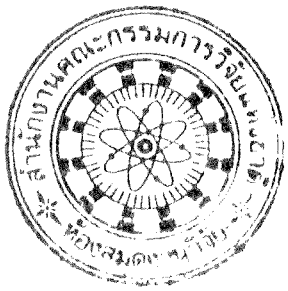
บทที่ 2
วิธีการวิจัย



2.1 ลำดับกรดอะมิโนและท่อนทรานสเมมเบรนของ NaChBac-VSD

การศึกษานี้เลือกโซเดียมแชนแนลชนิดรับรู้ศักย์ไฟฟ้าจาก *Bacillus halodurans* (NaChBac) เป็นตัวอย่าง เพราะพิจารณาจากความซับซ้อนและความเป็นไปได้ในการศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการ และเป็นโปรตีนตัวเลือกหลักของกลุ่มโซเดียมแชนแนลที่นักวิจัยมักใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงาน NaChbac เป็นโปรตีนฮอมอเตตระเมอร์ (homotetramer) โดยแต่ละมอนอเมอร์ประกอบด้วยท่อนทรานสเมมเบรนจำนวน 6 ท่อน คือ S1, S2, S3, S4, S5 และ S6 โดยได้เลือกศึกษาบริเวณ S1-S4 ซึ่งเป็นโดเมนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าของ NaChbac

ลำดับกรดอะมิโนของ NaChbac สามารถโหลดได้จากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) การระบุโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า (S1-S4) และส่วนท่อน ทรานสเมมเบรนของ NaChbac อาศัยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับโพแทสเซียมแชนแนล KvAP และ Kv1.2-2.1 ด้วยวิธี sequence alignment การวิเคราะห์ hydropathy และจากรายงานเกี่ยวกับ NaChBac ที่ผ่านมา

2.2 ที่มาของข้อมูลที่ได้จากงานด้านการทดลอง

กระบวนการเตรียมโปรตีน ทำให้บริสุทธิ์และการติดสปินให้กับโปรตีนดำเนินตามวิธีที่เคยมีรายงานไว้แล้ว[14] การเตรียมโปรตีน NaChBac บริเวณ VSD (ครอบคลุมกรดอะมิโนลำดับที่ Q17-S145) โดยการแสดงออกใน E.Coli SG-13 cells โปรตีนถูกแยกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาทรอกราฟีโดยใช้ decylmaltoside เป็น stationary phase การติดสปินโดยเติม methanethiosulfonate แล้วโปรตีนที่ติดสปินจะผ่านกระบวนการ refolding ในลิพิดผสมระหว่าง POPC:POPG

ในกระบวนการการติดสปิน โปรตีนตัวอย่าง 1 ชนิดจะถูกติดสปินได้เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น กล่าวคือ โปรตีนตัวอย่าง NaChBac จะถูกแต่งพันธุกรรมให้เป็นโปรตีนมิวแตนท์โดยแทนที่ด้วยซิสเทอีน ในการทดลองนี้ คณะผู้วิจัยเตรียมกลุ่มโปรตีนมิวแตนท์ เช่น Q17C, K18C, I19C จนถึง S145C และสามารถติดสปินให้กับโปรตีนได้เป็นผลสำเร็จเป็นจำนวนทั้งหมด 118 ตำแหน่ง หรือใช้มิวแตนท์จำนวนทั้งหมด 118 มิวแตนท์ การวิเคราะห์และตรวจสอบโปรตีนใช้วิธีทางสเปกโตรสโคปี light scattering และ fluorescence resonance energy transfer

การบันทึกสเปกตรัมอีพีอาร์ของโปรตีนตัวอย่างใช้ Bruker EMX spectrometer ที่ติดอุปกรณ์ loop-gap resonator กำหนดความถี่ X-band continuous wave ช่วงไมโครเวฟโดยใช้ 2 mW incident power ในการหาค่า accessibility มีการเติม paramagnetic relaxing agents โดยเติมสารละลายเชิงซ้อนของ nickel(II) ethylenediamine diacetate (NiEDDA) หรือก๊าซออกซิเจนลงในหลอดบรรจุโปรตีนตัวอย่าง และใช้เทคนิค power saturation สเปกตรัมที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาค่า mobility (ΔH_0^{-1}) , NiEDDA accessibility (ΠNiEDDA) และ O_2 accessibility (ΠO_2) งานด้านการทดลองข้างต้นดำเนินโดย Prof. Eduardo Perozo และคณะนักวิจัยที่มหาวิทยาลัยชิคาโก

2.3 งานด้านการคำนวณและจำลองโมเดลเชิงโครงสร้าง

การคำนวณอาศัยวิธี PaDSAR ในกระบวนการสร้างโมเดลด้วยวิธี PaDSAR ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

2.3.1 สร้างและวิเคราะห์กราฟของข้อมูลค่า mobility, O_2 และ NiEDDA accessibility บริเวณ VSD ของ NaChBac แล้วทำการ

ก. ระบุว่ากรดอะมิโนใดในลำดับเป็นส่วนหนึ่งของ S1, S2, S3 และ S4 โดยใช้ผลการทดลองในข้อ 2.1

ข. ระบุชนิดของ pseudospin ได้แก่ buried (EP1), water (EP2) และ lipid-exposed (EP3) และ interfacial (EP4) residues โดยอาศัยผลการวิเคราะห์ ΔH_0^{-1}, ΠNiEDDA, ΠO_2 ของ NaChBac-VSD จำนวน 118 มิวแตนท์

2.3.2 สร้างโครงสร้างเริ่มต้นโดย ใช้โครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของ Voltage-sensor domain ของ KvAP (PDB: 1ORS) และ Kv1.2/2.1 (PDB: 2R9R) เป็นแม่แบบเพื่อสร้าง NaChBac-VSD ด้วยวิธี homology modeling และ sequence alignment และทดลองปรับโครงสร้างเกลียวอัลฟาของ S1-S4 ให้ใกล้เคียงหรือสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในข้อ 2.3.1 และผลของ sequence alignment และโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของ KvAP และ Kv1.2/2.1 ให้มากที่สุด

2.3.3 Structure refinement ด้วยวิธี PaDSAR (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นการจำลองระบบเพื่อทำการปรับโครงสร้างที่ได้ในข้อ 2.3.2 การคำนวณใช้เทคนิคการจำลองทางพลวัติเชิงโมเลกุล ระเบียบวิธีของการคำนวณในขั้นนี้มีรายละเอียดดังนี้: สร้างระบบเพื่อทำการจำลองด้วยวิธีพลวัติเชิงโมเลกุล ระบบประกอบด้วยอะตอมของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของ NaChBac (โครงสร้างที่ได้ในข้อ 2.3.2) และชุด pseudoatom ที่แทนโมเลกุล O_2, NiEDDA และ nitroxide spin label ที่ติดไว้ที่กรดอะมิโนต่างๆ ของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า และประเภทของ pseudoatom ที่แทน nitroxide

spin label เป็นไปตามสมบัติ buried, water และ lipid-exposed residue ซึ่งกำหนดไว้ตามข้อ 2.3.1ข การปรับโครงสร้างอาศัยฟังก์ชันพลังงานศักย์ที่พัฒนาขึ้น เป็นปัจจัยควบคุมอันตรกิริยาระหว่าง pseudoatom ต่างๆ ในระบบ ข้อมูลผลการคำนวณที่สนใจในขั้นนี้ คือ โครงสร้างของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าที่ถูกปรับตามข้อมูล mobility, O_2 และ NiEDDA accessibility

2.3.4 ตรวจวิเคราะห์โครงสร้างที่คำนวณได้และทำการปรับปรุงแก้ไข เลือกโครงสร้างที่สอดคล้องกับค่า O_2 และ NiEDDA accessibility มากที่สุดโดยใช้เทคนิคการเทียบสีสเปกตรัมกับ molecular surface หากโครงสร้างที่ได้ยังไม่เป็นที่พอใจ จะย้อนกลับไปทำขั้นตอน 2.3.2 ใหม่

2.3.5 นำโครงสร้าง Voltage-sensor domain ที่ได้ในข้อ 2.3.4 ไปทดสอบความน่าเชื่อถือของโมเดล เกณฑ์สำคัญในการพิจารณาความน่าเชื่อถือ คือโมเดลสามารถแสดงพันธะไฮโดรเจนที่สำคัญระหว่าง R119 และ D60 และโมเลกุลน้ำสามารถสอดแทรกเข้าไปในโดเมนนี้ได้หรือไม่ วิธีการทดสอบมีดังนี้ : สร้างระบบจำลองเพื่อคำนวณพลวัติของโมเลกุลหรือ Molecular Dynamics Simulations (MD) ระบบจำลองนี้จะประกอบด้วย โปรตีน ฟอสโฟไลปิด น้ำโซเดียมไอออน และคลอไรด์ไอออน ดำเนินการจำลองทางพลวัติที่อุณหภูมิ 300K เก็บข้อมูลทราเจคทอรี (trajectory) เมื่อระบบเข้าสู่สมดุล (สมบัติของระบบคงที่หรือเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เช่น ความดันปริมาตร อุณหภูมิ พลังงานจลน์ พลังงานศักย์ พลังงานรวม RMSD) เพื่อวิเคราะห์ ดำเนินการจำลองทางพลวัติเป็นเวลา 20 ns

งานด้านการคำนวณและสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างบริเวณ NaChBac-VSD ดำเนินโดยผู้วิจัยหลักของโครงการฯ ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยใช้โปรแกรม CHARMm version 32a2 ในการคำนวณด้วยวิธี MD simulation และวิธี PaDSAR โดยประมวลผลบนเครื่องคอมพิวเตอร์สมรรถนะสูง (ปักษา) ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์ (Computational Chemistry Unit Cell) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และใช้โปรแกรม VMD, Pymol, Rasmol, Discovery studio ในการวิเคราะห์ผล ข้อมูล MD และแสดงภาพโมเลกุลโดยปฏิบัติบนเครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล