บทคัดย่อ

232251

โปรตีนขนส่งกลูโคสและโซเดียม SGLT1 สามารถพบได้บนผิวเซลล์ในบริเวณลำไส้เล็กและไตในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด และมีหน้าที่สำคัญมากในการดูดซึมน้ำตาลแบบจำเพาะเจาะจงเพื่อรักษาความสมดุลให้กับร่างกาย และจากความสำคัญดังกล่าวจึงนำมาซึ่งการศึกษาโปรตีนชนิดนี้กันอย่างแพร่หลายเพื่อทั้งประโยชน์ในทางการแพทย์และทางการศึกษา แต่กระนั้นก็ตามการศึกษาทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการนำพาน้ำตาลและการคัดเลือกชนิดน้ำตาลเข้าสู่เซลล์นั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก ในงานวิจัยนี้ได้นำวิธีทางชีวฟิสิกส์สมัยใหม่คือเทคนิคทางด้านโมเลกุลเชิงเดี่ยวโดยใช้เครื่องวัดแรงอันตรกิริยา (atomic force microscopy, AFM) และวิธีทางชีวเคมีมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาคุณสมบัติการนำพาน้ำตาลของโปรตีนขนส่งนี้ โดยในงานวิจัยนี้ได้นำเซลล์ไข่ของหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกถ่ายยีนสร้างโปรตีนขนส่งกลูโคสและโซเดียมมาใช้ในการศึกษา ขั้นแรกได้ทำการทดลองทางชีวเคมีโดยศึกษาการแสดงออกของเซลล์ในการสร้างโปรตีนขนส่งกลูโคสและโซเดียมบนพื้นผิวเซลล์ด้วยวิธีการใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Immuno-histochemistry) และผลการทดลองสามารถระบุได้ว่า โปรตีนชนิดนี้ถูกสร้างในปริมาณมากและฝังอยู่ที่ผิวของเซลล์ซึ่งเหมาะสมในการนำไปศึกษาต่อไป โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้น้ำตาลกลูโคส (1-thio-D-glucose) เชื่อมต่อกับปลายเข็ม (cantilever) ด้วยปฏิกิริยาจำเพาะทางเคมี และนำปลายเข็มนั้น ไปใช้ศึกษาความจำเพาะระหว่างกลูโคสและโปรตีน SGLT1 บนผิวเซลล์ที่มีชีวิตในสภาวะที่มีและไม่มีตัวยับยั้งการขนส่งน้ำตาล (inhibitor) ผ่านโปรตีนขนส่งกลูโคสและโซเดียมในสารละลาย และเพื่อที่จะศึกษาแรงกระทำที่ใช้ในการแยกกลูโคสออกจากโปรตีนขนส่ง อีกทั้งได้ทำการเปรียบเทียบแรงกระทำนั้นกับผลการทดลองที่ได้ทำการเปลี่ยนความยาวของสายลิงค์เกอร์ (cross-linker) และขนาดของหมู่เคมีที่ปลายสายลิงค์เกอร์ด้วย โดยมีความมุ่งหวังที่จะพัฒนาสายลิงค์เกอร์ที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ศึกษาช่องทางผ่านของน้ำตาลกลูโคส จากผลการทดลองสามารถเสนอแนะได้ว่า สายลิงค์เกอร์ที่มีหมู่เคมีที่เล็กและมีความยาวของสายมากกว่าแบบเดิมนั้น มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ศึกษาช่องทางผ่านของน้ำตาลได้ เนื่องจากแรงกระทำที่ใช้ในการแยกกลูโคสจากโปรตีน SGLT1 มีค่ามากกว่าแบบเดิม อาจจะสามารถนำพากลูโคสผ่านรูผ่านของโปรตีน SGLT1 ได้ลึกกว่าอีกสองชนิด จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำสายลิงค์เกอร์นี้ในการประยุกต์ใช้ในการศึกษาคุณลักษณะของรูผ่านของน้ำตาลในโปรตีน SGLT1 เพื่อให้มีความเข้าใจมากขึ้น โดยรวมการศึกษาวิจัยโดยใช้วิธีทางชีวฟิสิกส์ ร่วมกับอณูชีววิทยา สรีระวิทยา และชีวเคมี สามารถทำให้เข้าใจขบวนการและลำดับการนำพาสารอินทรีย์เข้าสู่เซลล์ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาองค์ความรู้และการคิดค้นที่จะนำมาซึ่งประโยชน์ต่อไปในภายภาคหน้า

In the apical membrane of epithelial cells from the small intestine and the kidney, the high-affinity Na^+/D-glucose cotransporter SGLT1 plays a crucial role in selective intestinal glucose absorption and in renal glucose reabsorption. How sugars are selected and transported at the molecular level, however, still poorly understood. Here the over-expression of rabbit SGLT1 in rbSGLT1-transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells was first characterized using the immuno-staining method on non-permeabilized cells. The cells were then imaged with atomic force microscopy (AFM), revealing live and fixed cells strongly attached to glass surfaces. A bioconjugate chemistry approach was employed to functionalize the surfaces of AFM tips with 1-thio-D-glucose molecules via three different heterobifunctional PEG-crosslinkers. The D-glucose binding site and the translocation pathway of SGLT1 were investigated by studying interaction forces between tip-bound 1-thio-D-glucose and SGLT1 in live cells on the single molecule level. Analysis of these forces suggested that a long cross-linker with a small end group can penetrate deeper into the transport channel and might be suitable for probing the D-glucose transport pathway of SGLT1. We show that single molecule AFM technology is a powerful method for the investigation of transmembrane proteins and transporter functions in live cells.