บทที่ 4
บทสรุป

4.1. สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดโปรตีนจาก crude peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่เยื่อเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* และ *B. thailandensis* เนื่องจากโปรตีนมีขนาด 38 kDa ใน SDS-PAGE gel จึงกำหนดชื่อของโปรตีนทั้งสองว่า *Bps*Omp38 และ *Bth*Omp38 ตามลำดับ งานวิจัยต่อมาได้ทำการผลิต anti-Omp38 polyclonal antibodies การทำ immunoblotting พบว่าแอนติบอดีสามารถ cross react กับโปรตีน Bps/Bth Omp38 ได้ดี แต่โปรตีนไม่ cross react กับ preimmune serum แสดงว่าแอนติบอดีที่สร้างมีความจำเพาะต่อโปรตีนทั้งสอง การทดสอบทางกายภาพพบว่าโปรตีน Omp38 มีคุณสมบัติทนต่อ SDS แต่ไวต่อความร้อนที่ 95 °C ขึ้นไป การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยโครมาโตกราฟฟีแบบ gel filtration chromatography พบว่ารูปที่ทำงานของโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 110 kDa ซึ่งเป็นรูปไตรเมอร์ที่ประกอบด้วยสามหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ขนาด 38 kDa การทำ peptide mass fingerprinting ดยเทคนิค MALDI–TOF MS และ ESI/MS พบว่าโปรตีน Omp38 ทั้งสองมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับพอริน OpcP1 ของเชื้อ *B. cepacia* มากที่สุด ได้นำข้อมูลที่ได้จากโครงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของ *B. pseudomallei* มาทำการตรวจหายีนที่ถอดระหัสให้ BpsOmp38 และ BthOmp38 และทำการเพิ่มจำนวนของยีนด้วยเทคนิค PCR การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองพบว่ามีความเหมือนกัน 98% และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 99.7% การทำนาย transmembrane domain โดยวิธีของ Didedrichs และโครงสร้างสามมิติพบว่าโปรตีนมีโครงสร้างเป็นแบบ β-barrel ประกอบด้วยสายบีต้า 16 สาย มี external loop ทั้งหมด 8 เส้น และมี perimplasmic turn ทั้งหมด 8 turn ส่วนของ Loop3 มีความยาวมากที่สุดและตำแหน่งของ loop นี้ในช่องพอรินน่าจะทำหน้าที่กำหนดขนาดของสารที่ผ่านเข้าช่องพอริน งานวิจัยขั้นต่อไปคือการโคลนยีน BpsOmp38 และยีน BthOmp38 เข้าไปในพลาสมิด pGEM-T และทำการ subclone ชิ้นของยีนที่ไม่มี signal peptide เข้าสู่พลาสมิด pET23d (+) และทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ Omp38 ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ Origami (DE3) ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Bps/Bth Omp38 พบว่า *E. coli* ผลิตโปรตีนขนาด 38 kDa ในปริมาณมากเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.4 mM IPTG แต่โปรตีนที่ผลิตออกมาอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำมีลักษณะเป็น inclusion bodies จึงได้ทำบริสุทธิ์ inclusion bodies แล้วละลายโปรตีนในสารละลายบัพเฟอร์ที่มี 8M urea พบว่าโปรตีนละลายได้สมบูรณ์ จึงทำการ refold ด้วย detergent ต่าง ๆ การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ตรวจพบโปรตีนโมโนเมอร์ขนาด 38 kDa ที่ถูก refold ในสารละลายบัพเฟอร์ที่มี 10% (w/v) Zwittergent®3-14 มีการเคลื่อนตำแหน่งไปอยู่ที่ 110 kDa ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตีนไตรเมอร์ และเมื่อต้มโปรตีนเป็นเวลา 5 นาทีที่ 95 °C พบว่าโปรตีนมีการ fold เป็นรูปไตรเมอร์อย่างสมบูรณ์ การวิเคราะห์ด้วย CD spectroscopy พบว่าโปรตีน ไตรเมอร์ 110 kDa มีองค์ประกอบของ β-sheet เป็นหลักซึ่งเป็นโครงสร้างที่เหมือนกับโปรตีน Omp38 ที่สกัดจาก *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ส่วนโปรตีนโมโนเมอร์ที่เสียสภาพจะให้ CD spectrum เป็นแบบ random coil การิเคราะห์ทางอิมมูโนโลยีโดย anti-*Bps*Omp38 polyclonal antibodies และการทำ peptide mass analysis ด้วย MALDI–TOF MS ยืนยันว่าโปรตีนที่ถูกผลิตโดย *E. coli* เป็น *Bps*Omp38 และ *Bth*Omp38 การศึกษาหน้าที่ของช่องพอรินโดยเทคนิค liposome swelling assay พบว่า

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวขนาดเล็กมีอัตราการแพร่ผ่านแปรผันโดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของสาร ดังนี้คือ *D*-glucose ≅ *D*-mannose ≅ *D*-galactose (180 kDa) > *N*-acetylglucosamine (221 kDa) > *D*-sucrose (342 kDa) > *D*-melezitose (522 kDa) > stachyose (667 kDa) ผลการทดลองเรื่องการแพร่ผ่านทำให้ทำนายคุณสมบัติของช่องพอริน Omp38 ว่าเป็นช่องเลือกผ่านที่ยอมให้สารขนาดไม่เกิด 650 kDa ผ่านเข้าออกด้วยกระบวนการแพร่ ในทำนองเดียวกันอัตราการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะผ่านช่องพอรินก็แปรผันตามน้ำหนักโมเลกุลของยาปฏิชีวนะนั้น โดยอัตราการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะที่น้อยกว่า 10% คือ ยา clindamycin ยา cefepime ยา ceftazidime ยา gentamicin และยา amikacin เนื่องยาทั้งหมดนี้มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่เกิน 600 kDa และอาจอธิบายกลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย *B. pseudomallei* ต่อยาที่ใช้ทดสอบดังกล่าว การทดลองสุดท้ายคือการศึกษาผลของแอนติบอดีพบว่า anti-*Bps*Omp38 antibodies มีผลต่อการยับยั้งการผ่านของน้ำตาลโมเลกุลเล็กทุกชนิดเข้าช่อง Omp38 ผลการทดลองทั้งหมดให้ข้อสรุปว่าโปรตีน BpsOmp38 และ BthOmp38 มีคุณสมบัติเป็นพอรินที่อาจมีส่วนกำหนดกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis*

4.2. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี