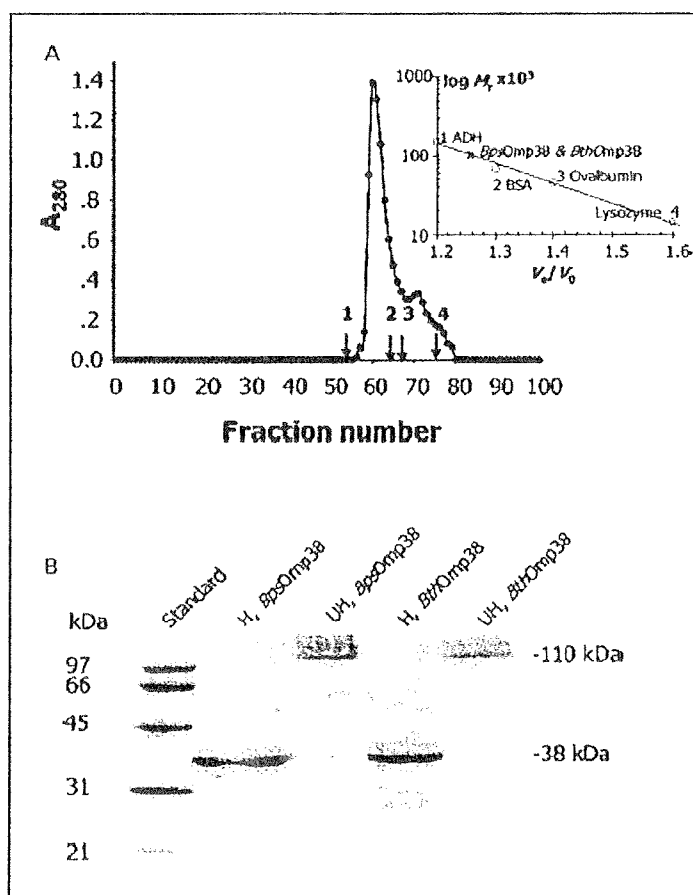


บทที่ 3

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* ด้วยวิธีที่ได้อธิบายในส่วนของการทดลอง 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 จากกราฟมาตรฐานพบว่ามีค่าเท่ากับ 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

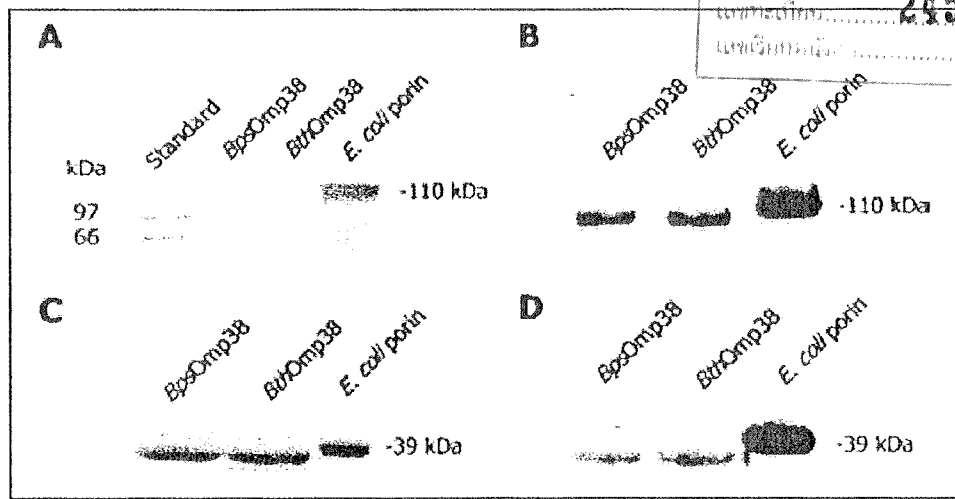
เมื่อนำ fraction ที่มีโปรตีนที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephacryl S200®HR ไปวิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างที่ต้มที่ 95 °C ก่อนการวิเคราะห์จะอยู่ที่ 38 kDa ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างที่ไม่ได้ต้มอยู่ที่ 110 kDa ดังแสดงในรูปที่ 3.1B ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า outer membrane protein ที่เตรียมได้น่าจะมีลักษณะเป็น trimeric protein ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่เท่า ๆ กันคือ 38 kDa ผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับการศึกษาในพอรินชนิดอื่น ๆ เช่น *E. coli* OmpF (Cowan et al., 1992) ที่พบว่าโปรตีน OmpF จะทนต่อการเสียสภาพด้วย 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

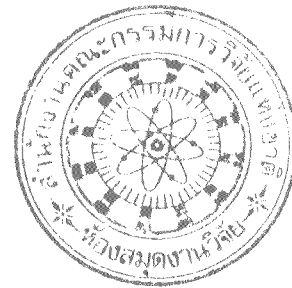
3.2. การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค western blot analysis

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)

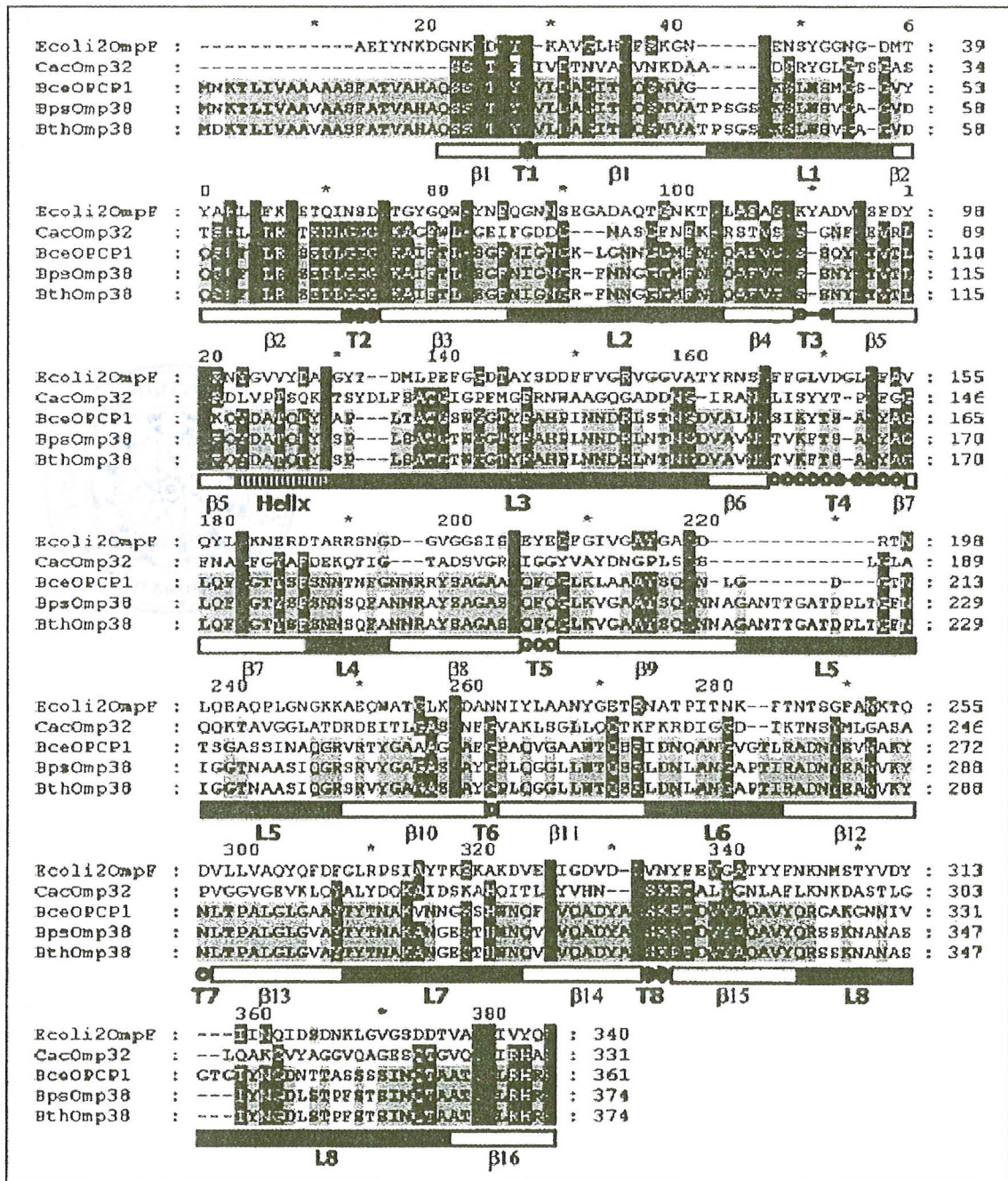
- (A) SDS-PAGE แสดงตำแหน่งของ trimeric Omp38 ที่ 110 kDa
- (B) Immunoblot ของ trimeric Omp38
- (C) SDS-PAGE แสดงตำแหน่งของ monomeric Omp38 ที่ 38 kDa
- (D) Immunoblot ของ monomeric Omp38



