำตาล D-arabinose

บทที่ 3
ผลการทดลองและข้อวิจารณ์

3.1. การออกแบบการกลายพันธุ์ช่องโปรตีน *Vh*ChiP

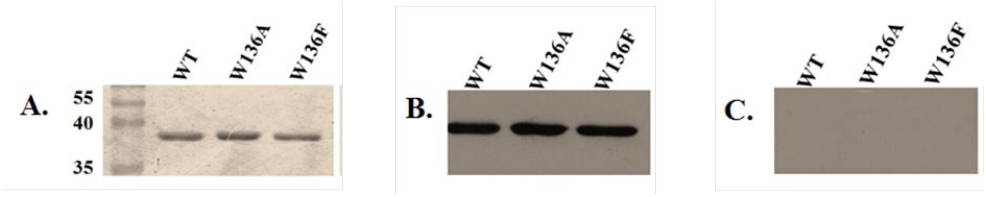
จากการทำนายโครงสร้างสามมิติของพอริน *VhChiP* พบว่าโปรตีนนี้มีโครงสร้างเป็นช่องแบบ β-barrel ที่ประกอบด้วยสายบีต้า 16 สายมาเรียงกันแบบ anti-pararell ภายในช่องมีส่วนของเกลียวอัลฟาสั้น ๆ แทรกอยู่ตามด้วยห่วง L3 ที่ยื่นเข้าไปตรงกลางช่อง และพบแขนงข้างของกรดอะมิโน Trp136 ที่บริเวณส่วนต้นของเกลียวอัลฟายื่นเข้ามาบดบังส่วนบนของช่องพอรินดังแสดงในรูปที่ 3.1.A เมื่อพิจารณาจากตำแหน่งที่อยู่แล้วคาดว่ากรดอะมิโนนี้น่าจะมีส่วนกำหนดการไหลผ่านของอิออนและน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ผู้วิจัยจึงได้ใช้เทคนิค site-directed mutagenesis ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 136 จาก Trp ให้เป็น Ala (รูปที่ 3.1B) และ Phe (รูปที่ 3.1C) ผลการทำ site-directed mutagenesis สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ 2 ชนิดคือ *Vh*ChiPY136A และ *Vh*ChiPY136F ที่มีคุณสมบัติของแขนงข้างต่างกัน โปรตีนที่เปลี่ยน Trp136 เป็น Ala มีแขนงข้างขนาดเล็กที่ไม่มีขั้ว ส่วนโปรตีนที่เปลี่ยน Trp136 เป็น Phe มีแขนงข้างเป็นวงแหวนไม่มีขั้ว

รูปที่ 3.1 โครงสร้างทำนายของช่องพอริน *VhChiP* ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโน Trp136 ในช่องพอริน *Vh*ChiP ดั้งเดิม (A), *Vh*ChiPY136A (B), และ *Vh*ChiPY136F (C)

3.2. การผลิต *Vh*ChiP จากเชื้อ *E. coli* (BL21) Omp8 Rosetta และการทำบริสุทธิ์

ทำการตรวจสอบความถูกต้องของการสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ ด้วยวิธี automated DNA sequencing โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายดีเอ็นเอ แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET23d(+)/*VhChiP*, pET23d(+)/*VhChiPA* และ pET23d(+)/*VhChiPF* ที่สกัดได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านคือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) Omp8 โดน *E. coli* สายพันธุ์นี้มีการ knockout ยีนพอรินหลายชนิดคือ OmpA OmpC OmpF และ LamB ดังนั้นเซลล์นี้จึงเหมาะสำหรับในการนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์พอริน *Vh*ChiP

เนื่องจากในขั้นตอนการโคลนยีนได้ใส่ signal peptide เข้าไปในยีน ดังนั้นโปรตีนที่ *E. coli* ผลิตได้จะฝังอยู่บนผนังเซลล์ เมื่อทำการสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากผนังเซลล์ด้วย 2% (w/v) SDS ตามด้วย 3% (v/v) octyl-POE ในขั้นตอนการสกัดด้วยดีเทอร์เจนท์นี้จะได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ระดับหนึ่ง หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์โปรตีนต่อด้วยวิธีทางโครมาโตรกราฟฟีแบบแลกประจุบวกโดยใช้คอลัมน์ Histrap SP HP (GE Healthcare) ขนาดความจุ 5 mL แล้วทำการชะคอลัมน์ด้วย 0-100% KCl พบว่าโปรตีน *Vh*ChiP จับกับคอลัมน์สามารถถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือ KCl ประมาณ 30%



รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน *Vh*ChiP ที่ผลิตโดย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) Omp8

A) การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ที่ย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie Blue

B) การวิเคราะห์ทาง immunoblot ของตัวอย่างในรูป B และตรวจหาการจับกันระหว่าง antibody และ antigen โดยใช้ anti-*Vh*ChiP antiserum

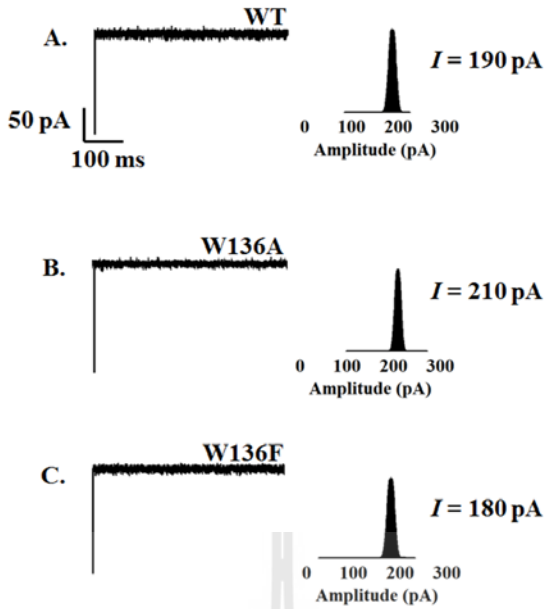
C) การวิเคราะห์ทาง immunoblot ของตัวอย่างในรูป B และตรวจหาการจับกันระหว่าง antibody และ antigen โดยใช้ anti-OmpN antiserum

ช่อง: Std, standard proteins; 1, *Vh*ChiPWT; 2, *Vh*ChiPW136A; 3, *Vh*ChiPW136F

เมื่อทำการวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว โดยโปรตีนกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136A และ *Vh*ChiPW136F (รูปที่ 3.2) ที่สกัดได้มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 38 kDa ซึ่งตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของ *Vh*ChiP ดั้งเดิม เมื่อทดสอบด้วยวิธี immunoblotting พบว่าโปรตีน *Vh*ChiP ทุกช่องบนแผ่นเจลจับกับ anti-*Vh*ChiP antibody (รูปที่ 3.2B) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน *Vh*ChiP ดั้งเดิมและโปรตีนกลายพันธุ์ ไม่มีการ cross-react กับ anti-OmpN antibody (รูปที่ 3.2C) ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ทั้งสามตัวอย่างคือช่องพอริน *Vh*ChiP

3.3. ผลของการกลายพันธุ์กรดอะมิโน Trp136 ต่อคุณสมบัติการสร้างช่องพอริน

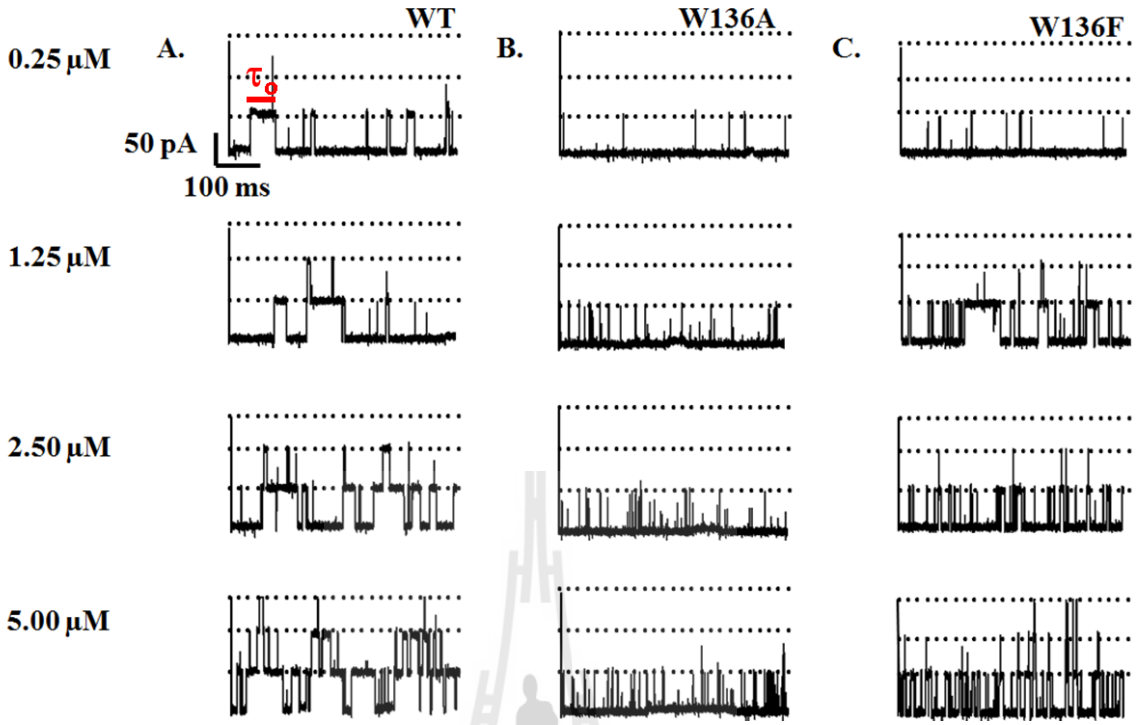
ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างช่องพอรินโดยเทคนิค BLM พบว่าช่องพอรินเดี่ยวของ *Vh*ChiPWT *Vh*ChiPW136A และ *Vh*ChiPW136F สามารถแทรกเข้าไปในฟอตโฟลิปิดเมมเบรนและหน่วยย่อยทั้งสามเปิดออกยอมให้กระแสของอิออนไหลผ่านที่ค่า 190 pA, 210 pA และ 180 pA ที่ค่าความต่างศักย์ 100 mV ดังแสดงในรูปที่ 3.3 A, B, และ C ตามลำดับ จะเห็นว่าค่า conductance ของพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136A มีค่าสูงกว่าของพอรินดั้งเดิมอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Trp เป็น Ala ทำให้ช่องพอรินกว้างขึ้น เนื่องจากแขนงข้างของ Ala มีขนาดเล็กกว่าของ Trp ทำให้ปริมาณกระแสอิออนไหลผ่านได้ดีขึ้น ส่วนค่า conductance ของพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136F มีค่าต่ำกว่าของพอรินดั้งเดิมเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Trp ไปเป็น Phe ที่มีความไม่มีขั้วเหมือน Phe ไม่มีผลกระทบรุนแรงต่อความสามารถในการนำอิออนของช่องพอริน *Vh*ChiP



รูปที่ 3.3 คุณสมบัติการนำอิออนช่องไคโตพอรินที่ได้จากการวัดด้วยวิธีเทคนิค BLM
ค่ากระแสที่ได้จากการวัดที่ความต่างศักย์ 100 mV เป็นกระแสที่ผ่านช่องพอรินเดี่ยว A ช่องพอริน *Vh*ChiPWT; B ช่องพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136A; และ C ช่องพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136F

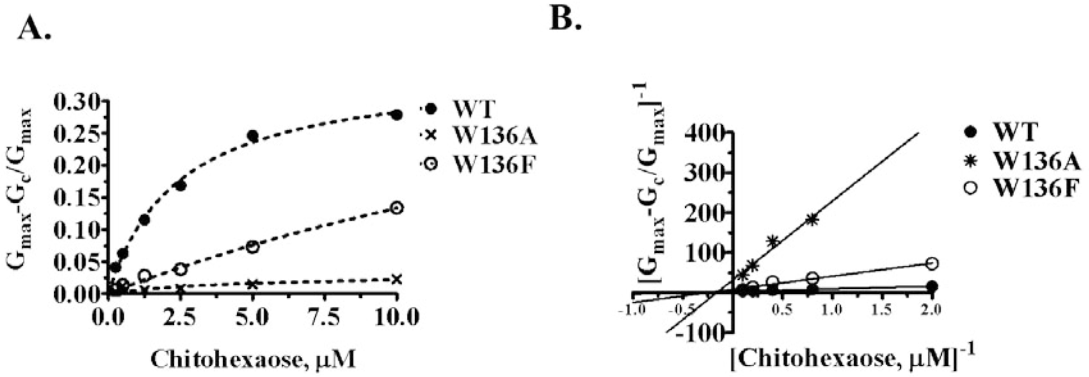
3.4. ผลของการกลายพันธุ์ต่อค่าจลนพลศาสตร์ของการจับระหว่างน้ำตาลและพอริน

ในการทดลองต่อมา ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของกระแสอิออนที่ไหลผ่านช่องพอรินเดี่ยวขณะที่ถูกไตเตรทด้วยน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25, 0.5, 1.0 และ 5 uM รูปที่ 3.4 แสดงถึงการเกิด transiet blockage ของกระแสที่เวลาต่าง ๆ ขณะที่โมเลกุลของน้ำตาลวิ่งผ่านช่องพอริน การลดลงของกระแสเกิดจากการจับกันระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกับ affinity sites ภายในช่อง จากรูปจะเห็นว่าน้ำตาลไคโตเฮกซะโอส ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 0.25 uM จะ block หน่วยย่อยที่หนึ่งของช่องพอรินดั้งเดิมเป็นหลัก ส่วนหน่วยย่อยที่สองจะถูก block เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้นเป็น 1.25-2.5uM และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ในการไตเตรทเพิ่มเป็น 5 uM พบว่าหน่วยย่อยทั้งสามของพอรินดั้งเดิมถูก block โดยจำนวนของ blocking event เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ (รูปที่ 3.4A) ส่วนโปรตีนกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136A มีการเพิ่มขึ้นจำนวน blocking event แต่น้ำตาล block เพียงหน่วยย่อยเดียวแม้แต่ที่ความเข้มข้นสูงสุดของน้ำตาลที่ใช้เป็น 5 uM โดยไม่พบการ block ของน้ำตาลที่หน่วยย่อยที่สองและหน่วยที่สาม (รูปที่ 3.4B) ส่วพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136F มีรูปแบบการ block โดยน้ำตาลไคโตเฮกซะโอส คล้ายกับของพอรินดั้งเดิมคือระดับของการ block หน่วยย่อยเพิ่มจากหนึ่งหน่วยเป็นสองและสามหน่วยเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.4C) ผลการทดลองที่น่าสนใจคือพบว่าพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136A และ *Vh*ChiPW136F แสดงค่าระยะเวลาที่น้ำตาลหลุดออกจากการจับที่ afiinity sites หรือเรียกระยะเวลาดังกล่าวว่าค่า residential time หรือ dwell time1 (τ_o) มีค่าน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดจากค่าฉลี่ยดั้งเดิม 6 ms เป็น <1 ms ทำให้ค่า off-rate constant หรือ k_{off} ของน้ำตาลกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น เนื่องจากค่า off-rate constant แปรผกผันกับค่า residential time ตามสมการที่ 3



รูปที่ 3.4. ผลของน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส ต่อการแพร่ของอิออนผ่านช่องพอริน
การลดลงของของกระแส I (pA) แบบ transient เกิดจากการ block ช่องพอรินเดี่ยวขณะที่น้ำตาลผ่านเข้าสู่ช่อง โดยทำการวัดที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -100 mV โดยเส้นประแสดงระดับของกระแสของหน่วยย่อยทั้งสามหน่วย A. ช่องพอริน *Vh*ChiPWT; B. ช่องพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136A; และ C. ช่องพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136F ค่า residential time หรือ τ_o แสดงด้วยเส้นขีดสีแดง

การที่น้ำตาลไคโตเฮกซะโอส อุดช่องพอรินเดี่ยวทำให้เกิดการลดลงของกระแสมากขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้มากขึ้น เมื่อทำวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยของการนำอิออน และสร้างกราฟระหว่างค่า average conductance ของ *Vh*ChiPWT กับค่าความเข้มข้นของน้ำตาลมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง hyperbola rectangular ดังแสดงในรูปที่ 3.5A ซึ่งแสดงการจับของน้ำตาลที่บริเวณ affinity sites เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลน้อย ๆ และการจับเข้าสู่จุดอิ่มตัวที่ความเข้มข้นของน้ำตาล >2.5 uM การสร้าง curve fit โดยใช้ฟังก์ชัน non-linear ให้ค่าคงที่สมดุลของการจับ (K) ตามความสัมพันธุ์ในสมการที่ 1 ส่วนกราฟการจับของน้ำตาลกับพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136A และ *Vh*ChiPW136F มีค่าลดลงอย่างมากและไม่แสดงการอิ่มตัวของการจับ ดังแสดงในรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp136 ที่ผิวด้านบนของช่องพอริน *Vh*ChiP มีผลกระทบต่อค่าการจับกับน้ำตาลสับสเตรทอย่างชัดเจน



รูปที่ 3.5 กราฟแสดงการไตเตรทพอริน *Vh*ChiP ด้วยน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส

A. กราฟ non-linear และ B. กราฟ linear หรือ double reciprocal plot ของค่าต่าง ๆ ในรูป A ข้อมูล BLM จากการวัดที่ความต่างศักย์ -100 mV

เมื่อทำการผันกลับค่า average conductance และค่าความเข้มข้นของน้ำตาลจะได้กราฟเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 3.5B ซึ่งกราฟนี้เป็น linear transformation ของกราฟรูปที่ 3.5A เราสามารถหาค่าคงที่สมดุลของการจับ (K) กันระหว่างน้ำตาลและช่องพอรินได้โดยตรงจากจุดตัดบนแกน x โดยค่า K ของโปรตีนกลายพันธุ์และโปรตีนดั้งเดิมแสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1.เปรียบเทียบค่าจลนพลศาสตร์การแพร่ของน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส ผ่านช่องพอรินกลายพันธุ์กับค่าของพอรินดั้งเดิม

