



รายงานการวิจัย

การศึกษาหน้าที่ของกรดอะมิโนที่กำหนดคุณสมบัติของยาปฏิชีวนะที่ผ่านเข้าช่อง
BpsOmp ของแบคทีเรียก่อโรคmelioidosis โคชีส *Burkholderia pseudomallei*
Functional study of amino acids that determine the properties of
antibiotics to enter BpsOmp pores of Melioidosis bacterium
Burkholderia pseudomallei

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การศึกษาหน้าที่ของกรดอะมิโนที่กำหนดคุณสมบัติของยาปฏิชีวนะที่ผ่านเข้าช่อง
BpsOmp ของแบคทีเรียก่อโรคmelioidosis โคชีส *Burkholderia pseudomallei*
Functional study of amino acids that determine the properties of
antibiotics to enter BpsOmp pores of Melioidosis bacterium
Burkholderia pseudomallei

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555-2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ
ศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการ
วิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์
อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
27 เมษายน พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* (Bps) เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคมะลิออยโดซิส ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อร้ายแรงที่มีอุบัติการณ์สูงในประชากรทางภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย การรักษาโรคมะลิออยโดซิสทำได้ยากเนื่องจากแบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่สูง มีรายงานว่า การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียชนิดนี้เกิดจากช่องพอริน BpsOmp38 ที่อยู่ปริมาณมากบนเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียมีความสามารถในการรับยาได้ต่ำ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค two-fold microbiological assay แสดงให้เห็นว่าเชื้อ Bps ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบเกือบทั้งหมด ยกเว้น ceftazidime และ meropenem นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* ที่มียีนสร้างช่องพอริน BpsOmp38 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะลดลงมากกว่าเซลล์ที่ไม่มียีนพอรินหรือเซลล์ควบคุม เมื่อทำการกลายพันธุ์กรดอะมิโน Tyr119 ที่อยู่ตรงกลางช่องพอริน BpsOmp38 เป็น Ala (พอรินกลายพันธุ์ BpsOmp38Y119A) ส่งผลให้เกิดการเพิ่มความไวในการรับยาของ *E. coli* ได้ดีขึ้น ส่วนการแทนที่พอรินด้วย Phe (พอรินกลายพันธุ์ BpsOmp38Y119F) ทำให้อัตราการแพร่ผ่านยาปฏิชีวนะลดลง การตรวจวัดด้วยเทคนิค BLM แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการรับสารผ่านพอรินกลายพันธุ์ BpsOmp38Y119A ได้ดีเนื่องจากแขนงข้างของ Ala มีขนาดเล็กทำให้ช่องพอรินมีขนาดกว้างขึ้น ส่วนแขนงข้างของ Phe เป็นวงแหวนที่มีความไม่มีขั้วสูงทำให้เกิดความหนืดขึ้นภายในช่องพอรินทำให้เกิดการชะลอการแพร่ผ่าน ผลการทดลองจาก liposome swelling assays แสดงให้เห็นว่าการแพร่ผ่านของยาที่เชื้อ Bps มีความไวในการนำเข้าคือ ceftazidime and meropenem แต่ไม่มีการแพร่ผ่านของยาอื่น ๆ ที่เชื้อดื้อต่อยานั้น

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei (Bps) is a Gram-negative bacterium that causes melioidosis, an highly infectious disease with high incidence in the populations in the northern and north-eastern parts of Thailand. Successful treatment of melioidosis is difficult due to high intrinsic resistance of *Bps* to most antibacterial agents. It has been suggested that the antimicrobial resistance of this organism may result from poor permeability of the porin *BpsOmp38* channel located abundantly in the outer membrane (OM) of the bacterium. In this study, we employed two-fold microbiological assay to show that the clinical Bps strain was resistant to most antimicrobial agents and sensitive only to ceftazidime and meropenem. An *E. coli*, expressing *BpsOmp38*, exhibited considerably lower antimicrobial susceptibility than the control strain. In addition, mutation of Tyr119, the most prominent pore-lining residue in *BpsOmp38*, markedly increased drug susceptibility of the *E. coli*, substitution with Ala (mutant *BpsOmp38Y119A*), while substitution with Phe (mutant *BpsOmp38Y119F*) caused decreased membrane permeability. BLM measurements suggested that the higher permeability of *BpsOmp38Y119A* was caused by widening of the pore interior through removal of the bulky side chain. In contrast, the lower permeability of *BpsOmp38Y119F* was caused by introduction of the hydrophobic side chain (Phe), increasing the ‘greasiness’ of the pore lumen. Considerably, liposome swelling assays showed high permeability to ceftazidime and meropenem was observed, these being agents to which Bps is sensitive. No permeability of other antibiotics was observed.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่รับจากการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	13
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	21
ข้อเสนอแนะ	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	24
ภาคผนวก ข	25

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1. แผนที่โลกแสดงการระบาดของโรคเมลิออยโดซิส	1
รูปที่ 1.2. ช่องพอรินที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ	2
รูปที่ 1.3. โครงสร้างสามมิติของพอรินของ <i>E. coli</i>	3
รูปที่ 1.4. Swiss-Model ของ <i>BpsOmp38</i>	5
รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของ BLM set-up ที่ใช้ศึกษาการแพร่ผ่านของสารผ่านช่องพอริน	10
รูปที่ 2.2 องค์ประกอบของ BLM cuvette	10
รูปที่ 3.1 โครงสร้างทำนายของช่องพอริน <i>BpsOmp38</i>	14
รูปที่ 3.2. การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน <i>BpsOmp38</i> ที่ผลิตโดย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21(DE3) <i>Omp8</i>	15
รูปที่ 3.3. คุณสมบัติการสร้างช่องพอริน <i>BpsOmp38</i> ตั้งเดิมและช่องพอรินกลายพันธุ์ โดยการวัดด้วยวิธี planar lipid reconstitution technique	18
รูปที่ 3.4. แสดงอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์และน้ำตาล โอลิโกแซคคาไรด์ผ่าน proteo-liposome ของพอริน <i>BpsOmp38</i>	19
รูปที่ 3.5. แสดงอัตราการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะผ่าน proteoliposome ของพอริน <i>BpsOmp38</i>	20
รูปที่ 4.1. แสดงความเชื่อมโยงระหว่างการดื้อยาปฏิชีวนะและพอริน <i>BpsOmp38</i> ของ เชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	21

สารบัญตาราง

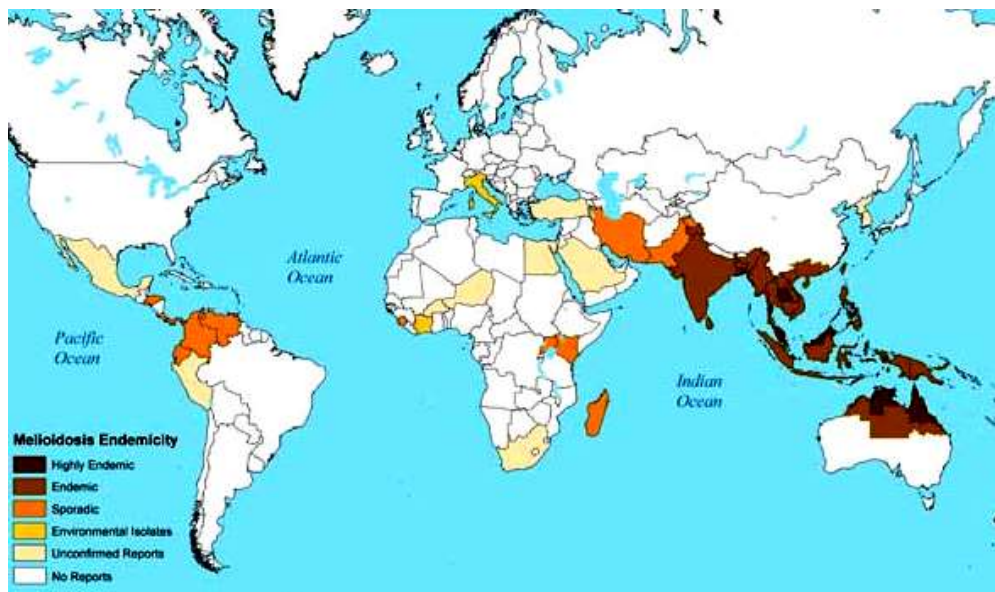
	หน้า
ตารางที่ 2.1. แสดงลำดับของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สร้างโปรตีน <i>BpsOmp38</i> กลายพันธุ์	7
ตารางที่ 3.1. ผลการทดสอบการดื้อยาของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> โดยวิธี two-fold dilution method	13
ตารางที่ 3.2. การวิเคราะห์เพปไทด์ของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี nanoLC mass spectrometry	16
ตารางที่ 3.3. ค่า MIC value ของ Omp-deficient <i>E. coli</i> ที่เหนี่ยวนำให้ผลิต <i>BpsOmp38</i>	17

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อร้ายแรงคือmelioidosis โดยเชื้อสามารถแยกเชื้อนี้ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Ashdown's agar โดย *B. pseudomallei* จะให้ลักษณะของโคโลนีมีลักษณะหยัก มีสีครีมหรือสีแทน และสามารถแยกเชื้อนี้ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Ashdown's agar โดย *B. pseudomallei* จะให้ลักษณะของโคโลนีมีลักษณะหยัก มีสีครีมหรือสีแทน ในอาหารเหลวเชื้อสามารถเคลื่อนไหวโดยใช้ส่วนที่เรียกว่าแฟลกเจลลา (flagella) และสามารถย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส มอลโตส แลคโตส แมนนิทอล และน้ำตาลโมเลกุลคู่ เซลโลไบโอส เพื่อนำไปใช้เป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ (Delost, 1997) มีรายงานเกี่ยวกับการระบาดของโรคติดเชื้อmelioidosis ทั้งในคนและสัตว์ทั่วโลกในภูมิภาคโซนร้อนครอบคลุมประเทศในแถบอเมริกากลาง และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศในกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศออสเตรเลีย (Woods et al., 1999) (รูปที่ 1.1)

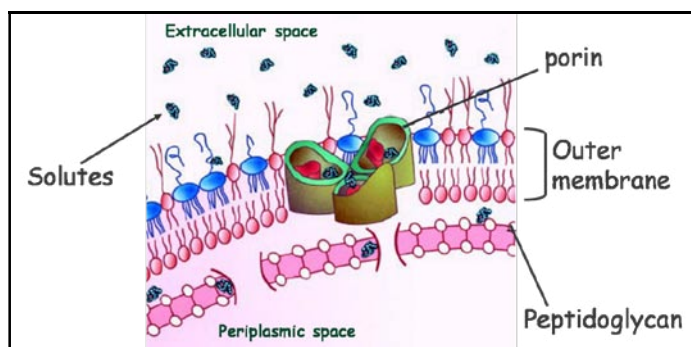


รูปที่ 1.1. แผนที่โลกแสดงการระบาดของโรคmelioidosis (แหล่งที่มา: Center for Disease Control and Prevention และ Ellis and Titball, 1999) พื้นที่สีน้ำตาลเข้มแสดงพื้นที่ที่มีการระบาดสูงสุด

การศึกษาครั้งแรกพบว่าเชือนี้ปนเปื้อนอยู่ในดินโคลนและแหล่งน้ำนิ่ง แต่สามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปในอากาศในสภาพร้อนชื้นและในช่วงหน้าฝน อาการเจ็บป่วยอันเป็นสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายลักษณะทั้งแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง (Brown and Beacham, 2000) ลักษณะอาการของโรคแบบเฉียบพลันโดยทั่วไปคือ ปอดบวม เป็นไข้ และเกิดสภาวะ leukocytosis ภายใน 2 ถึง 3 วัน หลังจากการติดเชื้อ ในกรณีผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจะเกิดอาการระบบหายใจล้มเหลว เกิดฝีหนอง บริเวณผิวหนังและอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น สมอง เยื่อหุ้มหัวใจ ตับ และกระดุก เป็นต้น ส่วนผู้ที่มีการติดเชื้อแบบ

เรื้อรังอาจมีพัฒนาการไปสู่โรคติดเชื้อหรือโรคมะเร็งปอดได้ การติดเชื้อเกิดจากการหายใจเอาเชื้อที่ปะปนมากับฝุ่นละอองที่กระจายอยู่ในอากาศหรือสัมผัสกับสิ่งของที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนอยู่ แต่การติดต่อสัมผัสโดยตรงระหว่างผู้ป่วยพบว่ามีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย ผู้ป่วยด้วยโรคนี้มีอัตราการเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูงถ้าไม่ได้เข้ารับการรักษาย่างทันท่วงที โดยหนึ่งในสามของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมีรายงานว่าเสียชีวิต