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, AIFTLES GFNIGNGR, และ NANASIYNGDLSTPFSTSINQTAATVGLR ที่ตรงกับเปปไทด์ของพอริน OpcP1 ของเชื้อ *B. cepacia* จึงใช้ยีนของ OpcP1 มาทำ blast search พบว่าตรงกับ open reading frame หนึ่งใน 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 แล้วส่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองโดยการทำ 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% แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับ

ของกรดอะมิโนพบว่าโปรตีนทั้งสองมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกันเกือบ 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

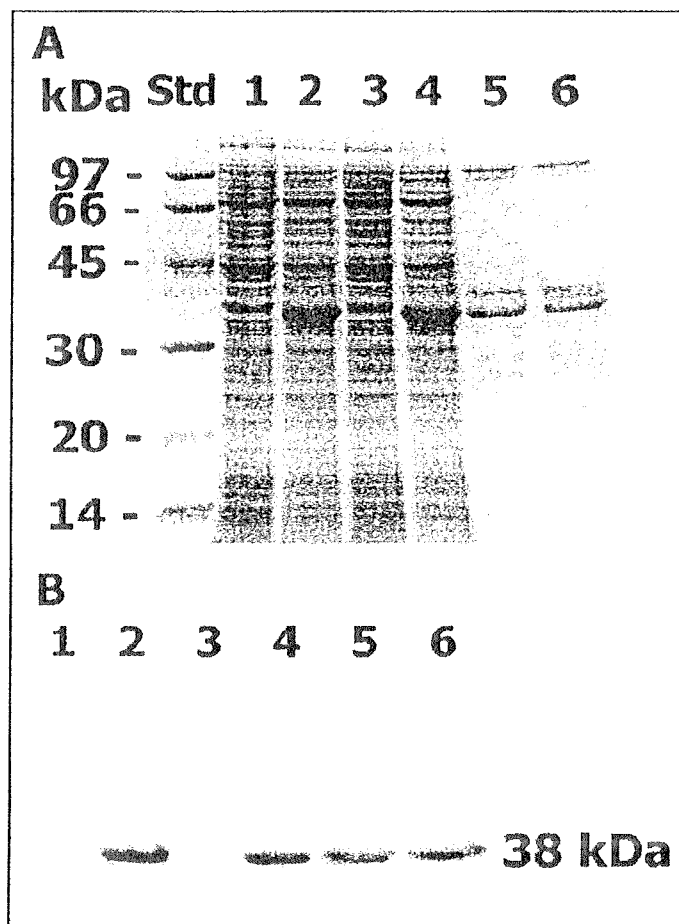


รูปที่ 3.3 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ Bps/Bth Omp38 กับพอรินของแบคทีเรียอื่น ๆ (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004a)