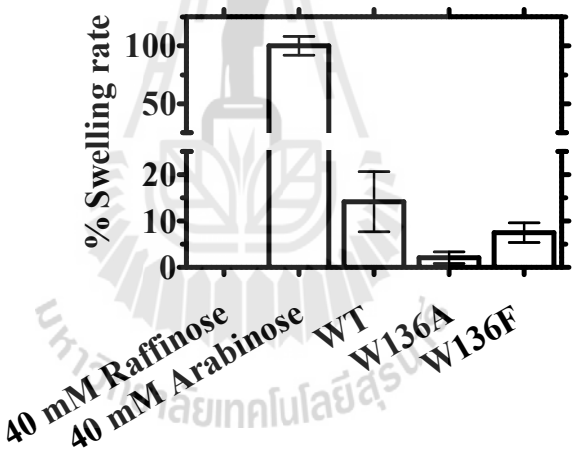
	ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการจับ					
*Vh*ChiP variant	+100 mV			-100 mV		
	k_{on} .10^6 (M^{-1}. s^{-1})	k_{off} .10^3 (s^{-1})	*K* (M^{-1})	k_{on} .10^6 (M^{-1}. s^{-1})	k_{off} .10^3 (s^{-1})	*K* (M^{-1})
wt	55	0.25	220,000	105	0.15	700,000
W136A	500	5	100,000	500	3.12	160,000
W136F	544	1.7	320,000	142	0.43	330,000

จากตารางที่ 3.1 พบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับ (K) พบว่ามีค่าลดลงทั้งข้อมูลที่ได้จากการวัดที่ความต่างศักย์ +100 mV และ -100 mV เมื่อพิจารณาที่ค่าความต่างศักย์ -100 mV โดยค่าคงที่การจับของพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136A และ *Vh*ChiPW136F ลดลงจากเดิมคือ 700,000 M^{-1} เป็น 160,000 M^{-1} และ 330,000 M^{-1} ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้รับจากการวัดที่ความต่างศักย์ +100 mV ก็คล้ายคลึงกันแต่ผลกระทบของการกลายพันธุ์แต่ไม่ชัดเจนเท่ากับการวัดที่ -100 mV เมื่อพิจารณาค่า on-rate constant (k_{on}) พบว่าค่าของ *Vh*ChiPW136A เพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่าส่วนของ *Vh*ChiPW136F เพิ่มเพียง 1.4 เท่า ส่วนค่า off-rate constant (k_{off}) ของ *Vh*ChiPW136A เพิ่มขึ้น 21 เท่า และของ *Vh*ChiPW136F เพิ่มขึ้น 2.9 เท่า การที่ค่า k_{on} และ k_{off} เพิ่มขึ้นหมายถึงจำนวนโมเลกุลของน้ำตาลเข้าสู่ช่องเพิ่มขึ้น (k_{on} เพิ่ม) แต่จับกับ affinity sites ภายในช่องได้ไม่ดีจึง

หลุดออกจากช่องได้ง่ายขึ้น (k_{off} เพิ่ม) เนื่องจากค่า $K = k_{on}/k_{off}$ ผลของการเปลี่ยนแปลงค่า K ในเชิงลบจึงเกิดจากปัจจัยหลักคือการเปลี่ยนค่า off-rate constant ผลการวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์บ่งบอกถึงความชอบในการจับลดลงนั่นเอง โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp136 เป็น Ala มีผลกระทบต่อความชอบในการจับมากกว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp136 เป็น Phe

3.5. อัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลโมโนแซคคาร์ไรด์และโอลิโกแซคคาร์ไรด์

การทดลองต่อมาคือการตรวจหาอัตราการแพร่ผ่านหรือ permeation rate ของน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส ผ่านช่องพอรินกลายพันธุ์โดยเทคนิค liposome swelling assay เทียบกับพอรินดั้งเดิม กราฟที่แสดงในรูปที่ 3.6 เป็นอัตราการแพร่ผ่านช่องพอรินในลักษณะ bulk permeation โดยเกิดการแทรกตัวของพอรินในเยื่อเมมเบรนหลายชั้นหรือ multilamella liposome เรียกไลโปโซมที่มีพอรินแทรกอยู่ว่า proteoliposome ในการทดลองนี้หาค่าอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลชนิดต่างๆ เทียบกับอัตราการแพร่ผ่านของ D-arabinose ที่ให้ค่าเป็น 100% เนื่องจากน้ำตาลนี้มีขนาดโมเลกุลเดี่ยวมีขนาดเล็กที่สุดจึงมีอัตราการแพร่ผ่านสูงสุดเสมอ ส่วนอัตราการแพร่ของน้ำตาล D-raffinose (MW 504 ดาลตัน) มีค่าเป็นศูนย์แสดงถึงน้ำตาลชนิดนี้ไม่ใช่สับสเตรทของช่องพอรินจำเพาะนี้



รูปที่ 3.6 แสดงอัตราการแพร่ของน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส ผ่าน proteo-liposome ของพอริน *VhChiP* เปรียบเทียบอัตราการแพร่ผ่าน proteoliposome ที่เตรียมจากพอรินกลายพันธุ์เทียบกับพอรินดั้งเดิม โดยให้อัตราการแพร่ของ arabinose ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวขนาดเล็กมากเป็น 100%

จากรูปที่ 3.6 จะเห็นว่าค่าอัตราการแพร่ของน้ำตาล ไคโตเฮกซะโอส ผ่านช่องพอริน *Vh*ChiPW136A และ *Vh*ChiPW136F มีค่าลดลงจากอัตราการแพร่ผ่านช่องพอริน *Vh*ChiPWT โดยสังเกตุค่าที่ลดลงในพอริน *Vh*ChiPW136A มากกว่าพอริน *Vh*ChiPW136F ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าจลนพลศาสตร์ที่แสดงในตารางที่ 3.1. ผลการทดลองที่ได้รับจากการทดลองนี้ยืนยันว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp136 ไปลดค่าอัตราการแพร่ของน้ำตาลไคโตเฮกซะโอส ผ่านช่องพอริน *Vh*ChiP

บทที่ 4
บทสรุป

4.1.สรุปผลการทดลอง

ช่องพอริน *Vh*ChiP ที่สกัดจากเยื่อเมมเบรนด้านนอกของแบคทีเรียในทะเล *Vibrio harveyi* มีคุณสมบัติเป็นช่องจำเพาะต่อน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ โดยมีความสามารถในการนำน้ำตาลไคโตเฮกซะโอสได้ดีที่สุด ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp136 ที่บริเวณผิวส่วนบนของช่อง *Vh*ChiP การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค BLM และ liposome swelling assay พบว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp136 เป็น Ala (ช่องพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136A) และ Phe (ช่องพอรินกลายพันธุ์ *Vh*ChiPW136F) ไปลดความสามารถในการนำอิออนและการจับของน้ำตาลไคโตเฮกซะโอสของช่อง *Vh*ChiP pore ผลการทดลองที่ได้รับจากงานวิจัยให้ข้อมูลว่ากรดอะมิโน Trp136 มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการนำอิออนและการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ผ่านช่องพอริน

4.2.ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

1. Bassler BL, Yu C, Lee YC, Roseman S. Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. J Biol Chem. 1991 . 266:24276-24286.
2. Danelon, C., Brando, T., and Winterhalter, M. (2003) Probing the orientation of reconstituted maltoporin channels at the single-protein level. J. Biol. Chem. 278:35542-35551
3. Eijsink VG, Vaaje-Kolstad G, Vårum KM, Horn SJ. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. Trends Biotechnol. 2008, 26:228-235.
4. Hjerde E, Lorentzen MS, Holden MT, Seeger K, Paulsen S, Bason N, Churcher C, Harris D, Norbertczak H, Quail MA, Sanders S, Thurston S, Parkhill J, Willassen NP, Thomson NR. The genome sequence of the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* strain LFI1238 shows extensive evidence of gene decay. BMC Genomics. 2008.19:9:616-.
5. Keyhani NO, Roseman S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. Biochim Biophys Acta. 1999. 1473:108-122. Review.
6. Keyhani NO, Li XB, Roseman S. Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification and molecular cloning of a chitoporin. J Biol Chem. 2000. 275:33068-33076.
7. Kullman, L., Winterhalter, M., and Bezrukov, S. M. (2002) Transport of maltodextrins through maltoporin: a single-channel study. Biophys. J. 82:803-812.
8. Meibom KL, Li XB, Nielsen AT, Wu CY, Roseman S, Schoolnik GK. The Vibrio cholerae chitin utilization program. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004. 101:2524-25249.
9. Rezaei F, Richard TL, Brennan RA, Logan BE. Substrate-enhanced microbial fuel cells for improved remote power generation from sediment-based systems. Environ. Sci. Technol. 2007. 41:4053–4058.
10. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC, Suginta W. Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: implications for the catalytic mechanism. J Struct Biol. 2008. 162:491-499.
11. Suginta W, Robertson PA, Austin B, Fry SC, Fothergill-Gilmore LA. Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chiA from *Vibrio carchariae*. J Appl Microbiol. 2000. 89:76-84.
12. Suginta W, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J, Fothergill-Gilmore LA. An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. Arch Biochem Biophys. 2004. 424:171-180.
13. Suginta W, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J, Prinz H. Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from Vibrio carchariae, as revealed by HPLC-MS. FEBS J. 2005. 272:3376-3386.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