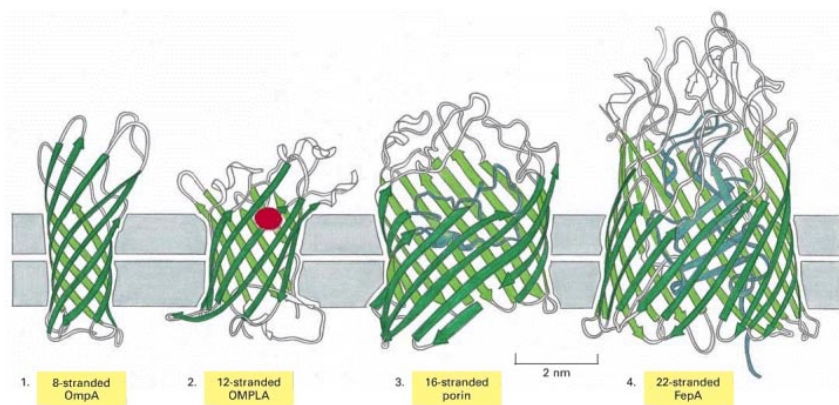
สำหรับกลไกการเกิดโรคนั้นมีการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ผลิตทอกซินบางชนิดซึ่งมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนของ macrophage การที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน macrophage เช่นเดียวกับ polynuclear phagocyte อาจเกี่ยวข้องกับการฟักตัวของเชื้อในผู้ป่วยเป็นเวลานาน ๆ ก่อนแสดงอาการ ได้มีรายงานว่าลักษณะโครงสร้างภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทต่อการทำงานเบื้องต้นของแบคทีเรีย (Gotoh et al., 1994) โดยภายในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแกรมลบจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งเรียกว่า พอริน (porin) โปรตีนนี้ทำหน้าที่นำสารต่าง ๆ เข้าหรือออกจากเซลล์เนื่องจากโปรตีนนี้มีโครงสร้างพิเศษคือทำหน้าที่เป็น ช่อง (channel) (Nakae, 1976) ดังแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2. ช่องพอรินที่ฝังในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบทำหน้าที่ในการนำสารอาหารและโมเลกุลเล็ก ๆ ผ่านเข้าเซลล์

พอรินจะฝังตัวอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) และมีคุณสมบัติให้โมเลกุลที่มีขั้วที่มีขนาดเล็กกว่า 600 ดาลตัน เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ รวมทั้งยาปฏิชีวนะหลาย ๆ กลุ่ม ผ่านอาจจะโดยขบวนการแพร่ (non-specific diffusion) หรือแบบเลือกผ่าน (selective diffusion) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของช่องพอริน นอกจากนี้ส่วนของโปรตีนที่อยู่ในชั้น peptidoglycan ยังมีส่วนร่วมในการรักษารูปร่างของเซลล์และทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะของ bacteriophage และ bacteriolysin อีกด้วย (Albert I' et al., 1995)

โปรตีนพอรินที่ได้รับการศึกษามากทั้งทางด้านโครงสร้าง หน้าที่ และยีนที่แสดงออก มีสามชนิดคือ OmpF OmpC และ PhoE ซึ่งเป็นโปรตีนจากเชื้อ *E. coli* (Rocque and McGroarty, 1990; Cowan, 1995 และ Nikaido, 1994) จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนพอรินใน *E. coli* ชนิดต่าง ๆ พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อย ๆ สามหน่วยที่เหมือนกัน โดยแต่ละหน่วยจะประกอบด้วยสายบีต้า จำนวน 8-22 สายมาจัดเรียงตัวในทิศตรงข้ามกัน โดยส่วนที่เป็น loop จะทำหน้าที่เชื่อมสายบีต้า ทำให้เกิดโครงสร้าง barrel ที่มีลักษณะเป็นช่องขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3. โครงสร้างสามมิติของพอรินของ *E. coli* (แหล่งที่มา: Molecular of the Cell, Chapter 10, 4th edition, Alberts et al., New York: Garland Science; 2002)

การศึกษาการทำงานของพอริน OmpC และ PhoE โดยเทคนิค site-directed mutagenesis ช่วยอธิบายกลไกการนำสารผ่านเข้า-ออกของสารของแบคทีเรีย *E. coli* โดยพบว่าส่วนของ restriction loop ที่ยื่นเข้าไปในช่องของพอริน มีความสำคัญในการกำหนดขนาดของโมเลกุลที่จะผ่านเข้า-ออกจาก pore (Cowan et al., 1992)

พอรินอีกชนิดหนึ่งคือ OmpG จากเชื้อ *E. coli* เช่น สามารถสร้างช่องจากหน่วยย่อยเดียว โดยทำหน้าที่ในการผ่านของน้ำตาลโมโน- ไต- และ ไตรแซคคาไรด์ (Behlau et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาโปรตีนพอรินในแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ เช่น จากเชื้อ *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas*) *aeruginosa*, *Aeromonas salmonicida*, *Chlamydia trachomatis*, *Rhodopseudomonas capsulate*, *R. spaeroides*, *Paracoccus dentrificans*, *Neisseria gonorrhoeae* และเชื้อ *Brucella* หลาย ๆ ชนิด (Hancock et al., 1979; Douglas et al., 1981; Darveau et al., 1983; Bavoil et al., 1984; Douglas et al., 1984; Flammann and Weckesser, 1984; Olesky et al., 2006; and Gotoh et al., 1989) จากการศึกษาโครงสร้างของพอรินจากแบคทีเรียหลายชนิดพบว่าพอรินมีโครงสร้างร่วมกันคือมีส่วนของสายปิตาซีท เป็นองค์ประกอบหลัก (Nikaido and Vaara, 1985)

ผลงานวิจัยหลายชิ้นให้ข้อสรุปว่าพอรินมีบทบาทสำคัญในการกำหนดพยาธิสภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคลหลายชนิด โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อโดยแบคทีเรียหลายโรคไม่ประสบความสำเร็จ ตัวอย่างการศึกษาได้แก่

1. พอริน MOMP จากเชื้อ *Chlamydia* เป็นโปรตีนขนาด 40 kDa มีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ ได้แก่ ทำให้เป็นหมัน การแท้งบุตร ตาบอด โรคปอดบวม หลอดลมอักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคหลอดเลือดอุดตัน และ Alzheimer's จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนระหว่างพอริน MOMP ของแบคทีเรียหลายชนิด ประกอบกับการทดลองทำ Epitope Mapping Studies พบว่า โปรตีนนี้มี immunogenic epitopes ในส่วนของ variable segments ที่เหนี่ยวนำการสร้าง neutralizing antibodies ที่สามารถช่วยป้องกันการติดเชื้อ *Chlamydia* ในแกะ ทำให้โมเลกุล MOMP เป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนา และวัคซีนป้องกันโรค (Wyllie et al., 1998; and 1999)

2. พอริน OpcPO ที่แยกจากเชื้อ *B. cepacia* พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อการก่อโรค cystic fibrosis เนื่องจากโปรตีนนี้มี low susceptibility ต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactam ทำให้เชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้ (Tsujiimoto et al., 1997)
3. พอริน OMF และ OMP จากการศึกษาในเชื้อแบคทีเรียสามชนิดคือ เชื้อ *B. aeruginosa* เชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* และเชื้อ *B. cepacia* โดยวิธี Tripartite Efflux Systems พบว่าโปรตีนมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการดื้อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่มโดยกลไกที่เรียกว่า Multi-resistance Mechanism
4. พอริน OM-1 และ OM-2 จากเชื้อ *B. pseudomallei* จากการการผ่านเข้าออกของสารผ่านช่องพอรินทั้งสองโดยวิธี liposome swelling assay และ antimicrobial agent susceptibility test พบว่าโปรตีน OM-1 ทำหน้าที่เป็นช่องผ่านของโมเลกุลมีขนาดเล็ก ๆ เช่น น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam aminoglycosides macrolides และ polymyxins ของเชื้อ *B. pseudomallei* (Gotoh et al., 1994)
5. พอริน OmpPst1 และ OmpPst2 จากเชื้อ *Providencia stuartii* การศึกษาโดย Tian et al (2010) พบว่าพอรินสองชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม β -lactam ของเชื้อนี้

ส่วนงานวิจัยที่ผู้วิจัยได้ดำเนินการก่อนหน้านี้คือการแยกโปรตีนพอรินสองชนิดคือ *BpsOmp38* และ *BthOmp38* ซึ่งเป็นโปรตีนผิวนอกของเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ตามลำดับ พบว่าโปรตีนในสภาพธรรมชาติมีลักษณะเป็น 3 หน่วย (M_r 110,000) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน M_r 38,000) จากข้อมูลที่ได้จากการทำ peptide mass fingerprint ทำให้สามารถแยกยีน *Omp38* จากโครโมโซมของเชื้อทั้งสองได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BpsOmp38* และ *BthOmp38* พบว่าเหมือนกัน 98% และมีลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนเหมือนกัน 99.7% (Siritapetawee et al., 2004a) นอกจากนี้ยังได้ทำการผลิตโปรตีน *Omp38* ในแบคทีเรีย *E. coli* ในรูป inclusion bodies และทำให้กลับมามีสภาพธรรมชาติโดยใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่มี 10% (w/v) Zwittergent® 3-14 (Siritapetawee et al., 2004b) จากการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิโดยเทคนิค FTIR และ CD spectroscopy พบว่าโปรตีน *Omp38* มีองค์ประกอบหลักเป็น β -sheet จากการศึกษาหน้าที่ของพอรินด้วยวิธี liposome-swelling assays พบว่าโปรตีน *Omp38* มีคุณสมบัติเป็น non-specific channel ที่มีความสามารถให้สารละลายน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุล < 650 Da ผ่านเข้าออกได้ จากการทำนายโครงสร้างของพอรินพบว่ามีโครงสร้างเป็น β -barrel ประกอบด้วย 16-stranded β -barrel 8 periplasmic turns และ 8 external loops

งานวิจัยที่ได้รับงานไปแล้วล่าสุดผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของ *BpsOmp* โดยเทคนิค planar lipid reconstitution พบว่าพอริน *BpsOmp38* สร้างช่องพอรินเดี่ยวที่ยอมให้อิออนขนาดเล็กแพร่ผ่านได้โดยให้ค่าเฉลี่ยการนำอิออนหรือค่า conductance ที่ความต่างศักย์ ± 100 mV อยู่ที่ 1.7 ± 0.3 nS ต่อจากนั้นได้ตรวจหาอัตราการผ่านเข้าช่องเดี่ยว *BpsOmp38* ของยาปฏิชีวนะ 4 กลุ่มคือ β -lactams cephalosporin cabapenem และ fluoroquinolone พบว่าค่า on-rate ของการสารปฏิชีวนะมีค่าดังนี้ norfloxacin >> ertapenem > ceftazidime > cefepime > imipenem > meropenem > penicillin G ส่วนการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อ translocation rate ของ ertapenem พบว่าค่า on-rate สูงขึ้นในลักษณะ exponential

ตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ส่วนค่า residential time หรือเวลาที่ ertapenem จับกับ affinity site ภายในช่อง *BpsOmp38* จะลดลงในทิศทางตรงข้าม(Suginta et al., under review, BBA-Biomembranes)

ส่วนการศึกษานี้เป็นงานวิจัยต่อยอดเพื่อศึกษาถึงชนิดของกรดอะมิโนที่อยู่ภายในช่องพอรินที่ทำหน้าที่จับและกำหนดอัตราการผ่านเข้าช่อง *BpsOmp38* ของยาปฏิชีวนะ โดยการศึกษาโครงสร้างสามมิติพื้นฐานพบว่ามีกรดอะมิโนอยู่สามตัวที่อาจทำหน้าที่เป็น pore-confining residues คือ Arg100 Tyr119 และ Thr134 ดังแสดงในรูปที่ 1.4 แต่กรดอะมิโน Tyr119 ที่ตำแหน่งกลางช่องน่าจะมีส่วนสำคัญในการควบคุมการแพร่ผ่านของสารผ่านช่องพอรินนี้



รูปที่ 1.4. Swiss-Model ของ *BpsOmp38* แสดงกรดอะมิโนที่ฝังอยู่ภายในช่องพอรินและอาจมีส่วนในการกำหนดคุณสมบัติการแพร่ผ่านของช่อง *BpsOmp38*

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. การทำนายโครงสร้างสามมิติของ *BpsOmp38* จาก multiple template
2. การคัดเลือกและการกลายพันธุ์กรดอะมิโนที่น่าจะมีผลต่อการนำยาปฏิชีวนะผ่านเข้าช่องพอริน *BpsOmp38*
3. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ต่อคุณสมบัติการผ่านของยาปฏิชีวนะเข้าช่องพอริน *BpsOmp38*

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยมีขอบเขตที่การศึกษาหน้าที่ของกรดอะมิโนที่อยู่ภายในช่องพอรินในการกำหนด pore-forming property และกำหนด translocation rate ของอออนและยาปฏิชีวนะในกลุ่มต่าง ๆ การกลายพันธุ์จะกระทำโดยอาศัยเทคนิค PCR-based site directed mutagenesis หลังจากนั้นทำการเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการทำบริสุทธิ์ การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ทำโดยเทคนิค planar lipid reconstitution technique และการทำ MIC assay เทียบผลกับคุณสมบัติของโปรตีนดั้งเดิม หลังจากนั้นทำการสรุปผลการทดลองเพื่อการตีพิมพ์และการเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้มี 4 ประการหลักคือ

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัย เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้ใดดำเนินงานมาก่อน จึงคาดว่าจะผลสัมฤทธิ์จากการวิจัยจะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor มากกว่า 3 ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง และการเผยแพร่ในรูปโปสเตอร์หรือการบรรยายอีก 1-2 ในที่ประชุมระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ครั้ง
2. เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นเยาว์ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมีและสาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยจัดเป็นความเชี่ยวชาญเฉพาะทางระดับสูงที่มีการถ่ายทอดค่อนข้างมากในสถาบันการศึกษาอื่น ๆ ในประเทศ
3. องค์ความรู้ที่ได้เป็นการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับแนวทางป้องกันโรคติดเชื้อร้ายแรงmelioidosis ซึ่งผลงานวิจัยที่ได้รับจะเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อหน่วยงานแพทย์ของรัฐและเอกชน และสถาบันวิจัยทางการแพทย์ระดับนานาชาติที่จะคิดค้นว่าหาทางป้องกันโรคติดเชื้อนี้

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. สถาบันวิจัยทางการแพทย์อื่น ๆ เช่น คณะแพทยศาสตร์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ของมหาวิทยาลัยทั่วประเทศ
3. หน่วยงานระดับนานาชาติ เช่น สถาบันวิจัยทางการแพทย์ระดับนานาชาติ และองค์การอนามัยโลก
4. หน่วยงาน R&D ของหน่วยงานเอกชนที่มีเป้าหมายในการผลิตยาปฏิชีวนะหรือผลิตภัณฑ์ป้องกันโรค melioidosis

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ *BpsOmp38*

ทำการกลายพันธุ์กรดอะมิโน Y119 ที่ตำแหน่งกลางช่อง *BpsOmp38* โดยเทคนิค PCR-based site-directed mutagenesis ส่วนดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้คือยีน *BpsOmp38* ที่โคลนเข้าไปใน pET23d(+) vector ไว้แล้วในการศึกษาอื่น (Suginta et al., BBA, 2011) โดยเรียก construct นี้ว่า pET23d(+)/*BpsOmp38* ส่วนคู่อลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบการกลายพันธุ์แสดงในตารางที่ 2.1.

ตารางที่ 2.1. แสดงลำดับของออลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สร้างโปรตีน *BpsOmp38* กลายพันธุ์

โปรตีนกลายพันธุ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
<i>BpsOmp38</i> Y119A	forward primer: 5'-CTGGCCGTCAGGCGACGCAACCCAAGAC-3' reverse primer: 5'-GCTTTGGGTTGCGTCGGCCTGACGGCCCCAG-3'
<i>BpsOmp38</i> Y119F	forward primer: 5'-GGGCCGTCAGTTCGACGCAACCCAAG-3' reverse primer: 5'-CTTGGGTTGCGTCGA ACT GACGGCCC-3'

หมายเหตุ นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้คือส่วนที่เปลี่ยนเพื่อสร้างกรดอะมิโนที่กลายพันธุ์

เมื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ที่ต้องการแล้วทำการกลายพันธุ์ยีนด้วยเทคนิค PCR-based site-directed mutagenesis ตามวิธี QuikChange Site-Directed Mutagenesis protocol ของ Stratagene หลังจากทำการย่อยดีเอ็นเอแม่ด้วยเอนไซม์ *DpnI* แล้วทำการ transform พลาสมิดที่มีแต่ยีนกลายพันธุ์เข้าไปในเชื้อ *E. coli* XL1-Blue หลังจากนั้นทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้โดยใช้ QuickClean II Plasmid Miniprep Kits (GenScript, Piscataway, NJ, USA) แล้วนำพลาสมิดที่มียีนกลายพันธุ์ที่ให้ชื่อว่า pET23d(+)/*BpsOmp38*Y119A และ pET23d(+)/*BpsOmp38*Y119F เข้าสู่ *E. coli* DH5 α เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ทำการสกัดพลาสมิดอีกครั้งแล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องของยีนกลายพันธุ์ทั้งสองสายดีเอ็นเอโดยวิธี automated DNA sequencing (First BASE Laboratories Sdn Bhn, Selangor Darul Ehsan, Malaysia)

2.2. การศึกษาการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์โปรตีน

นำพลาสมิด pET23d (+)/*BpsOmp38*, pET23d (+)/*BpsOmp38*Y119A, และ pET23d (+)/*BpsOmp38*Y119F เข้าสู่เซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) *Omp8* Rosetta โดยวิธี CaCl_2 เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์นี้ได้ผ่านการทำ gene knockout ทำให้ยีนพอริน LamB *OmpF* *OmpC* และ *OmpA* ในจีโนมถูกทำลาย (Prilipov et al., 1998) จึงมีความเหมาะสมในการใช้ศึกษาการผลิตของพอริน *BpsOmp38* เพราะเซลล์นี้ไม่สามารถสร้างพอรินอื่น ๆ ได้ ขั้นตอนในการศึกษาการแสดงออก การสกัดและการทำบริสุทธิ์โปรตีนดั้งเดิมและโปรตีนกลายพันธุ์มีดังนี้

- การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *BpsOmp38*
 1. ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* Omp8 (pET23/*BpsOmp38*) บนอาหารแข็ง LB agar plate ที่เติม 100 µg/mL Amp ในตู้บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
 2. เชื้อโคลนเดี่ยวลงใน 250 มิลลิลิตร ของอาหารเหลว LB/Amp ในเตรียมใน flask ขนาด 1 ลิตร ทำการเขย่าในตู้เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C
 3. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB/Amp ปริมาตร 9x350 มิลลิลิตรในเตรียมใน flask ขนาด 1 ลิตร แล้วปรับค่า OD₆₀₀ ให้เท่ากับ 0.1 ทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37°C จนเซลล์มีการเจริญเติบโตถึงช่วง mid-log phase ทำการตรวจค่า OD₆₀₀ ให้เท่ากับ 0.5-0.8
 4. เติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 mM เพื่อเหนี่ยวนำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน *BpsOmp38* ทำการเลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C
 5. ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ตั้งอุณหภูมิในการปั่นที่ 4°C
 6. เก็บเซลล์ที่ในส่วนตะกอน ไว้ที่ -20°C
- การสกัดโปรตีน *BpsOmp38* จากผนังเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (Omp8) Rosetta
 - การสลายเซลล์
 1. ทำการละลายเซลล์ด้วยอัตราส่วน 1 กรัมของน้ำหนักเซลล์เปียกต่อ 10 มิลลิลิตร ของ lysis buffer (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂)
 2. เติม 100 ไมโครลิตรของ RNase A (10 mg/mL) และ 10 ไมโครลิตรของ DNase I (10 mg/mL) ต่อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ของบัฟเฟอร์
 3. สลายเซลล์ด้วย French Press homogenizer
 4. เติม 20% (w/v) SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ 10 มิลลิลิตรของ cell suspension ที่เตรียมได้ บ่มสารละลายเซลล์ที่ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ
 5. ปั่นเก็บส่วนตะกอนที่ได้จากการปั่นด้วยความเร็วรอบ 22,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 60 นาที
 - การเตรียมการสกัดด้วย SDS
 1. ล้างตะกอนด้วย 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 เพื่อกำจัด SDS ที่หลงเหลืออยู่
 2. เติม 0.125% (v/v) octyl-POE เตรียมใน 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 สัดส่วนที่เติมคือ 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัมของตะกอน
 3. บดตะกอนด้วย Potter-Elvehjem homogenizer จนไม่เห็นก้อนตะกอนหลงเหลืออยู่
 4. บ่มสารละลายตะกอนที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ ขณะบ่ม
 5. ปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็วในการปั่น 40,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 40 นาที
 - การสกัดและการละลาย
 1. เติม 0.125% (v/v) octyl-POE เตรียมใน 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 สัดส่วนที่เติมคือ 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัมของตะกอน
 2. บดตะกอนด้วย Potter-Elvehjem homogenizer ให้ละเอียดจนไม่เห็นตะกอนหลงเหลืออยู่
 3. บ่มสารละลายตะกอนที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ ขณะบ่ม
 4. ปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็วในการปั่น 40,000 rpm ที่ 20°C เป็นเวลา 40 นาที

5. ละลายตะกอนด้วย 5% (v/v) octyl-POE ในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM phosphate, pH 7.4 ส่วนที่ละลายประกอบด้วย “BpsOmp38”

2.3. การตรวจหาความไวในการรับยาหรือ drug susceptibility

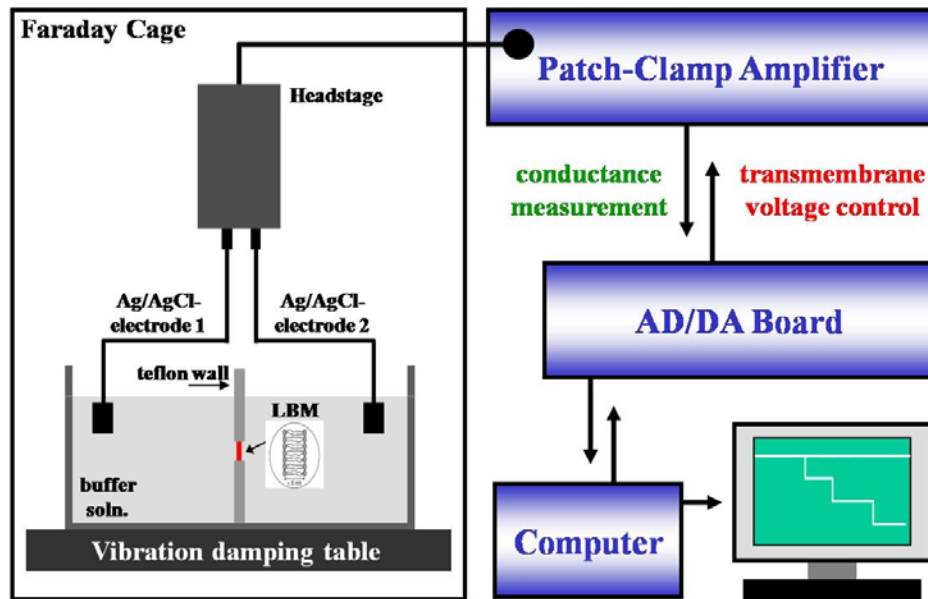
ทำการตรวจหาความไวในการรับยาของเชื้อ *E. coli* (Omp8) Rosetta strain ที่มียีน *BpsOmp38* กลายพันธุ์ โดยวิธี Two-fold microdilution method ทำการเปรียบเทียบค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) กับค่าของเชื้อ *E. coli* ที่มียีน *BpsOmp38* ดั้งเดิม โดยหาค่า MIC ของเซลล์ที่เลี้ยงในยาปฏิชีวนะ 6 กลุ่มได้แก่

- กลุ่มที่ 1 (penicillins): penicillin G และ amoxicillin
- กลุ่มที่ 2 (cephalosporins): ceftazidime, cefoxitin และ cefepime
- กลุ่มที่ 3 (carbapenems): meropenem, imipenem และ doripenem
- กลุ่มที่ 4 (fluoroquinolones): norfloxacin และ ciprofloxacin
- กลุ่มที่ 5 (quinolone carboxylic acid): enrofloxacin
- กลุ่มที่ 6 (sulfonamide-trimethoprim): co-trimoxazole

โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ 37° จนได้ค่า $OD_{600} = 0.1$ ซึ่งมีจำนวนเซลล์ระหว่าง $10^4 - 10^5$ CFU ต่อ mL หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลุมของ microtiterplate แบบ 96 หลุมที่มี LB/50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ phenylarginine- β -naphthylamide (PABN) และยาปฏิชีวนะที่ต้องการศึกษาความเข้มข้นในช่วง 0.125-2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ที่มี calvalunic acid ผสมอยู่ด้วยอัตราส่วน (antibiotic: calvalunic acid, 2:1) หลังจากนั้นบ่มเซลล์ต่อที่ 37° เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาค่า MIC ด้วยการดูด้วยตาเปล่าและวัดค่า $OD_{600} < 0.1$ เปรียบเทียบกับค่า breakpoint ซึ่งเป็นค่า MIC มาตรฐานของ *pseudomonas spp.*

2.4. การศึกษาคุณสมบัติการสร้างช่องของรีคอมบิแนนท์ *BpsOmp38* กลายพันธุ์โดยเทคนิค Black Lipid Membrane (BLM) Reconstitution Technique

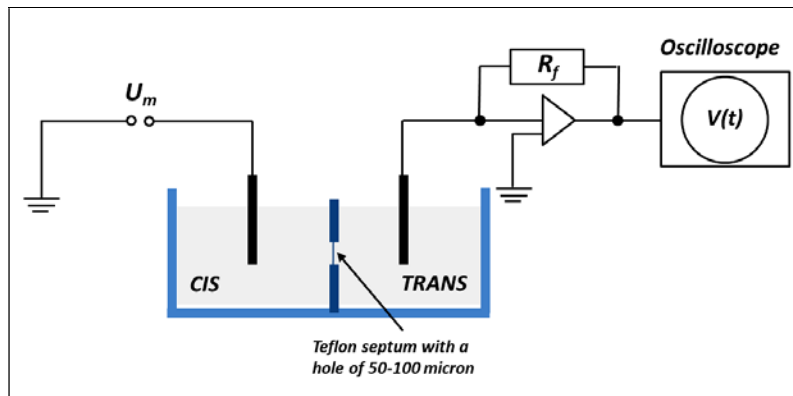
การวัดหา single ion channel conductance โดยวิธี BLM (Nestorovich et al, 2002) อาศัยหลักการ insert ของช่องพอรินบนพอดโฟลิปิดเมมเบรนด้วยการเหนี่ยวนำด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้าที่มีค่าไม่เกิน 200 mV องค์ประกอบของ BLM set-up แสดงให้เห็นในรูปที่ 2.1 จากรูป BLM set-up จะต้องอยู่ภายในกล่องฟาราเดย์ที่มีระบบป้องกันการสั่นสะเทือนสูงเพื่อสามารถวัดกระแสที่เกิดจากการวัดที่ระดับต่ำมาก ๆ กระแสที่เกิดขึ้นเกิดจากการเคลื่อนที่ของไอออน เช่น K^+ หรือ Cl^- ในอิเล็กโตรไลต์ ผ่านช่องพอรินที่ฝังอยู่บนเมมเบรนที่คั่นระหว่าง chamber ด้าน cis และ trans การเคลื่อนที่ของไอออนที่สามารถตรวจวัดด้วยอิเล็กโตรดที่มีสองขั้ว ด้านหนึ่งคือขั้วลบและอีกด้านหนึ่งเป็นขั้วบวก ซึ่งจะแปลงรูปเป็นกระแสไฟฟ้า (I) ที่ระดับ pA โดยค่ากระแสที่วัดจะแปรผันโดยตรงกับความปริมาณไอออนที่เคลื่อนที่ผ่านช่องพอริน *BpsOmp38*



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของ BLM set-up ที่ใช้ศึกษาการแพร่ผ่านของสารผ่านช่องพอริน

การทดลองนี้ทำการตรวจหาคุณสมบัติของ *BpsOmp38* ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 2.1 โดยวัดหาค่า single ion conductance โดย Montal-Mueller BLM technique มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการประกอบแผ่นเทฟลอน (Teflon) ที่มีความหนา 15 ไมครอน และมีรูขนาด 100-200 ไมครอน กับ cuvette เข้าด้วยกัน แผ่นเทฟลอนจะแยก chamber ออกเป็นสองส่วนคือ ส่วน cis และส่วน trans โดยเรียกอิเล็กโทรดด้าน cis ว่าเป็น working electrode ส่วนอิเล็กโทรดด้าน trans ว่าเป็น reference electrode ดังแสดงในรูปที่ 2.2.



รูปที่ 2.2 องค์ประกอบของ BLM cuvette ที่มีแผ่นเทฟลอนที่เจาะรูตรงกลางขนาด 50-100 ไมครอนกั้นระหว่างช่องใส่สารละลายด้าน cis และด้าน trans

2. หยด 1% (v/v) hexadecane ที่เตรียมใน n-hexane ที่ตรงกลางของแผ่นเทฟลอนที่มีรูทั้งสองด้าน โดยใช้ทิปที่เสียบท่อพลาสติกยาวประมาณ 2 cm สำหรับไมโครปิเปตขนาด 20 μL ทิ้งแผ่นเทฟลอนไว้ 5-10 นาที จนตัวทำละลายระเหยหมด

3. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 1 M KCl/20 mM HEPES, pH 7.4 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงใน chamber ทั้งสองด้าน
4. ใช้ Hampton syringe (ขนาด 10 ไมโครลิตร) ดูดสารละลายไขมัน diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC) ความเข้มข้น 5 mg/mL ที่เตรียมในตัวทำละลาย n-pentane และหยดปริมาตร 2-3 ไมโครลิตร ลงในแต่ละด้านของ chamber ทั้งให้ไขมันกระจายตัวดีประมาณ 10-15 นาที
5. ทำการสร้าง planar lipid membrane ด้วยการไปเปิดสารละลายไขมันด้าน CIS ขึ้นลงเบา ๆ
6. ให้กระแสความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ค่าต่าง ๆ เช่น ± 50 , ± 100 , ± 150 และ ± 200 mV ระบบควบคุมความต่างศักย์ไฟฟ้าคือ Axopatch 200B amplifier โดยใช้ voltage-clamp mode ถ้าเมมเบรนไม่ขาด ทั้งให้เมมเบรนคงที่อีกประมาณ 5-10 นาที
7. เติมโปรตีน BpsOmp38 ความเข้มข้นประมาณ 1-2 ng/mL เตรียมใน 1%(v/v) octyl-POE/20mM HEPES, pH 8.0 ลงในด้าน CIS ของ chamber ไปเปิดขึ้นลงเบา ๆ
8. ให้ applied voltage ที่ ± 50 mV รอจนมีกระแทกมีการ insert ของช่องพอร์รินเดี่ยว บันทึกค่ากระแสที่ได้ที่ ± 50 , ± 100 , ± 150 และ ± 200 mV ที่ค่า output gain (α) = 10 และใช้ four-pole low-pass Bessel filter ที่ 10 mHz
9. ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองหาค่า single channel conductance ตามกฎของโอห์ม

2.5. การศึกษาอัตราการนำเข้ยาปฏิชีวนะผ่านช่อง BpsOmp โดยวิธี liposome swelling assay

- การเตรียม multi-lamellar liposome
 1. ชั่ง 20 มิลลิกรัม ของลิปิด (soy bean azolectin) นำมาละลายด้วย chloroform (Avanti) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ที่สะอาด ความเข้มข้นของสารละลายลิปิดที่ได้เป็น 20 mg/mL
 2. ปิเปต 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วที่มีฝาเกลียวปิดได้ เอียงหลอดเป็นมุม 45°C และหมุนหลอด แล้วพร้อมกับเป่าของเหลวเบา ๆ จนแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน $N_2(g)$
 3. เติม 0.2 มิลลิลิตร diethyl ether (analytical grade) เขย่าเบา ๆ จนลิปิดละลายดี ตั้งทิ้งไว้ใน fume hood ประมาณ 10 นาที
 4. จุ่มส่วนก้นของหลอดลงในน้ำอุณหภูมิ 50°C เอียงหลอดเป็นมุม 45 องศาและหมุนหลอดไปพร้อม ๆ กับเป่าของเหลวเบา ๆ จนแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน $N_2(g)$
 5. ถ้ายังมีก้อนลิปิดค้างอยู่ให้ทำการทดลองในข้อ 3 และ 4 ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง
 6. วางหลอดแก้วที่เปิดฝาใน dessicator แล้วทำแห้งอย่างน้อย 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน
- การเตรียม proteoliposome
 1. เติม 200 ไมโครลิตร ของสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 20 $\mu g/mL$ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 mM Tris/HCl, pH 7.5/0.125% LDAO ทำการผสมลิปิดและโปรตีนด้วยการ vortex เบา ๆ (ปรับความเร็วในการเขย่าไม่เกิน 600 rpm) ต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที
 2. ทำการ sonicate หลอดเป็นเวลา 30 วินาที
 3. ทำแห้ง proteoliposome ด้วยเครื่อง evaporator ที่ความดัน 65 mbar ที่อุณหภูมิอ่างเป็น 50°C

4. ทำแห้ง proteoliposome ใน dessicator เป็นเวลาอีก 1 ชั่วโมง
- การเตรียม dextran-filled proteoliposome
 1. เตรียม 17% (w/v) D(+)-dextran (MW 40,000, fluka) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใน 5 mM Tris/HCl, pH 7.4
 2. เติม 600 ไมโครลิตร ของสารละลาย dextran ในแต่ละหลอด แล้วถือหลอดของผสมในแนวตั้ง ยึดแขนตรงแล้วเขย่าหลอดด้วยวิธีการยกแขนขึ้นลงระดับหัวไหล่-เอว 3 ครั้ง
 3. บ่มหลอดสารละลาย proteoliposome/dextran ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บหลอดไว้ในตู้เย็น 4°C
 - การหาค่า isotonic solute concentration
 1. เตรียม 0.1 M stock solution ของสารละลาย raffinose 2 mL ละลายให้ดีขึ้นด้วยการเขย่าด้วย vortex กรองสารละลายน้ำตาลด้วย filtered disc ขนาด 0.45 ไมครอน
 2. เตรียมสารละลายน้ำตาล D-raffinose ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 40, 50, 60, และ 70 mM ใน 5 mM Tris/HCl, pH 7.5 จาก stock solution ในข้อ 1
 3. ปิเปต 25 ไมโครลิตร proteoliposome solution ลงใน 1-mL glass cuvette
 4. เติม 600 ไมโครลิตร 40 mM raffinose ลงใน cuvette เขย่าทันทีเบา ๆ แล้วรีบวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า OD₅₀₀ ภายในเวลา 60 นาที
 5. ทำการทดลองซ้ำกับสารละลายน้ำตาล D-raffinose ที่ความเข้มข้น 50, 60, 70, และ 80 mM
 6. คำนวณอัตราการเปลี่ยนแปลงค่า OD₅₀₀ ของสารละลายน้ำตาลแต่ละความเข้มข้น ณ ช่วงเวลา 60 วินาที ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ทำให้ค่าการเปลี่ยนแปลง ≤ 0.01 ถือว่าเป็น isotonic concentration ให้ใช้ความเข้มข้นนั้นเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ ในการทดลองถัดไป
 - การวัดหาค่า swelling rate ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว
 1. เตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะน้ำตาล ที่ความเข้มข้นเท่ากับ isotonic solute concentration จาก 0.1 M stock solution
 2. ปิเปต 25 ไมโครลิตร proteoliposome solution ลงใน 1-mL glass cuvette
 3. เติม 600 ไมโครลิตร 40 mM raffinose ลงใน cuvette เขย่าทันทีเบา ๆ แล้วรีบวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า OD₅₀₀ ภายในเวลา 60 นาที
 4. คำนวณหาค่า swelling rate จากค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง หาค่า relative swelling rate โดยให้ค่า swelling rate ของน้ำตาล arabinose มีค่าเป็น 100%
 5. สร้างกราฟระหว่างค่า relative swelling rate กับน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล เปรียบเทียบค่าที่ได้ระหว่างน้ำตาลแต่ละชนิด

บทที่ 3

ผลการทดลองและข้อวิจารณ์

3.1. การทดสอบการดื้อยาของเชื้อ clinically-isolated *B. pseudomallei*

การทดลองแรกทำการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ ดังรายละเอียดแสดงในส่วนของการทดลองหัวข้อ 2.3 ของผู้ป่วยเมลิออยโดซิส ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 3.1 พบว่าค่า MIC value ของยาปฏิชีวนะเกือบทุกตัวมีค่าสูงกว่าค่า breakpoint value ยกเว้น ceftazidime และ meropenem ซึ่งแสดงค่า MIC value เป็น $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ และ $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าค่า breakpoint value ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกตัวและมีความไวต่อการรับยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดเท่านั้นคือ ceftazidim ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ cephalosporin และ meropenem ในกลุ่มของ carbapenem การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานอื่น ๆ ที่มีมาแล้ว โดยเชื้อ *B. pseudomallei* บางสายพันธุ์อาจไวต่อยา imipenem ด้วย แต่ในสายพันธุ์ที่ศึกษานี้ให้ค่า MIC value เป็น intermediary ที่อยู่ระหว่างค่า breakpoint ที่เป็น resistance และ sensitive

ตารางที่ 3.1. ผลการทดสอบการดื้อยาของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยวิธี two-fold dilution method ค่า MIC value ที่แสดงในตารางได้จากการทดลองซ้ำกัน 4-6 ครั้ง

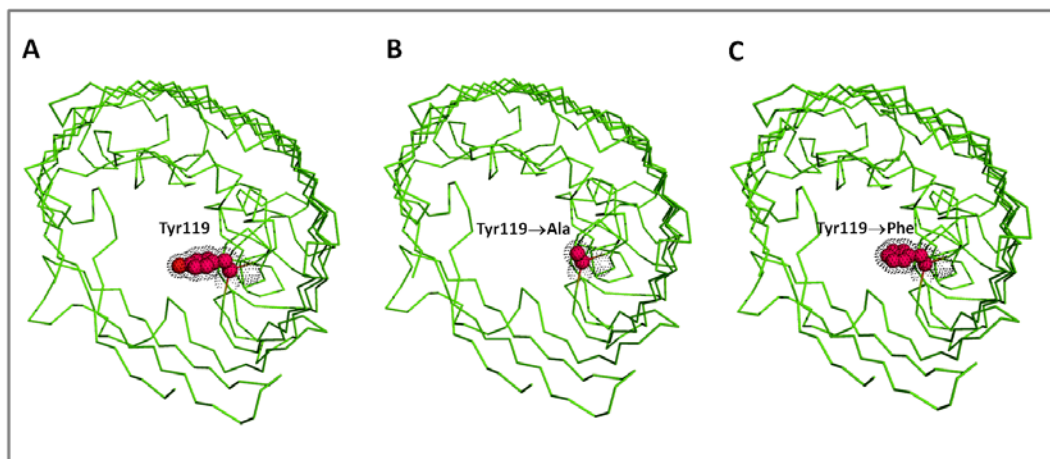
Antibiotic	Breakpoint		MIC value ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	S $\leq$	R $>$	-PA β N	+PA β N
Penicillin				
Penicillin G	≤ 16	> 16	1024 ^R	1024 ^R
Amoxycillin	-	-	256	256
Cephalosporin				
Cefoxitin	NA	NA	1024	1024
Ceftazidime	≤ 8	> 8	2 ^S	2 ^S
Cefepime	≤ 8	> 8	512 ^R	512 ^R
Carbapenem				
Meropenem	≤ 2	> 8	4 ^S	4 ^S
Imipenem	≤ 4	> 8	8 ^I	8 ^I
Doripenem	≤ 1	> 2	$> 2048^R$	$> 2048^R$
Fluoroquinolone				
Norfloxacin	-	-	8	8
Ciprofloxacin	≤ 0.5	> 1	4 ^R	4 ^R
Quinolone carboxylic acid				
Enrofloxacin	-	-	4	4
Sulfonamide-trimethoprim				
Co-trimoxazol	4	4	128 ^R	128 ^R
Aminoglycoside				
Kanamycin	-	-	16	16
Gentamicin	≤ 4	> 4	32 ^R	32 ^R

^a กำหนดค่า breakpoints สำหรับ *Pseudomonas* spp. ตาม the EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 4.0, valid from 2014-01-01 (26).

นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MIC value ต่อยาปฏิชีวนะทุกตัวให้ค่าเหมือนกันในเชื้อที่โตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีตัวยับยั้ง PA β N ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ที่สลายวงแหวน β -lactam ของยาที่มีวงแหวนนี้ในโครงสร้าง การทดลองแสดงให้เห็นว่าการดื้อยาของเชื้อ *B. pseudomallei* ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกการสังเคราะห์เอนไซม์นี้เพื่อทำลายยาปฏิชีวนะ

3.1. การออกแบบการกลายพันธุ์ช่องโปรตีน BpsOmp38

จากการทำนายโครงสร้างสามมิติของพอร์ิน BpsOmp38 พบว่าโปรตีนนี้มีโครงสร้างเป็นช่องแบบ β -barrel ที่ประกอบด้วยสายปิต้า 18 สายมาเรียงกันแบบ anti-parallel ภายในช่องมีส่วนของเกลียวอัลฟาสั้น ๆ แทรกอยู่ตามด้วยห่วง L3 ที่ยื่นเข้าไปตรงกลางช่อง และพบแขนงข้างของกรดอะมิโน Tyr119 ที่บริเวณส่วนต้นของเกลียวอัลฟายื่นเข้ามาบดบังส่วนบนของช่องพอร์ินดังแสดงในรูปที่ 3.1.A เมื่อพิจารณาจากตำแหน่งที่อยู่แล้วคาดว่ากรดอะมิโนนี้น่าจะมีส่วนกำหนดการเข้า-ออกของสาร ผู้วิจัยจึงได้ใช้เทคนิค site-directed mutagenesis ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 119 จาก Tyr ให้เป็น Ala (รูปที่ 3.1B) และ Phe (รูปที่ 3.1C) ผลการทำ site-directed mutagenesis สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ 2 ชนิดคือ BpsOmp38Y119A และ BpsOmp38Y119F ที่มีคุณสมบัติของแขนงข้างต่างกัน โปรตีนที่เปลี่ยน Tyr119 เป็น Ala มีแขนงข้างขนาดเล็กที่ไม่มีขั้ว ส่วนโปรตีนที่เปลี่ยน Tyr119 เป็น Phe มีแขนงข้างอ้วนและมีขั้ว



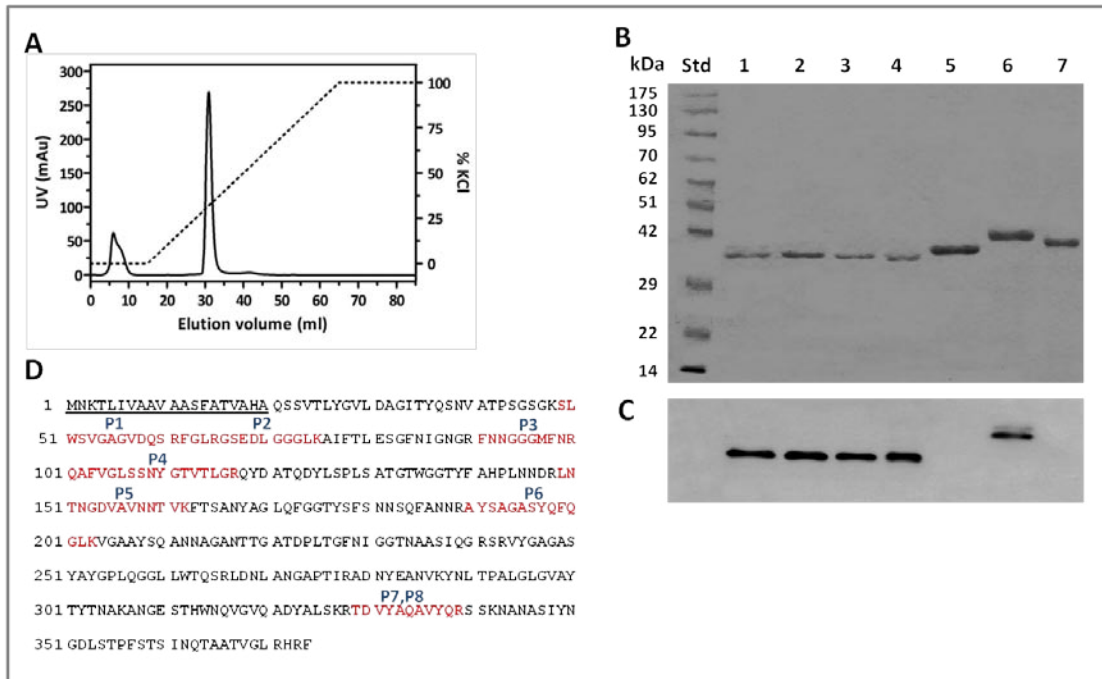
รูปที่ 3.1 โครงสร้างทำนายของช่องพอร์ิน BpsOmp38 ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโน Tyr119 ในช่องพอร์ิน BpsOmp38 ดั้งเดิม (A), BpsOmp38Y119A (B), และ BpsOmp38Y119F (C)

3.2. การผลิต BpsOmp38 จากเชื้อ *E. coli* (BL21) Omp8 Rosetta และการทำบริสุทธิ์

เมื่อทำการกลายพันธุ์เรียบร้อยแล้ว ได้ตรวจสอบความถูกต้องของการเกิด point mutation ด้วยวิธี automated DNA sequencing โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายดีเอ็นเอ พบว่าเส้นดีเอ็นเอมีลำดับกรดอะมิโนที่กลายพันธุ์

ถูกต้อง จึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET23d(+)/*BpsOmp38*, pET23d(+)/*BpsOmp38A* และ pET23d(+)/*BpsOmp38F* ที่สกัดได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านคือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) *Omp8* โคน *E. coli* สายพันธุ์นี้มีการ knockout ของยีนพอรินหลายชนิดคือ *OmpA* *OmpC* *OmpF* และ *LamB* ดังนั้นเหมาะสำหรับในการนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์พอริน *BpsOmp38*

เนื่องจากในขั้นตอนการโคลนยีนได้ใส่ signal peptide เข้าไปในยีน ดังนั้นโปรตีนที่ผลิตได้จะฝังอยู่บนผนังเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อทำการสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากผนังเซลล์ด้วย 2% (w/v) SDS ตามด้วย 3% (v/v) octyl-POE ในขั้นตอนการสกัดด้วยดีเทอร์เจนท์จะได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ระดับหนึ่ง หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวกโดยใช้คอลัมน์ Hitrap SP HP (GE Healthcare) ขนาดความจุ 5 มิลลิลิตร แล้วทำการชะคอลัมน์ด้วย 0-100% KCl พบว่าโปรตีน *BpsOmp38* จับกับคอลัมน์สามารถถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือ KCl ประมาณ 30% ดังแสดงในรูปที่ 3.2A



รูปที่ 3.2. การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน *BpsOmp38* ที่ผลิตโดย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) *Omp8*

- A) กราฟการทำให้บริสุทธิ์โปรตีน *BpsOmp38* ด้วยคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุ Hitrap SP HP แล้วชะด้วย 0-1 M KCl
- B) การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ที่ย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie Blue
- C) การวิเคราะห์ทาง immunoblot ของตัวอย่างในรูป B และตรวจหาการจับกันระหว่าง antibody และ antigen โดยใช้ anti-*BpsOmp38* antiserum
- D) ผลการวิเคราะห์เพปไทด์ด้วย nanoLC/ESI MS

ช่อง: Std, standard proteins; 1, *BpsOmp38*WT; 2, *BpsOmp38*Y119A; 3, *BpsOmp38* mY119F; 4, refolded *BpsOmp38*; 5, *E. coli* *OmpF*; 6, *E. coli* *OmpN*; และ 7, *V. harveyi* chitopirn

เมื่อทำการวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ *BpsOmp38A* และ *BpsOmp38F* (รูปที่ 3.2B ช่องที่ 2 และ 3 ตามลำดับ) ที่สกัดได้น้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 38 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของ *BpsOmp38* ดั้งเดิม (ช่องที่ 1 และ 4) ส่วนช่องพอร์นอื่น ๆ ได้แก่ OmpF (ช่องที่ 5) OmpN (ช่องที่ 6) และ chitopotin (ช่องที่ 7) มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยมากกว่าของ *BpsOmp38* ดั้งเดิมเล็กน้อย เมื่อทดสอบด้วยวิธี immunoblotting พบว่าโปรตีน *BpsOmp38* ทุกช่องบนแผ่นเจลจับกับ anti-*BpsOmp38* antibody (รูปที่ 3.2C ช่องที่ 1-4) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน OmpN มี cross-react ด้วยแอนติบอดีนี้อีกด้วย (รูปที่ 3.2C ช่องที่ 6) ส่วนโปรตีน OmpF และ OmpF ไม่สามารถจับแอนติบอดีได้ เมื่อทำการวิเคราะห์เพปไทด์ด้วยวิธี peptide mass fingerprinting พบว่ามีสายเพปไทด์จำนวน 8 สายคือ สายที่ P1-P8 (รูปที่ 3.2D) มีลำดับของกรดอะมิโนตรงกับส่วนของ outer membrane porin ของ *B. pseudomallei* type strain 1655 (gene id. BURPS1655_I0506) โดยลำดับของกรดอะมิโนของเพปไทด์ดังกล่าวแสดงในตารางที่ 3.2 ผลการทดลองนี้ยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ที่เตรียมได้คือช่องพอร์น *BpsOmp38*