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*

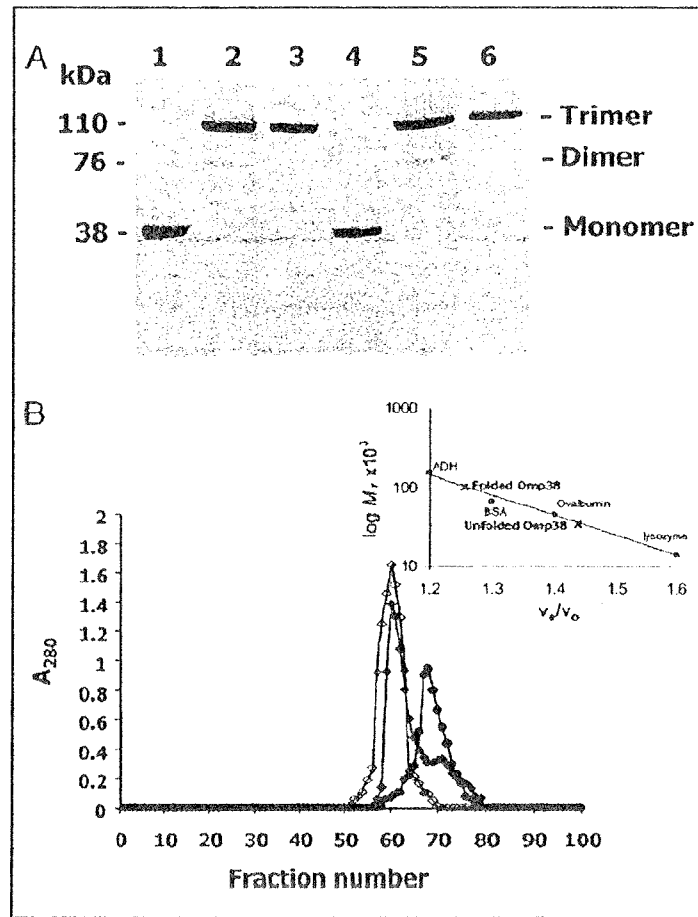
เมื่อโคลนยีน Bps/Bth Omp38 เข้าไปในพลาสมิด pET23d(+) ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดคือ pET23d(+)-BpsOmp38 และ pET23d(+)-BthOmp38 ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* Origami(DE3) หลังจากได้เลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมิดที่มียีน Omp38 อยู่จนถึงระยะ log phase ($OD_{600} \sim 0.6$) ทำการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน 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 แล้วผ่านส่วนใสลงในคอลัมน์ที่มีคุณสมบัติเป็น 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 CaCl_2 , 10 mM EDTA และ 0.02% NaN_3) ในปริมาตร 1:1 แล้วตั้งสารละลายโปรตีนใน 10% Zwittergent ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเฝ้าหวนการ 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 โปรตีน

โมโนเมอร์ 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 พบว่าโปรตีนสามารถจับรูปไตรเมอร์หลังจากผ่านคอลัมน์ 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. การยืนยันการผลิตภัณฑ์โปรตีน Omp38 โดยวิธี MALDI-TOF MS

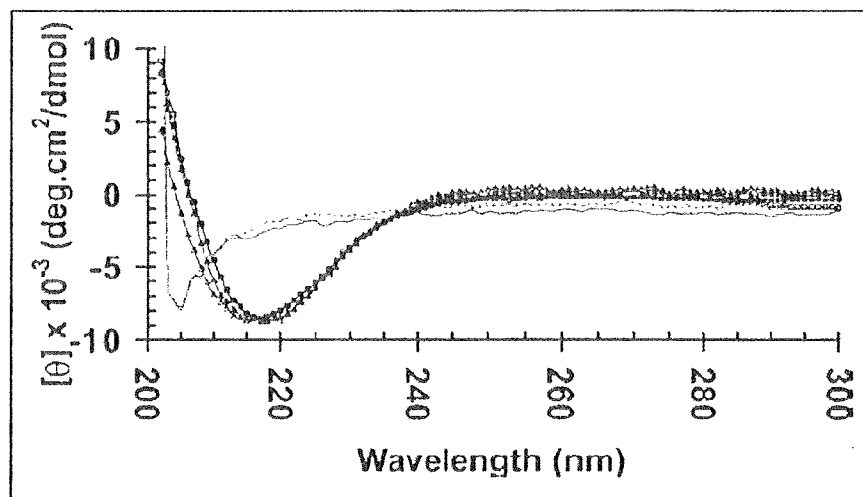
ในการตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ผู้วิจัยได้ตัดแถบโปรตีนขนาด 38 kDa แล้วทำการย่อยในแผ่น SDS-PAGE gel ด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้วสกัดเอาเปปไทด์ออกมาวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF แล้ว submit ค่า m/z ของเปปไทด์ที่ได้ทั้งหมดใน Swizz-Prot database และ nucleotide database พบว่ามีเปปไทด์ทั้งหมด 7 เปปไทด์ที่ให้ค่า 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>AIETLESGENIGNGR</u>	FNNGGGMFNR
		<u>QAEVGLSSNYGTVTLGR</u>
		QYDA
P4		
TQDYLSPLSATGGGTYFAHPLNNDRLNTNGDVAVNNTVK	<u>ETSANYAGLQEGGT</u>	
P5		
<u>YSESNN</u>	<u>SQFANNR</u>	AYSAGASYQFQGLKYGAAYSQANNAGANTTGATDPLTGF
		P6
NIGAASIQGRSR	<u>VYGAGASYAYG</u>	<u>PLQGGLLWTQSRLDNL</u>
		ANGAPTI
P7		
ADNYEANVKYNLTPALGLGVAYTYTNAKANGESTH	<u>RTDYYAQA</u>	<u>VYQ</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 มีโครงรูปไตรเมอร์ที่สร้างช่องพอรินได้หลังจากทำ 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)



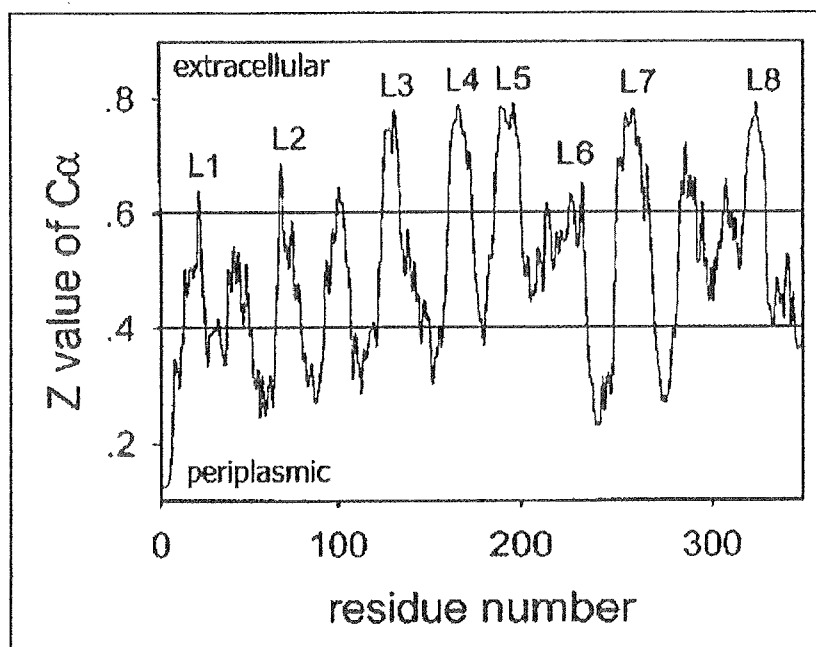
รูปที่ 3.7 CD spectra ของรีคอมบิแนนท์ Bps/Bth Omp38 (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004b)

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

3.7. การทำนาย transmembrane domains และการทำนายโครงสร้างสามมิติ

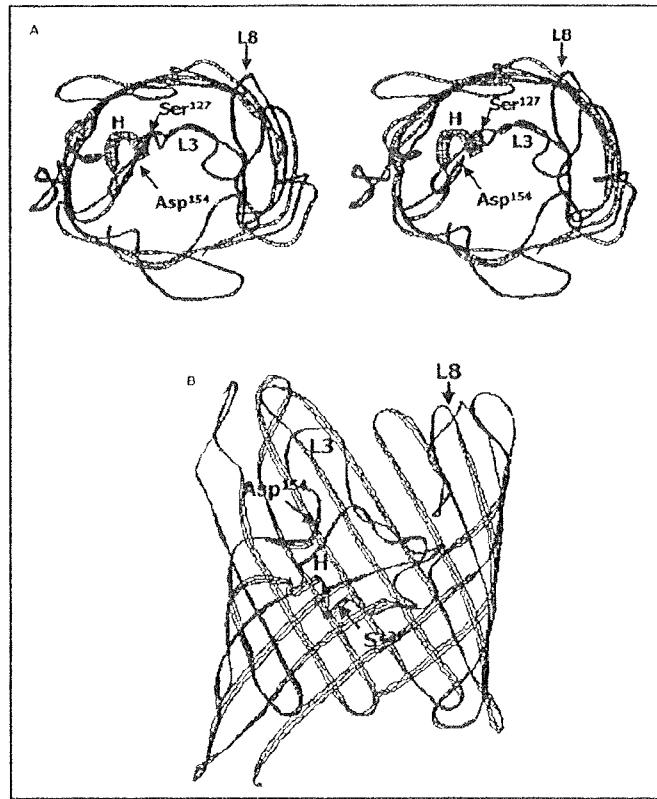
งานวิจัยต่อมาคือการทำนายโครงสร้างของ transmembrane domain ของโปรตีน Bps/Bth Omp38 ตามวิธีของ Diederichs (Diederichs et al., 1998) รูปที่ 3.8 เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Z value ของ C_{α} ในช่วง 0-1 กับ residue number ในสายโพลีเพปไทด์ของโปรตีน Bps/Bth Omp38 ค่า Z value จะแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนในเยื่อหุ้มสองชั้นของ 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)

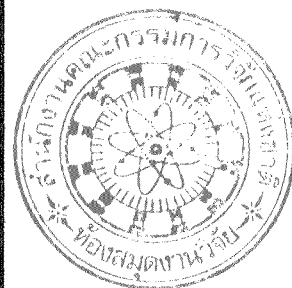
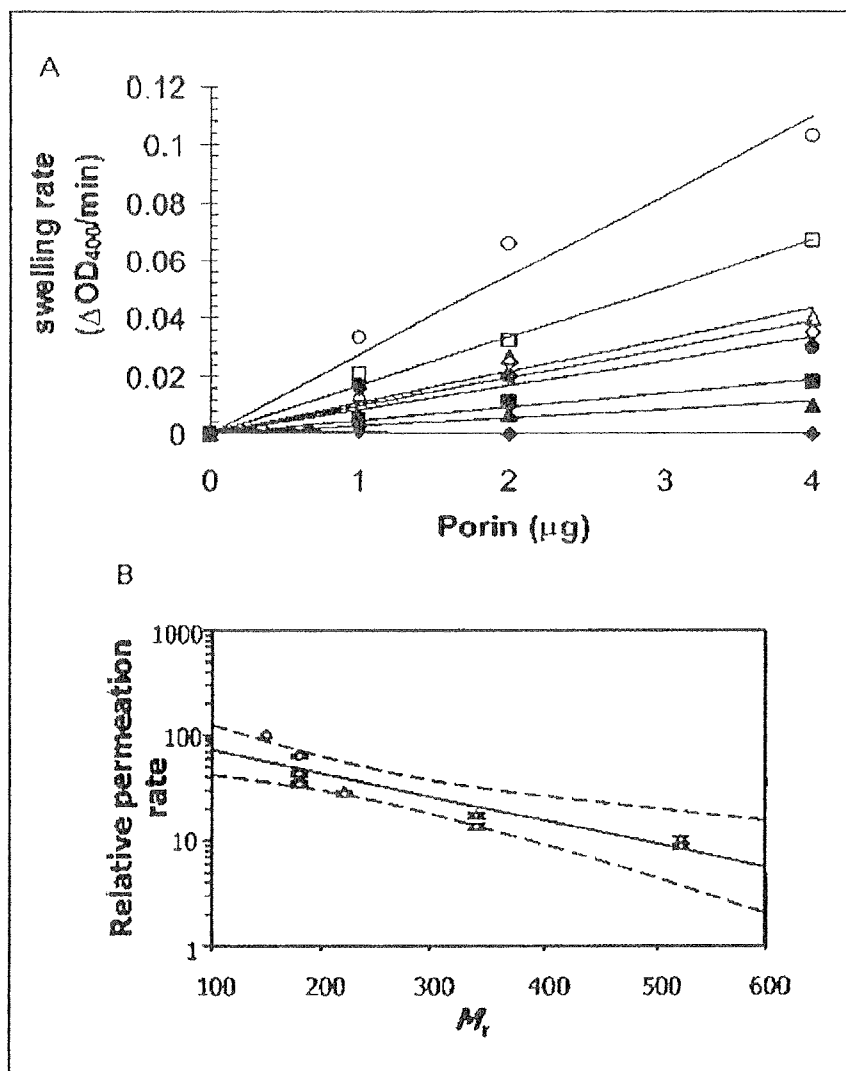


รูปที่ 3.9 การทำนายโครงสร้างสามมิติของ Bps/Bth Omp38 (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004a) โครงสร้างสามมิตินำมาโดยโปรแกรม แสดงโครงสร้างสามมิติ 123D+ และ Swiss-Model และแสดงโครงสร้างด้วยโปรแกรม Swiss-pdb Viewer version 3.7b2 โดยใช้โครงสร้างของ Omp32 จากเชื้อ *C. acidovorans* เป็นโครงสร้างต้นแบบ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

3.8. การวัดการนำสารผ่านเข้า-ออกผ่านช่องพอริน Omp38 ด้วยวิธี liposome swelling assay

นำโปรตีน *BpsOmp38* และ *BthOmp38* ที่ทำการ refold ด้วย Zwittergent[®] 3-14 มา reconstitute เข้าไปในโปรติโอลิโปโซม เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างช่องพอรินของโปรตีนที่เตรียมได้ใหม่ ๆ หลักการคือถ้าโปรตีนสร้างช่องพอรินจะทำให้เกิดการนำสารผ่านเข้าช่องและส่งผลให้ลิโปโซมบวมขึ้น ซึ่งสามารถวัดอัตราการบวมได้จากค่าการกระเจาแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm (OD_{400}) ที่ลดลงแปรผันตามอัตราการแพร่ของสารผ่านช่องพอริน การทดลองใช้น้ำตาล *L-arabinose* ที่เป็นน้ำตาลขนาดเล็กที่สุดที่ใช้ในการทดสอบมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 150 kDa พบว่าโปรตีนไตรเมอร์สามารถสร้างช่องพอรินได้โดยให้ค่าอัตราการบวมของลิโปโซมของน้ำตาล *L-arabinose* สูงที่สุดดังแสดงในรูปที่ 3.10A ส่วนอัตราการบวมอันเกิดจากน้ำตาลชนิดอื่น ๆ จะลดลงลงตามน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลจากน้อยไปมากดังนี้ $D\text{-glucose} \cong D\text{-mannose} \cong D\text{-galactose}$ (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 จึงทำนายว่าช่องพอรินจะเป็นช่องเลือกผ่านที่ให้สารที่มีขนาดน้อยกว่า 650 kDa แพร่ผ่านได้เท่านั้น กราฟแสดงอัตราการแพร่และแสดงในรูปที่ 3.10B



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

3.9. การศึกษาการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะผ่านช่องพอริน Omp38

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

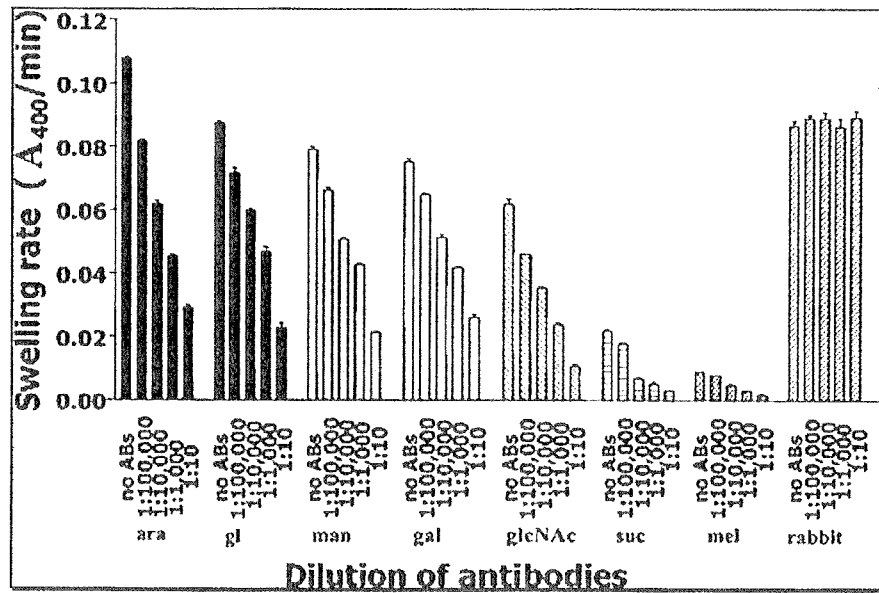
อัตราแพร่ผ่านจะลดลงตามขนาดของยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นดังนี้ meropenem (383 kDa) > ciprofloxacin (421 kDa) > clindamycin (505 kDa) > cefepime (572 kDa) > ceftazidime (637 kDa) ส่วนอัตราการแพร่ผ่านของ gentamicin และ amikacin มีค่าเท่ากับศูนย์เนื่องจากทั้งสองตัวมีขนาดใหญ่โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 709 kDa และ 782 kDa ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลนี้มีขนาดใหญ่กว่าขนาดของช่องพอรินที่ได้ทำนายไว้มาก ซึ่งผลการทดลองที่ได้รับอาจช่วยอธิบายความสามารถในการคัดต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยห้าชนิด 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

ทดลองส่วนสุดท้ายคือการศึกษาค้นคว้าผลของแอนติบอดีต่ออัตราการแพร่ผ่านของสารผ่านช่องพอริน Bps/Bth Omp 38 โดยเทคนิค liposome swelling assay หลังจากได้ทำการบ่มโปรตีนไครโมเมอร์กับ 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 polyclonal antibodies ต่ออัตราการแพร่ของสารผ่านช่องพอริน Bps/Bth Omp38 (แหล่งที่มา: Siritapetawee et al., Biochem J, 2004b)

ผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามที่คาดไว้คืออัตราการแพร่ของน้ำตาลที่ใช้ทดสอบทุกชนิด ได้แก่ L-arabinose, D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-GlcNAc, D-sucrose และ D-melizitol ลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับช่องพอรินส่งผลทำให้คุณสมบัติการสร้างช่องพอรินเปลี่ยนไป