14. Suginta W, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R, Svasti J. Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of Vibrio carchariae chitinase A. Biochim Biophys Acta. 2007. 1770:1151-1160.
15. Suginta W, Pantoom S, Prinz H. Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. J Chem Biol. 2009. 2:191-202.
16. Suginta W, Chuenark D, Mizuhara M, Fukamizo T. Novel β-N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification. BMC Biochem. 2010. 29;11:40.
17. Suginta, W., Chumjan, W., Mahendran, K. R., Janning, P., Schulte, A., and Winterhalter, M. (2013) Molecular uptake of chitooligosaccharides through chitoporin from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. PLoS One. 8:e55126.
18. Suginta W, Chumjan W, Mahendran KR, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Chitoporin from *Vibrio harveyi*: A Channel with Exceptional Sugar Specificity. Under review by J Biol Chem.
19. Yu C, Lee AM, Bassler BL, Roseman S. Chitin utilization by marine bacteria. A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. J Biol Chem. 1991. 266:24260-24267.
20. Zobell CE, Rittenberg SC. The occurrence and characteristics of chitinoclastic bacteria in the sea. J Bacteriol. 1938, 35:275-287.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก
ผลงานตีพิมพ์และการเผยแพร่

1. ผลงานตีพิพม์ในวารสารนานาชาติ 1 ผลงาน

- W Chumjan, M Winterhalter, A Schulte, R Benz, and **W Suginta*.** (2015) Chitoporin from the Marine Bacterium *Vibrio harveyi*: Probing the Essential Roles of Trp136 at the Surface of the Constriction Zone. **R**evised manuscript submitted to **J Biol Chem**.

2. ผลงานนำเสนอในรูปบรรยายหรือโปสเตอร์ในที่ประชุมระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 2 ผลงาน
   - Chumjan W, Schulte A, Weingart H, Benz R, Winterhalter M. **Suginta W*.** Chitoporin from *Vibrio harveyi* 650: Gene isolation, recombinant expression and molecular translocation of chitin oligosaccharides. The 6th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, Aug30-Sept2, 2011, p75. **An outstanding award for poster presentation**.

   - Chumjan W, Schulte A, Weingart H, Benz R, Winterhalter M**. Suginta W***. Chitoporin (ChiP) from *Vibrio harveyi* 650. Commision on Higher Education Congress IV Universty Staff Development Consortium (CHE-USDC Congress). The Zign Hotel, Pattaya, Chonburi. Sept 14-16, 2011. P113. Poster presentation.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข
ประวัตินักวิจัย

Name (ไทย) วิภา สุจินต์

(English) Wipa Suginta

Affiliation (ไทย) กลุ่มวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า สาขาวิชาเคมีและชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา 30000

(English) School of Biochemistry, Institute of Science,
Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand
Tel: +66 44 22 6187; E-mail wipa@sut.ac.th

Degree Ph.D. (Biochemistry), The University of Edinburgh, UK

M.Sc. (Biochemistry), Mahidol University, Bangkok, Thailand

B.Sc. (Genetics), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Current Position Associate Professor in Biochemistry

ปี พ.ศ.	รางวัล	จากหน่วยงาน
2014	รางวัลโล่เกียรติคุณโล่ประกาศเกียรติคุณสำหรับพนักงานผู้มีผลงานดีเด่นที่ได้รับรางวัลจากหน่วยงานภายนอก	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2014	รางวัลนักชีวเคมีและนักชีววิทยาโมเลกุลดีเด่น (Professor. M.R. Jisnuson Svasti BMB Award"	สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
2013	รางวัล "TRF-CHE-Scopus Researcher Award" สาขา Life Sciences and Agricultural Sciences	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ) และสำนักพิมพ์ Elsevier
2009-2012	รางวัลทุนวิจัย "Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers"	The Alexander von Humboldt Foundation, Bonn, Germany
2010	รางวัลพนักงานดีเด่นประจำปี 2553 สาขา "การวิจัย"	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2006	รางวัลผู้มีผลงานดีเด่นทางด้านวิทยาศาสตร์ เนื่องในงานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ ประจำปี 2006	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2005	รางวัลทุนวิจัย"For Women in Science Fellowship"	L'OREAL (Thailand)/UNESCO

