บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การเตรียมโปรตีนจากเยื่อเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* (ATCC 23343) และ *B. thailandensis* (ATCC 700388) ในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C พร้อมเขย่า ทำการปั่นเก็บเซลล์แบคทีเรียที่เจริญเติบโตที่ระยะด้วยความเร็ว 10 000 x g ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}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 แล้วปั่นตกตะกอนซ้ำอีกครั้งหนึ่งที่ความเร็ว 10 000 x g เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์และส่วนของเซลล์ที่ไม่แตกหักออกไป นำส่วนใสที่ได้มาปั่นซ้ำอีกรอบที่ความเร็ว 12 000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนของเหลวที่ได้จากการปั่นครั้งที่สองประกอบด้วยเยื่อเซลล์ ซึ่งนำมาละลายใน 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 0.5% SDS ต่อจากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}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 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการปั่นแยกอีกครั้งที่ความเร็ว 12 000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนใสที่ได้คือส่วนของโปรตีนที่เกาะอยู่ที่เพปทิโดไกลแคนที่ละลาย (solubilized peptidoglycan-associated proteins) ที่จะนำมาศึกษาต่อไป

2.2. การศึกษาการอัตราการผ่านของน้ำตาลเข้าช่องพอรินโดยเทคนิค Proteoliposome swelling assay

ทำการเตรียมโปรติโอลิโปโซม ตามวิธีที่ได้รายงานไว้สำหรับพอรินอื่น (Gotoh *et al.*,1994; Yushimura et al., 1983) โดยทำการผสม 2.4 μmole phosphatidylcholine กับ 0.2 μmole diacetylphosphate ในสารละลายคลอโรฟอร์ม แล้วทำให้แห้งด้วยการปั่นใน vacuum หลังจากนั้นทำการละลายฟอตโฟลิปิดที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ด้วยน้ำปริมาตร 0.2 ml ก่อนการเติม 50 μg ของโปรตีน Omp38 ที่สกัดจากเชื้อ *B. pseudomallei* และเชื้อ *B. thailandensis* ต่อจากนั้นทำการ sonicate เป็นเวลา 7 นาทีในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ^{o}C แล้วทำให้ฟอตโฟลิปิดที่มีโปรตีนฝังอยู่ให้แห้งอีกครั้งหนึ่งใน vacuo หลังจากนั้นเติม 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 15% (w/v) Dextran T-40 ปริมาตร 0.2 ml ส่วนที่ได้คือ โปรติโอลิโปโซม ซึ่งนำมาเจือจากด้วยการเติมสารละลายน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุล 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} ที่สังเกตุได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับอัตราการแพร่ของน้ำตาลผ่านช่องพอริน

2.3. การผลิตแอนติบอดีและการทดสอบทางอิมมูโนวิทยา

นำโปรตีน BpsOmp38 และ BthOmp38 บริสุทธิ์ปริมาณ 2 μg มาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE ที่ประกอบด้วย 12% อะคริลาไมด์และ 8M urea โดยระบบของ Laemmli (Laemmli, 1970) แล้ว ย้อมโปรตีนด้วยสี Coommassie 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 มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ทริบซิน (Bio-Active Co., Ltd, Bangkok, Thailand) เก็บส่วนใสที่มีเพปไทด์หลุดออกมาก่อนขั้นตอนการสกัด 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 acetronitrile 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* ชิ้น PCR ที่ได้นำมาโคลนเข้าใน pGEM-T cloning vector และเรียกโคลนที่ได้ว่า pGEM-T-*Bps*Omp38 และ pGEMT-*Bth*Omp38 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(+)-*Bps*Omp38 และ pET-23d(+)-*Bth*Omp38 ทำการตรวจสอบชิ้นดีเอนเอที่ได้ด้วยการทำ PCR โดยใช้คู่ primer ข้างบน แล้วจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และ *E. coli* BL21 (Origami) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป

2.6. การเตรียม inclusion bodies จากโปรตีน Omp38 ที่ผลิตจาก *E. coli* 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 ^{o}C แล้วถ่ายเชื้อลงใน 500 ml LB/amp ทำการเลี้ยงเชื้อต่อ จนค่า OD_{600} ~0.6 แล้วเติม isopropyl-β-*D*-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.4 mM เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็วในการปั่น 10,000 x g เป็นเวลา 30 นาที แล้วละลายส่วน cell pellet ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 1mM EDTA และ 100 mM NaCl (TEN buffer) ด้วยอัตราส่วน 3 ml ของ TEN buffer ต่อเซลล์ 1 กรัม หลังจากนั้นเติม 1 mM PMSF และ lysozyme (2 mg/ml) ลงไปแล้วทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีแรงสั่นสะเทือนแบบใช้เสียงด้วยเครื่อง Sonopuls Ultrasonic homogeniser ที่มีหัว probe ขนาด 6 mm ติดอยู่ หลังจากนั้นทำการปั่นแยกเศษเซลล์ออกจากส่วนใสด้วยการปั่นที่ความเร็ว 20 000 x g ที่ 4 ^{o}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 ตะกอนในขั้นตอนนี้เป็นส่วน 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 A_{280} และวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ด้วย SDS/PAGE ทำการส่วนที่ถูกชะที่มีโปรตีนขนาด 38 kDa เข้าด้วยกันแล้วตกตะกอนโปรตีนข้ามคืนด้วย 50% (v/v) ethanol ที่ -20 ^{o}C แล้วปั่นเก็บตะกอนโปรตีนที่ 20 000 g 20 นาที นำ

ตะกอนมาละลายด้วย 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 × 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 ภายใต้สภาวะที่ไม่ต้มหลังจากนั้นรวมโปรตีนแล้วทำให้เข้มข้นที่ปริมาตร 1 ml ในถุง dialysis ด้วย PEG 20000 ในขณะเดียวกันก็ทำการแลกเปลี่ยนบัฟเฟอร์ด้วยวิธี 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 ผสมสารละลายโปรตีนปริมารตร 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 ในแต่ละตัวอย่างของค่าการวัดเป็นผลเฉลี่ยของการ scan อย่างน้อย 3 ครั้ง ค่า baseline ของ spectra ของโปรตีนดั้งเดิมได้จากสารละลายบัพเฟอร์คือ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ส่วน baseline ของ spectra ของโปรตีนที่ unfold คือสารละลาย 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

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

โดยที่ค่า [θ] คือค่า MRE ในหน่วย $deg.cm^2/dmole$ ค่า n เป็นจำนวนกรดอะมิโนในสายโพลีเพปไทด์และค่า m° คือค่า ellipticity ที่วัดได้ ส่วนค่า l คือเส้นทางเดินแสงในหน่วยเซนติเมตร

2.11. การศึกษาผลของ anti-*Bps*Omp38 polyclonal antibodies ต่อการนำเข้าน้ำตาลของช่องพอริน Bps/BthOmp38

ทำการเจือจาง anti-*Bps*Omp38 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