ตารางที่ 3.2. การวิเคราะห์เพปไทด์ของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี nanoLC mass spectrometry

Peptide order	Start	End	Observed	Charge	M_r (expt)	M_r (calc)	Peptide
1	49	61	454.4741	+3	1360.4003	1360.6735	K.SLWSVGAGVDQSR.F
1	49	61	1362.1779	+1	1361.1706	1360.6735	K.SLWSVGAGVDQSR.F
2	62	75	469.4582	+3	1405.3528	1404.7361	R.FGLRGSEDLGGGLK.A
3	91	100	565.2778	+2	1128.5410	1128.4771	R.FNNGGGMFNR.Q + Oxidation (M)
4	101	117	590.5537	+3	1768.6394	1768.9108	R.QAFVGLSSNYGTVTLGR.Q
5	149	162	730.2538	+2	1458.4930	1457.7474	R.LNTNGDVAVNNTVK.F
5	149	162	1459.8120	+1	1458.8047	1457.7474	R.LNTNGDVAVNNTVK.F
6	190	203	745.9739	+2	1489.9333	1489.7201	R.AYSAGASYQFQGLK.V
7	328	339	735.4683	+2	1468.9220	1468.7423	K.RTDVYAQAVYQR.S
7	328	339	735.5847	+2	1469.1548	1468.7423	K.RTDVYAQAVYQR.S
7	328	339	490.9310	+3	1469.7713	1468.7423	K.RTDVYAQAVYQR.S
8	329	339	657.4061	+2	1312.7977	1312.6412	R.TDVYAQAVYQR.S

*หมายเหตุ ลำดับเพปไทด์ที่ซ้ำกันเนื่องจากการเครื่องมือวิเคราะห์หามวลได้เท่ากันจึงจำแนกเพปไทด์เหล่านี้ให้เป็นเพปไทด์เดียวกัน

3.2. ผลของการเปลี่ยนกรดอะมิโน Tyr119 ต่อความไวในการรับยาปฏิชีวนะของเซลล์ *E. coli* ที่มี *BpsOmp38*

การทดลองต่อมาทำการเปรียบเทียบผลของการกลายพันธุ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่มี *BpsOmp38A/F* กับเชื้อ *E. coli* ที่มี *BpsOmp38* ดั้งเดิม ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ ผลการทดลองให้ค่า MIC ดังแสดงในตารางที่ 3.3 จากตารางพบว่าค่า MIC ของเซลล์ *E. coli* ที่สร้างโปรตีนพอร์น *BpsOmp38* มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์ในยาปฏิชีวนะหลายชนิดดังต่อไปนี้ penicillin G ยา ceftazidime ยา cefoxitin ยา imipinem ยา doripenem ยา cotrimoxazole ยา kanamycin และยา gentamycin เมื่อเทียบกับค่า MIC ของ *E. coli* ที่ไม่มี *BpsOmp38* ทั้งนี้ในเซลล์ที่ไม่ผลิตโปรตีน *BpsOmp38* น่าจะใช้ช่องพอร์นอื่นในการรับตัวยา แต่เมื่อเซลล์ *E. coli* ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างพอร์น *BpsOmp38* ปริมาณมาก ทำให้ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีช่องพอร์น

BpsOmp38 เป็นช่องหลักในการนำสารเข้าออก ยาปฏิชีวนะที่แพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ผ่านช่อง *BpsOmp38* เกิดขึ้นได้ยากขึ้นเนื่องจากช่องพอรินสามารถนำสารต่ำจึงให้ค่า MIC เพิ่มขึ้นซึ่งแสดงถึงความสามารถในการรับยาลดลง

ตารางที่ 3.3. ค่า MIC value ของ Omp-deficient *E. coli* ที่เหนี่ยวนำให้ผลิต *BpsOmp38* ค่าที่แตกต่างของกลุ่มตัวอย่างแต่ละชุดมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี 2-way ANOVA analysis จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ $N=10$

Antibiotic	MIC value ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	Control	WT	Y119A	Y119F
Penicillin				
Penicillin G	>16 ^a	>32*	>16**	>16**
Amoxycillin	>32	>32	>32	>32
Cephalosporin				
Ceftazidime	0.5	1*	0.5**	0.5**
Cefoxitin	2	4**	2**	4
Cefepime	0.125	0.125	0.25	0.125
Cabepem				
Meropenem	0.25	0.25	0.125**	0.25
Imipenem	2	4*	2**	4
Doripenem	128	256*	256	512
Fluoroquinolone				
Norfloxacin	0.0625	0.125	0.125	0.125
Ciprofoxacin	≤ 0.03125	≤ 0.03125	≤ 0.03125	≤ 0.03125
Quinolone carboxylic acid				
Enrofloxacin	≤ 0.03125	≤ 0.03125	≤ 0.03125	≤ 0.03125
Sulfonamide-trimethoprim				
Co-trimoxazol	1	2*	2	1
Aminoglycoside				
Kanamycin	256	512*	512	256**
Gentamicin	0.25	2*	1	0.5**

^aเป็นการหาค่า MIC value จากการเลี้ยงเชื้อที่มี clavulanic acid และ β -lactamase inhibitor อยู่ด้วย

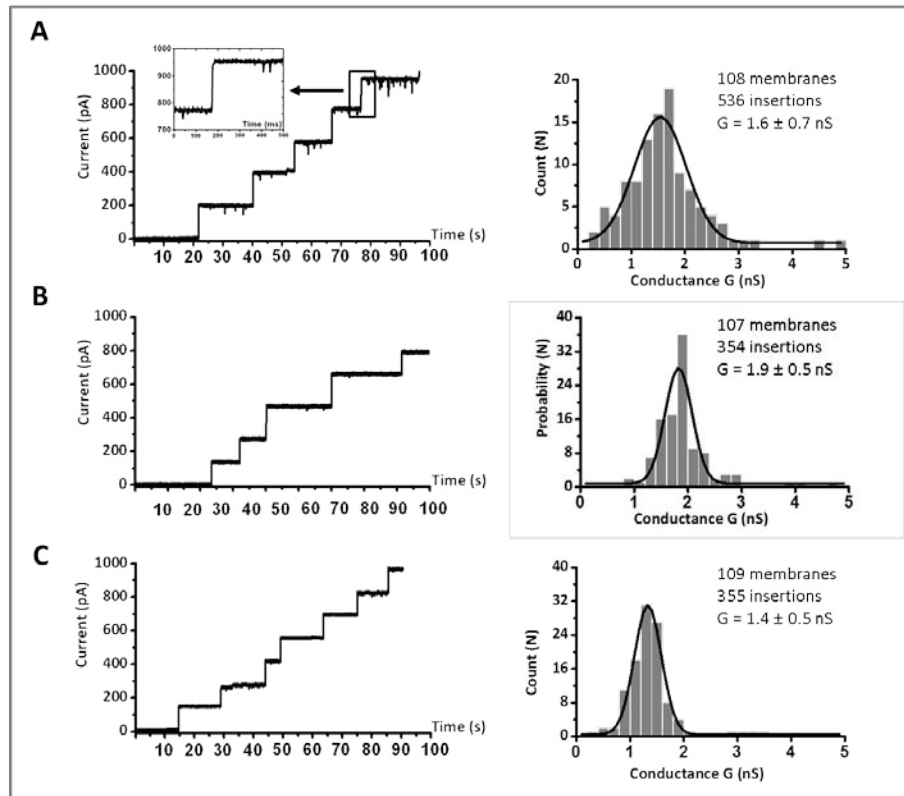
*ค่า MIC values ของเซลล์ที่ผลิตพอริน *BpsOmp38* เทียบกับค่า MIC ของเซลล์ที่ไม่ผลิตพอริน (ตัวอย่างควบคุม)

**ค่า MIC ของเซลล์ที่ผลิตพอรินกลายพันธุ์เทียบกับเซลล์ที่ผลิตพอรินดั้งเดิม

เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของเซลล์ที่ผลิตพอรินกลายพันธุ์ *BpsOmp38* กับค่า MIC ของเซลล์ที่ผลิตพอรินดั้งเดิมพบว่ามีการลดลง แสดงถึงความไวในการรับยาของเซลล์มีมากขึ้นเนื่องจากกรดอะมิโนกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 119 เป็น Ala มีแขนงข้างเล็กทำให้ขนาดของช่องพอรินกว้างขึ้นทำให้เพิ่มความสามารถในการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะมีมากขึ้น ส่วนเซลล์ที่ผลิตพอรินกลายพันธุ์ *BpsOmp38F* มีค่า MIC ของ penicillin cefoxitin kanamycin และ gentamycin น้อยกว่าของเซลล์ที่ผลิตโปรตีนดั้งเดิม ส่วนค่า MIC ของยาตัวอื่นไม่เปลี่ยนยกเว้นยา doripenem ที่ให้ค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่กรดอะมิโนกลายพันธุ์ Phe119 มีขนาดแขนงข้างใกล้เคียงกับกรดอะมิโนดั้งเดิมคือ Tyr119 จึงให้ค่าไวในการรับตัวยามีไม่เปลี่ยนแปลงมากเท่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็น Ala ผลการทดลองแสดงให้เห็นด้วยว่าขนาดของแขนงข้างที่เปลี่ยนไปมีผลต่อความไวในการรับตัวยามากกว่าความมีขั้วหรือไม่มีขั้วของแขนงข้าง

3.3. ผลของการกลายพันธุ์ต่อคุณสมบัติการสร้างช่องพอริน

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างช่องพอรินโดยเทคนิค BLM พบว่าพอริน *BpsOmp38* ดั้งเดิม สามารถแทรกเข้าไปในพอสโฟลิปิดเมมเบรนในลักษณะเป็นขั้นบันได ในแต่ละขั้นแสดงถึงการแทรกของช่องพอรินเดี่ยว ในรูปที่ 3.3A (ซ้ายมือ) แสดงการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสเมื่อเกิดการแทรกของช่องพอรินเดี่ยวที่เกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับที่ละช่องทั้งหมด 5 ช่องที่ช่วงเวลาในการวัด 100 s ส่วน inset ขยายให้เห็นค่ากระแสที่เวลาช่วง 0-500 ms การแทรกตัวของพอรินเข้าไปในเมมเบรนเกิดจากการกระตุ้นด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า ในการทดลองที่เห็นเป็นการแทรกแบบ multiple insertion ที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ +100 mV เมื่อทำการวิเคราะห์หาค่าการนำไอออนหรือค่า conductance จากการทำ histogram analysis ของช่องพอรินในเมมเบรนทั้งหมด 536 ช่อง ให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.6 nS (รูปที่ 3.3A ขวามือ)



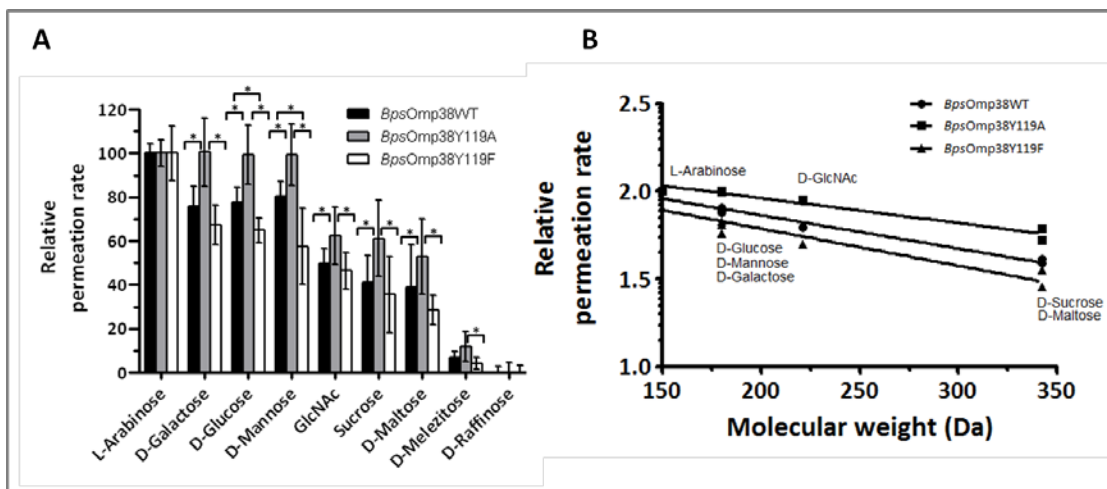
รูปที่ 3.3. คุณสมบัติการสร้างช่องพอริน *BpsOmp38* ดั้งเดิมและช่องพอรินกลายพันธุ์โดยการวัดด้วยวิธี planar lipid reconstitution technique

ส่วนรูปที่ 3.3B และ 3.3C (ซ้ายมือ) แสดงค่า $I(t)$ ของ multiple insertion ของช่องพอรินกลายพันธุ์ *BpsOmp38A* และ *BpsOmp38F* ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์มีคุณสมบัติในการสร้างช่องพอรินที่เสถียรเหมือนกับช่องพอรินดั้งเดิมแต่ค่า conductance เปลี่ยนไปโดยช่อง *BpsOmp38A* ให้ค่า conductance เพิ่มขึ้นเป็น 1.9 nS (รูปที่ 3.3B ขวามือ) ส่วนช่อง *BpsOmp38F* ให้ค่า conductance น้อยลงเป็น 1.4 nS (รูปที่ 3.3C ขวามือ) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโน Tyr1119 เป็น Ala ทำให้

ความสามารถในการนำอออนของช่องพอริน *BpsOmp38* ดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากแขนข้างของ Ala มีขนาดเล็กทำให้ไม่บดบังการแพร่ผ่านของอออน ขณะที่การเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกันเป็น Phe ที่มีแขนข้างอ้วนใหญ่ ทำให้ไปบดบังการแพร่ของอออน นอกจากนี้การเพิ่มความมีขี้ไม่มีขี้ของกรดอะมิโนจาก Tyr เป็น Phe ทำให้คุณสมบัติการนำอออนของช่องพอรินลดลง

3.4. ผลของการกลายพันธุ์ต่ออัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์และโอลิโกแซคคาไรด์

การทดลองต่อมาคือการตรวจหาอัตราการแพร่ผ่านหรือ permeation rate ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ผ่านช่องพอริน กลายพันธุ์โดยเทคนิค liposome swelling assay กราฟที่แสดงในรูปที่ 3.4A เป็นอัตราการแพร่ผ่านช่องพอรินในลักษณะ bulk permeation โดยเกิดการแทรกตัวของพอรินในเยื่อเมมเบรนหลายชั้นหรือ multilamella liposome เรียกไลโปโซมที่มีพอรินแทรกอยู่ว่า proteoliposome ในการทดลองนี้หาค่าอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลชนิดต่างๆ เทียบกับอัตราการแพร่ผ่านของ D-arabinose ที่ให้ค่าเป็น 100% เนื่องจากน้ำตาลนี้มีขนาดโมเลกุลเดียวมีขนาดเล็กที่สุดจึงมีอัตราการแพร่ผ่านสูงที่สุดเสมอ



รูปที่ 3.4. แสดงอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์และน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ผ่าน proteoliposome ของพอริน *BpsOmp38*

(A) เปรียบเทียบอัตราการแพร่ผ่าน proteoliposome ที่เตรียมจากพอรินกลายพันธุ์เทียบกับพอรินดั้งเดิมกับชนิดของน้ำตาล

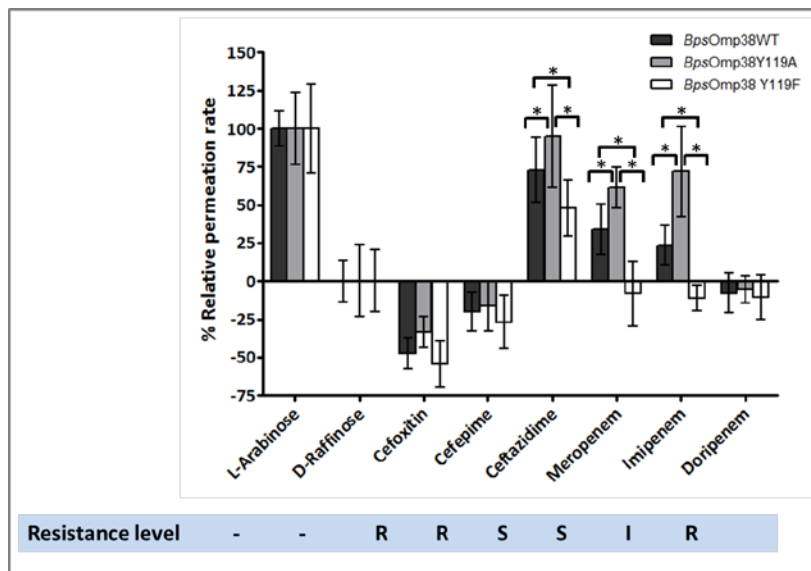
(B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแพร่ผ่านกับน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลที่ทดสอบ

จากรูปที่ 3.4A จะเห็นว่าอัตราการแพร่ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือ D-glucose D-galactose D-mannose และ D-GlcNAc (MW 180 ดาลตัน) มีค่าสูงกว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่คือ D-sucrose (MW 342 ดาลตัน) และ D-maltose (MW 342 ดาลตัน) และน้ำตาลโมเลกุลสามหน่วยคือ D-melzitose (MW 504 ดาลตัน) และ D-raffinose (MW 504 ดาลตัน) เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวน้อยกว่า ส่วนน้ำตาล D-glucose D-galactose และ D-mannose ให้ค่าอัตราการแพร่ไม่แตกต่างกันเนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ส่วนน้ำตาล D-GlcNAc มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 221 ดาลตัน ให้ค่าอัตราการแพร่น้อยกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่น ๆ ที่เล็กกว่า (รูปที่ 3.4B)

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการแพร่ของพอรินกลายพันธุ์กับพอรินดั้งเดิมพบว่า ค่าอัตราการแพร่ของน้ำตาลทุกชนิดของ *BpsOmp38A* มีค่าน้อยกว่าของพอรินดั้งเดิม ส่วน *BpsOmp38F* ให้ค่าน้อยกว่า ซึ่งผลน่าจะเกิดจากการดะมิโน Ala ที่เข้าไปแทนที่ Tyr119 ทำให้ขนาดของช่องกว้างขึ้น ส่วน *BpsOmp38F* มีค่าอัตราการแพร่ของน้ำตาลลดลง แสดงให้เห็นว่าความไม่มีขั้วของ Phe ที่ตำแหน่ง 119 มีผลต่อการแพร่ผ่านของน้ำตาลโดยอาจไปปฏิสัมพันธ์กับวงแหวนน้ำตาลที่มีความไม่มีขั้วอยู่ ซึ่งปฏิสัมพันธ์นี้ไม่สังเกตเห็นกับการแพร่ผ่านของอออนดังแสดงในผลการทดลอง ส่วนที่ 3.5

3.5. ผลของการกลายพันธุ์ต่อคุณสมบัติการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะ

การทดลองส่วนสุดท้ายทำการทดสอบอัตราการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะผ่าน proteoliposome ที่เตรียมจากพอรินดั้งเดิมและกลายพันธุ์ ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 3.5 ผลการทดลองแสดงการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะบางตัวเท่านั้นผ่านช่องพอริน *BpsOmp38* ได้โดยอัตราการแพร่ผ่านมีลำดับดังนี้ ceftazidime > meropenem > imipenem ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 3.1 ที่แสดงว่า *B. pseudomallei* มีความไวในการรับยา ceftazidime และยา meropenem ส่วนยาตัวอื่นที่ทดสอบไม่สามารถแพร่ผ่านพอริน *BpsOmp38* ได้คือ ให้อัตราการแพร่ผ่านมีค่าติดลบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อด้อยาสองชนิดนี้



รูปที่ 3.5. แสดงอัตราการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะผ่าน proteoliposome ของพอริน *BpsOmp38*
เครื่องหมาย *แสดงการมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ โดยการวิเคราะห์ด้วย 2-way ANOVA

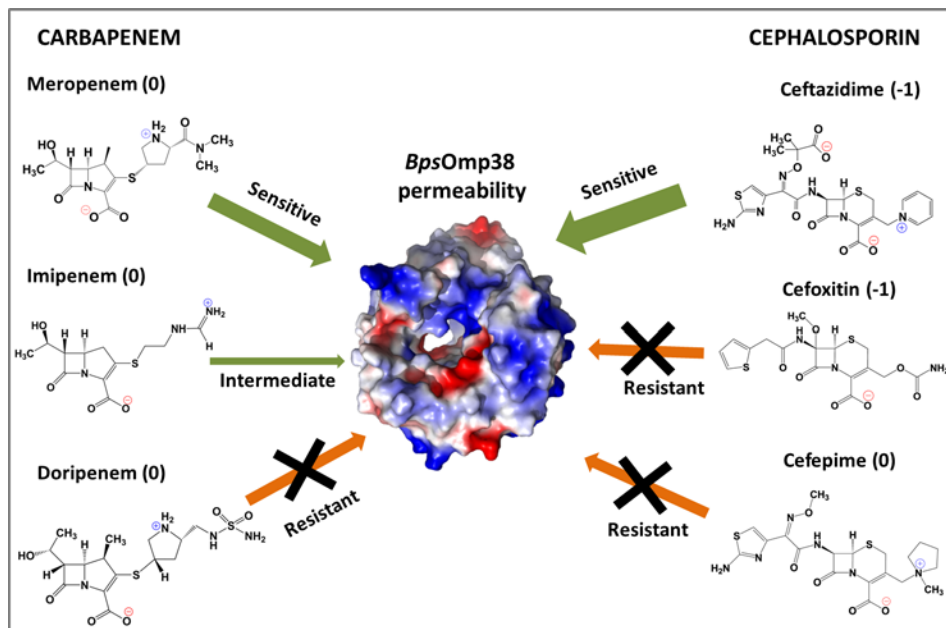
เมื่อศึกษาผลกระทบของการกลายพันธุ์พบว่าพอริน *BpsOmp38A* ให้ค่าการแพร่ผ่านของตัวยาทั้งสามคือ ceftazidime meropenem และ imipenem มากขึ้น หรือให้ค่าการแพร่ผ่านกับตัวอื่นมีค่าติดลบน้อยลง ส่วน *BpsOmp38F* ให้ผลตรงข้ามคืออัตราการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะลดน้อยลงกว่าของพอรินดั้งเดิม ผลการทดลองที่ยืนยันว่าแขนงข้าง Ala ที่แทนที่ Tyr ที่ตำแหน่ง 119 ช่วยให้อัตราการแพร่ผ่านของยาเกิดได้ดีขึ้น ส่วนแขนงข้างที่ไม่มีขั้วของ Phe ยับยั้งการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะ

บทที่ 4

บทสรุป

1.1. สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ต้องการศึกษาผลของการเปลี่ยนกรดอะมิโน Tyr119 ต่อคุณสมบัติในการนำสารต่าง ๆ เข้าสู่ช่องพอรินของเซลล์แบคทีเรียก่อโรคเมลิออยโดซิส ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค site-directed mutagenesis ในการสร้างยีนกลายพันธุ์แล้วทำการแสดงออกของพอรินกลายพันธุ์ *BpsOmp38A/F* ใน *E. coli* สายพันธุ์ Omp8 หลังจากนั้นศึกษาผลกระทบของการกลายพันธุ์ต่อการนำไอออน น้ำตาลและยาปฏิชีวนะ ผลการทดลองจากการทำ two-fold dilution assay ยืนยันว่าการเปลี่ยน Tyr119 เป็น Ala/Phe เปลี่ยนความสามารถในการรับยาของเชื้อ *E. coli* ผลการทดลองที่ได้จากวิธี BLM แสดงให้เห็นว่าพอรินกลายพันธุ์มีค่าการนำไอออนเปลี่ยนไป ส่วนผลการทดลองที่ได้จาก liposome swelling assay แสดงการเปลี่ยนแปลงอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลและยาปฏิชีวนะ โดยพอรินกลายพันธุ์ *BpsOmp38A* ให้ผลในเชิงส่งเสริม ส่วน *BpsOmp38F* ให้ผลในเชิงยับยั้ง



รูปที่ 4.1. แสดงความเชื่อมโยงระหว่างการดื้อยาปฏิชีวนะและพอริน *BpsOmp38* ของเชื้อ *B. pseudomallei*

รูปที่ 3.6 เป็นแผนภาพสรุปแสดงถึงกลไกการดื้อยาของเชื้อก่อโรคเมลิออยโดซิสที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการแพร่ผ่านของยาปฏิชีวนะเข้าสู่ช่องพอริน *BpsOmp38* โดยสรุปการศึกษานี้ถือเป็นข้อมูลทางทฤษฎีที่สำคัญที่จะนำไปสู่การออกแบบโครงสร้างยาปฏิชีวนะที่มีผลบังคับสูงต่อแบคทีเรียก่อโรคเมลิออยโดซิสในอนาคต

1.2. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

เอกสารอ้างอิง

1. Alberti S, Rodriquez-Quinones F, Schirmer T, Rummel G, Tomas JM, Rosenbusch JP, Benedi VJ. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect Immun*. 1995, 63:903-910.
2. Bavoil P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1984, 44:479-485.
3. Berkane E, Orlik F, Charbit A, Danelon C, Fournier D, Benz R, Winterhalter M. Nanopores: maltoporin channel as a sensor for maltodextrin and lambda-phage. *J Nanobiotechnology*. 2005 , 3:3
4. Behlau M, Mills DJ, Quader H, Kuhlbrandt W, Vonck J. Projection structure of the monomeric porin OmpG at 6 Å resolution. *J Mol Biol*. 2001, 305:71-77.
5. Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*. 1992, 358:727-733.
6. Cowan SW, Garavito RM, Jansonius JN, Jenkins JA, Karlsson R, König N, Pai EF, Pauptit RA, Rizkallah PJ, Rosenbusch JP, et al. The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form. *Structure*. 1995, 3:1041-1050.
7. Darveau RP, MacIntyre S, Buckley JT, Hancock RE. Purification and reconstitution in lipid bilayer membranes of an outer membrane, pore-forming protein of *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol*. 1983, 156:1006-1011.
8. Delost, MD (1997). Introduction to diagnostic microbiology: a text and workbook. Walsworth, United State of America.
9. Douglas JT, Lee MD, Nikaido H. Protein I of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane is a porin. *FEMS Microbial Lett*. 1981, 12:305-302.
10. Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstrete DR, Winter AJ. Porins of *Brucella* species. *Infect Immun*. 1984, 44:16-21.
11. Ellis JF, Titball RW. *Burkholderia pseudomallei*: medical, veterinary and environmental aspects. *Infect Dis Rev*. 1999, 1:174-181.
12. Flammann HT, Weckesser J. Porin isolated from the cell envelope of *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol*. 1984, 159:410-412.

13. Gotoh N, Wakebe H, Yoshihara E, Nakae T, Nishino T. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J Bacteriol.* 1989, 171:983-990.
14. Gotoh N, White NJ, Chaowagul W, Woods D. Isolation and characterization of the outer-membrane proteins of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. *Microbiology* 1994, 140:797-805.
15. Hancock RE, Decad GM, Nikaido H. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Biochim Biophys Acta.* 1979, 554:323-331.
16. Nakae T. Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976, 71:877-884.
17. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 1985, 49:1-32. Review.
18. Nikaido H, 1994 Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994, 264:382-388. Review.
19. Olesky M, Zhao S, Rosenberg RL, Nicholas RA. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. *J Bacteriol.* 2006, 188:2300-2308.
20. Rocque WJ, McGroarty EJ. Structure and function of an OmpC deletion mutant porin from *Escherichia coli* K-12. *Biochemistry.* 1990, 29:5344-5351.
21. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH, Suginta W. Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Biochem J.* 2004, 377:579-587.
22. Siritapetawee J, Prinz H, Krittana C, Suginta W. Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem J.* 2004, 384:609-617.
23. Tran QT, Mahendran KR, Hajjar E, Ceccarelli M, Davin-Regli A, Winterhalter M, Weingart H, Pages JM. Implication of porins in β -lactam resistance of *Providencia stuartii*. *J Biol Chem.* 2010, 285, 32273-32281.
24. Tsujimoto H, Gotoh N, Yamagishi J, Oyamada Y, Nishino T. Tsujimoto et al. Cloning and expression of the major porin protein gene *opcP* of *Burkholderia (formerly Pseudomonas) cepacia* in *Escherichia coli*. *Gene.* 1997, 186:113-118.
25. Woods DE, DeShazer D, Moore RA, Brett PJ, Burtneck MN, Reckseidler SL, Senkiw MD. Current studies on the pathogenesis of melioidosis. *Microbes Infect.* 1999, 1:157-162. Review.

26. Wyllie S, Longbottom D, Herring AJ, Ashley RH. Single channel analysis of recombinant major outer membrane protein porins from *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. FEBS Lett. 1999, 445:192-196.
27. Wyllie S, Ashley RH, Longbottom D, Herring AJ. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. Infect Immun. 1998, 66:5202-5207.

ภาคผนวก ก

ผลงานตีพิมพ์และการเผยแพร่

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 1 ผลงาน

1. Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M, **Suginta W***. (2014) BpsOmp38 porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of the ultraresistant melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei*. PLoS One. 9:e95918. (IF2013 = 3.53)

2. ผลงานนำเสนอในรูปแบบบรรยายหรือโปสเตอร์ในที่ประชุมระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 2 ผลงาน

1. Anuwat Aunkham, Albert Schulte, Mathias Winterhalter, **Wipa Suginta***. Porin involvement in antibiotic resistance of *Burkholderia pseudomallei*. 7th AOHUPO/9th PST Congress 'Frontiers in Proteins and Proteomic Research', 6-8 August, 2014, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Poster Presentation,
2. Anuwat Aunkham and **Wipa Suginta***. Mutation of the pore-restriction residue alters the permeability of the outer membrane porin BpsOmp38 of *Burkholderia pseudomallei*. 8th International Symposium of the protein Society of Thailand, 5-7 August, 2013, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Poster Presentation, (2nd prize poster presentation award).

ภาคผนวก ข

ประวัตินักวิจัย

Name	(ไทย) วิภา สุจินต์ (English) Wipa Suginta
Affiliation	(ไทย) กลุ่มวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า สาขาวิชาเคมีและชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา 30000 (English) School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand Tel: +66 44 22 6187; E-mail wipa@sut.ac.th
Degree	Ph.D. (Biochemistry), The University of Edinburgh, UK M.Sc. (Biochemistry), Mahidol University, Bangkok, Thailand B.Sc. (Genetics), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
Current Position	Associate Professor in Biochemistry

ปี พ.ศ.	รางวัล	จากหน่วยงาน
2014	รางวัลโลเกียรติคุณโลประกาศเกียรติคุณสำหรับพนักงานผู้มีผลงานดีเด่นที่ได้รับรางวัลจากหน่วยงานภายนอก	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2014	รางวัลนักชีวเคมีและนักชีววิทยาโมเลกุลดีเด่น (Professor. M.R. Jisnusun Svasti BMB Award)	สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
2013	รางวัล "TRF-CHE-Scopus Researcher Award" สาขา Life Sciences and Agricultural Sciences	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ) และสำนักพิมพ์ Elsevier
2009-2012	รางวัลทุนวิจัย "Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers"	The Alexander von Humboldt Foundation, Bonn, Germany
2010	รางวัลพนักงานดีเด่นประจำปี 2553 สาขา "การวิจัย"	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2006	รางวัลผู้มีผลงานดีเด่นทางด้านวิทยาศาสตร์ เนื่องในงานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ ประจำปี 2006	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2005	รางวัลทุนวิจัย "For Women in Science Fellowship"	L'OREAL (Thailand)/UNESCO

Research Interest

1. Structure and function of bacterial porins
2. Structure and function of chitinases and chitobiases from marine bacteria to humans

List of Published Articles

1. Meekrathok P, Bürger M, Porfetye AT, Vetter IR, **Suginta W***. (2015) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a GH20 β -N-acetylglucosaminidase from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 71:427-433.
2. Ranok A, Wongsantichon J, Robinson RC, **Suginta W*** (2015) Structural and thermodynamic insights into chitooligosaccharide binding to human cartilage chitinase 3-Like Protein 2 (CHI3L2 or YKL-39). *J Biol Chem*, 290:2617-2629.
3. Theanponkrang S, **Suginta W**, Weingart H, Winterhalter M, Schulte A* (2015) Robotic voltammetry with carbon nanotube-based sensors: A superb blend for convenient high-quality antimicrobial trace analysis. *Int J Nanomedicine*, 10:859-868.
4. Chaocharoen W, **Suginta W**, Ranok A, Limbut W, Numnuam A, Khunkaewla P, Kanatharana P, Thavarungkul P, Schulte A* (2015) Electrochemical immunosensing of human YKL-40, a mammalian chitinase-like protein and disease marker. *Bioelectrochem.* 101:106-113.
5. Chotinantakul K, **Suginta W***, Schulte Albert* (2014) An Advanced amperometric respiration assay for antibiotic susceptibility testing. *Anal Chem.* 86:10315-10322.
6. Sirimontree P, **Suginta W***, Sritho N, Kanda Y, Shinya S, Ohnuma T, and Fukamzo T*. (2014) Mutation strategies for obtaining chitooligosaccharides with longer chains by transglycosylation reaction of a family GH18 chitinase. *Biosci Biotech Biochem.* 78:2014-2021.
7. Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M, **Suginta W***. (2014) *BpsOmp38* porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of the ultraresistant melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS One.* 9:e95918.
8. Ranok A, Khunkaewla P, **Suginta W*** (2013) Human cartilage chitinase 3-like protein 2: Cloning, expression, production of polyclonal and monoclonal antibodies for osteoarthritis detection and identification of potential binding partners. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother (formerly Hybridoma).* 32, 317-325.
9. **Suginta W**, Smith MF* (2013) Single-molecule trapping dynamics of sugar-uptake channels in marine bacteria. *Phys Rev Lett.* 110, 238102.
10. **Suginta W**, Khunkaewla P, Schulte A* (2013) Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. *Chem Rev.* 113, 5458-5479.

11. **Suginta W***, Chumjan W, Mahendran KR, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Chitoporin from *Vibrio harveyi*: A Channel with Exceptional Sugar Specificity. **J Biol Chem.** 288, 11038-11046.
12. **Suginta W***, Chumjan W, Mahendran KR, Janning P, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Molecular uptake of chitooligosaccharides through chitoporin from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. **PLoS One.** 8:e55126.
13. **Suginta W***, Sritho N. (2012) Multiple roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by *Vibrio harveyi* chitinase A. **Biosci Biotech Biochem.** 76, 2275-2281.
14. Sritho N & **Suginta W*** (2012) Role of Tyr-435 of *Vibrio harveyi* chitinase A in chitin utilization. **App Biochem Biotech.** 166, 1192–1202.
15. Pantoom S, Vetter I*, Prinz, H*, **Suginta W*** (2011) Potent family-18 chitinase inhibitors: X-ray structures, affinities and binding mechanisms. **J Biol Chem.** 286, 24312-24323.
16. **Suginta W***, Mahendran KR, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M, Weingart H*. (2011) Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin *BpsOmp38* from an ultraresistant *Burkholderia pseudomallei* strain. **BBA-Biomembr.** 1808, 1552-1559.
17. **Suginta W***, Chuenark D, Masuhara M, Fukamizo T (2010) Novel β -N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification. **BMC Biochem.** 11:40. (Highly accessed)
18. Schulte A, Ruamchan S, Khunkaewla P, **Suginta W*** (2009) The outer membrane protein VhOmp from *Vibrio harveyi*: The pore-forming properties in black lipid membranes. **J Membr Biol.** 230, 101-111.
19. **Suginta W***, Pantoom S, Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. **J Chem Biol.** 2, 191-202.
20. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC, **Suginta W*** (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. **J Struct Biol.** 162, 491-499.
21. Pantoom S, Songsiriritthigul C, **Suginta W*** (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. **BMC-Biochem.** 9:2.
22. **Suginta W***, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R, Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. **BBA-General Subjects.** 1770, 1151-1160.
23. **Suginta W*** (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. **Enzyme Microb Tech.** 41, 212-220.

24. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H, **Suginta W*** (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. **Acta Cryst. Section F.** 61, 895-898.
25. **Suginta W***, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J, Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. **FEBS J.** 272, 3376-3386.
26. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, **Suginta W*** (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. **Biochem J.** 384, 609-617.
27. **Suginta W***, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J, Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. **Arch Biochem Biophys.** 424, 171-180.
28. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH, **Suginta W*** (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. **Biochem J.** 377, 579-587.
29. **Suginta W**, Karoulis N, Aitkin A, Ashley RH* (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. **Biochem J.** 359, 55-64.
30. **Suginta W**, Robertson PAW, Austin B, Fry SC, Fothergill-Gilmore LA* (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. **J Appl Microbiol.** 89, 76-84.
31. Svasti J*, Srisomsap C, Surarit R, Benjavongkulchai E, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Champattanachai V, Nilwarangkoon S, Rungvirayudx S (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In Protein Structure-Function Relationship (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press. pp.249-257.
32. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P, Benjavongkulchai E* (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.
33. **Suginta W**, Svasti MRJ* (1995) Purification and Properties of β -Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. **Science Asia (Formerly J Sci Soc Thai)** 21, 183-186.

34. **Suginta W**, Svasti J* (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.
35. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P, Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. **Science Asia (Formerly J Sci Soc Thai)** 21, 293-303.

หมายเหตุ *Corresponding author

Oral/Poster Presentations on International Meetings in the last five years

More than 90 abstracts were accepted.