Research Interest

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

List of Published Articles

1. Meekrathok P, Bürger M, Porfetye AT, Vetter IR, **Suginta W*.** (2015) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a GH20 β-N-acetylglucosaminidase from the marine bacterium Vibrio harveyi. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. 71:427-433.
2. Ranok A, Wongsantichon J, Robinson RC, **Suginta W*** (2015) Structural and thermodynamic insights into chitooligosaccharide binding to human cartilage chitinase 3-Like Protein 2 (CHI3L2 or YKL-39). **J Biol Chem**, 290:2617-2629.
3. Theanponkrang S, **Suginta W**, Weingart H, Winterhalter M, Schulte A* (2015) Robotic voltammetry with carbon nanotube-based sensors: A superb blend for convenient high-quality antimicrobial trace analysis. **Int J Nanomedicine,** 10:859-868.
4. Chaocharoen W, **Suginta W**, Ranok A, Limbut W, Numnuam A, Khunkaewla P, Kanatharana P, Thavarungkul P, Schulte A***** (2015) Electrochemical immunosensing of human YKL-40, a mammalian chitinase-like protein and disease marker. **Bioelectrochem.** 101:106-113.
5. Chotinantakul K, **Suginta W*,** Schulte Albert* (2014) An Advanced amperometric respiration assay for antibiotic susceptibility testing. **Anal Chem**. 86:10315-10322.
6. Sirimontree P, **Suginta W*,** Sritho N, Kanda Y, Shinya S, Ohnuma T, and Fukamzo T*. (2014) Mutation strategies for obtaining chitooligosaccharides with longer chains by transglycosylation reaction of a family GH18 chitinase. **Biosci Biotech Biochem**. 78:2014-2021.
7. Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M, **Suginta W*.** (2014) *VhChiP* porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of the ultraresistant melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei*. **PLoS One.** 9:e95918.
8. Ranok A, Khunkaewla P, **Suginta W*** (2013) Human cartilage chitinase 3-like protein 2: Cloning, expression, production of polyclonal and monoclonal antibodies for osteoarthritis detection and identification of potential binding partners. **Monoclon Antib Immunodiagn Immunother (formerly Hybridoma)**. 32, 317-325.
9. **Suginta W**, Smith MF* (2013) Single-molecule trapping dynamics of sugar-uptake channels in marine bacteria. **Phys Rev Lett.** 110, 238102.

10. **Suginta W**, Khunkaewla P, Schulte A* (2013) Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. **Chem Rev.** 113, 5458-5479.

11. **Suginta W***, Chumjan W, Mahendran KR, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Chitoporin from *Vibrio harveyi*: A Channel with Exceptional Sugar Specificity. **J Biol Chem.** 288, 11038-11046.

12. **Suginta W***, Chumjan W, Mahendran KR, Janning P, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Molecular uptake of chitooligosaccharides through chitoporin from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. **PLoS One.** 8:e55126.

13. **Suginta W***, Sritho N. (2012) Multiple roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by *Vibrio harveyi* chitinase A. **Biosci Biotech Biochem.** 76, 2275-2281.

14. Sritho N & **Suginta W*** (2012) Role of Trp-435 of *Vibrio harveyi* chitinase A in chitin utilization. **App Biochem Biotech.** 166, 1362–1202.

15. Pantoom S, Vetter I*, Prinz, H*, **Suginta W*** (2011) Potent family-18 chitinase inhibitors: X-ray structures, affinities and binding mechanisms. **J Biol Chem.** 286, 24312-24323.

16. **Suginta W*,** Mahendran KR, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M, Weingart H*. (2011) Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin *VhChiP* from an ultraresistant *Burkholderia pseudomallei* strain. **BBA-Biomembr.** 1808, 1552-1559.

17. **Suginta W***, Chuenark D, Masuhara M, Fukamizo T (2010) Novel β-N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification. **BMC Biochem.** 11:40. (Highly accessed)

18. 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.** 230, 101-111.

19. **Suginta W***, Pantoom S, Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. **J Chem Biol**. 2, 191-202.

20. 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.

21. 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-Biochem.** 9:2.

22. **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.

23. **Suginta W*** (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. **Enzyme Microb Tech.** 41, 212-220.

24. 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.

25. **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.

26. 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.

27. **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.

28. 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.

29. **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.

30. **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.

31. 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.

32. 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.

33. **Suginta W**, Svasti MRJ* (1995) Purification and Properties of β-Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. **Science Asia (Formerly J Sci Soc Thai)** 21, 183-186.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

34. **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.

35. 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. **Science Asia (Formerly J Sci Soc Thai)** 21, 293-303.

หมายเหตุ ***Corresponding author**

Oral/Poster Presentations on International Meetings in the last five years -more than 90 abstracts were accepted.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี