บทคัดย่อ

245770

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดโปรตีนที่เยื่อเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* และ *B. thailandensis* พบว่าโปรตีนทั้งสองตัวคือ *Bps*Omp38 และ *Bth*Omp38 มีความสัมพันธ์กันในแง่อิมมูโนโลยี มีคุณสมบัติทนต่อ SDS ไวต่อความร้อน มีน้ำหนักโมเลกุลในรูปไตรเมอร์เป็น 110 kDa และน้ำหนักโมเลกุลในรูปโมโนเมอร์เป็น 38 kDa การทำ peptide mass fingerprinting โดยเทคนิค MALDI–TOF MS และ ESI/MS พบว่าโปรตีน Omp38 มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับพอริน OpcP1 ของเชื้อ *B. cepacia* มากที่สุด ได้นำข้อมูลโครงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากจีโนมของ *B. pseudomallei* มาใช้ในการตรวจหายีนที่ถอดระหัสให้ BpsOmp38 และ BthOmp38 และทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองพบว่ามีความเหมือนกัน 98% และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 99.7% การทำนาย transmembrane domain และโครงสร้างสามมิติพบว่าโปรตีนประกอบด้วยสายบีต้า 16 สาย มาประกอบเป็นโครงสร้าง β-barrel ต่อมาทำการโคลนยีน BpsOmp38 และยีน BthOmp38 เข้าไปในพลาสมิด pET23d(+) และทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ Omp38 ในเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ Origami (DE3) พบว่าโปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* มีขนาด 38 kDa อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำในลักษณะ inclusion bodies จึงได้ทำบริสุทธิ์ inclusion bodies แล้วนำโปรตีนมาละลายใน 8M urea และทำการทดลอง refolding การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบโปรตีนโมโนเมอร์ขนาด 38 kDa สามารถเกิดการ refold ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 10% (w/v) Zwittergent®3-14 รูปที่ refold มีการเคลื่อนตำแหน่งบน DSD-PAGE gel ไปอยู่ที่ 110 kDa การวิเคราะห์ด้วย CD spectroscopy พบว่าโปรตีน 110 kDa มีองค์ประกอบของ β-sheet เป็นหลักเหมือนกับโปรตีน Omp38 ดั้งเดิมที่สกัดจาก *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* การิเคราะห์ทางอิมมูโนโลยีโดยใช้ anti-*Bps*Omp38 polyclonal antibodies และการทำ peptide mass analysis ด้วย MALDI–TOF MS ยืนยันว่าโปรตีนที่ถูกผลิตโดย *E. coli* เป็น *Bps*Omp38 และ *Bth*Omp38 การศึกษาหน้าที่พบว่า anti-*Bps*Omp38 antibodies มีผลต่อการยับยั้งอัตราแพร่ผ่านของน้ำตาลโมเลกุลเล็กเข้าสู่ช่อง Omp38 ที่ได้ทำการ reconstitute เข้าไปในลิโปโซม และอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลโมเลกุลเล็กและยาปฏิชีวนะมีกราฟแปรผันโดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของสารซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน Omp38 มีคุณสมบัติเป็นช่องแพร่ผ่านพอริน

ABSTRACT

245770

This study describes isolation of the outer membrane protein from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis. The isolated proteins, namely Bps*Omp38 and *Bth*Omp38, were found to be immunologically related, SDS-resistant, heat-sensitive trimers with the molecular weight of approx. 110 kDa. The monomeric proteins were found to be 38 kDa. Peptide mass fingerprinting by MALDI–TOF MS and ESI/MS showed that both Omp38 proteins had most sequence similarities to the OpcP1 porin from *B. cepacia*. Based on information from the *B. pseudomallei* genome-sequencing project, the genes encoding BpsOmp38 and BthOmp38 were subsequently identified and amplified by PCR technique. The nucleotide sequences of both genes were found to be 98% identical with the predicted amino acid sequences being 99.7% identical. Transmembrane domains and 3D-structure predictions suggested that this newly-isolated porin is a 16-stranded β-barrel. The genes encoded BpsOmp38 and BthOmp38 were further cloned into pET23d (+) expression vector, and then expressed in *Escherichia coli* host strain Origami (DE3). The 38 kDa proteins, expressed as insoluble inclusion bodies, were purified, solubilized in 8 M urea, and then subjected to refolding experiments. As analysed by SDS/PAGE, the 38 kDa band completely migrated to 110 kDa when the purified monomeric proteins were refolded in a buffer system containing 10% (w/v) Zwittergent®3-14. CD spectroscopy revealed that the 110 kDa proteins contained a predominant β-sheet structure, which corresponded completely to the structure of the native Omp38 isolated from *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*. Immunoblot analysis using anti-*Bps*Omp38 polyclonal antibodies and peptide mass analysis by MALDI–TOF MS confirmed that the *E. coli* expressed proteins were *Bps*Omp38 and *Bth*Omp38. Functional studies showed the considerable inhibitory effects of the anti-*Bps*Omp38 antibodies on the permeation of small sugars through the Omp38-reconstituted liposomes. A linear relation between relative permeability rates and the molecular weight of small sugars and antibiotics suggested strongly that the Omp38 functioned fully as a diffusion porin.